

Aus der Klinik für Gastroenterologie, gastrointestinale Onkologie und Endokrinologie

(Prof. Dr. med. V. Ellenrieder)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Funktionelle und mechanistische
Charakterisierung von EZH2 in
Atm-defizienten Subtypen des
Pankreaskarzinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Luise Annina Goldfuß

aus

Leipzig

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. E. Heßmann

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. E. Heßmann

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 30.11.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Funktionelle und mechanistische Charakterisierung von EZH2 in *Atm*-defizienten Subtypen des Pankreaskarzinoms" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Prognose des Pankreaskarzinoms.....	1
1.2 Initiation und Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC).....	2
1.3 Genetisch modifizierte PDAC Mausmodelle	4
1.4 Aktuelle Therapieansätze des PDACs	5
1.5 Molekulare Subtypen des PDACs	7
1.6 <i>ATM</i> Mutation im PDAC und zielgerichtete Therapie	8
1.7 <i>EZH2</i> Überexpression im PDAC und aktuelle Therapieansätze.....	10
1.8 Interaktionen von <i>ATM</i> mit chromatin-regulatorischen Proteinen.....	11
1.9 Hypothese und Ziele der Arbeit	12
2 Material	13
2.1 Verbrauchsmaterialien	13
2.2 Laborgeräte.....	15
2.3 Software	17
2.4 Chemikalien.....	18
2.5 Puffer und Lösungen	20
2.6 Inhibitoren.....	23
2.7 Kits.....	23
2.8 Antikörper	24
2.9 Primer	25
3 Methoden	26
3.1 Mausmodell	26
3.2 Gewinnung von Proteinlysaten aus Pankreastumorgewebe.....	26
3.3 Genotypisierung	27
3.4 Histologie.....	29
3.4.1 Gewebeaufbereitung.....	29
3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29
3.4.3 Quantifizierung der Mikrometastasen von Pankreastumoren in der Leber.....	30
3.4.4 Immunhistochemie	30
3.4.5 M.O.M.-Kit.....	30
3.5 Zellkultur	31
3.5.1 Zelllinien	31

3.5.2	Subkultivierung/ Passagieren	31
3.5.3	Primäre Tumorzellisolation	32
3.5.4	Genomische DNA-Isolation aus Zelllinien	33
3.5.5	Kryokonservierung der Zelllinien	34
3.5.6	Transfektion mit gegen <i>Ezh2</i> gerichteter siRNA	34
3.5.7	EPZ-6438 Behandlung	34
3.5.8	MTT-Test	34
3.5.9	Staurosporin-Behandlung und Annexin- und Propidiumiodid-Färbung mit nachfolgender Analyse im Durchflusszytometer	35
3.6	Molekulare Methoden.....	35
3.6.1	RNA Isolation.....	35
3.6.2	Komplementäre DNA-Synthese.....	36
3.6.3	qRT-PCR	36
3.6.4	Proteinisolation.....	37
3.6.5	SDS-PAGE	37
3.6.6	Western-Blot	37
3.7	Quantifizierung und statistische Analyse.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Konsequenzen und Auswirkungen des EZH2-Verlusts auf die Entstehung und Progression <i>Atm</i> -defizienter Pankreaskarzinome (<i>in vivo</i>).....	39
4.1.1	Vergleich des Mausphänotyps von transgenen <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien...	39
4.1.2	Bestätigung der <i>Atm</i> -Defizienz und <i>Ezh2</i> -Defizienz	40
4.1.3	Charakterisierung des Einflusses der EZH2 Expression auf die Pankreaskarzinogenese	42
4.1.4	Quantifizierung der Zellproliferationsrate.....	47
4.1.5	Untersuchung des epithelialen Markers E-Cadherin in festen Endpunkten und Tumor- Survival-Kohorten der <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	49
4.1.6	Untersuchung des Gesamtüberlebens in <i>KC</i> , <i>KEC</i> , <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien.....	50
4.1.7	Charakterisierung von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Pankreastumoren <i>in vivo</i>	52
4.2	Einfluss des EZH2-Verlusts auf die Progression <i>Atm</i> -defizienter PDAC Subtypen <i>in</i> <i>vitro</i>	59
4.2.1	Charakterisierung von <i>KATMC</i> Zelllinien nach <i>Ezh2</i> -Knockdown	59
4.2.2	Charakterisierung von <i>KATMC</i> Zelllinien nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 durch EPZ-6438	63
4.2.3	Etablierung primärer Pankreaskarzinomzelllinien mit <i>Ezh2</i> -Defizienz im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz	67
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
5	Diskussion.....	72
5.1	Kontext-Abhängigkeit der EZH2-Funktion.....	72
5.2	Mögliche Ursachen für das verlängerte Überleben der <i>KATMEC</i> Mäuse	73
5.3	Einfluss von EZH2 auf Differenzierungsprozesse in <i>Atm</i> -defizienten PDAC Subtypen	74
5.4	Auswirkungen von EZH2 auf die Apoptose im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz	76

5.5	Intra- und intertumorale Heterogenität im transgenen Mausmodell und in murinen Tumorzelllinien.....	77
5.6	Schlussfolgerung.....	80
6	Zusammenfassung.....	81
7	Abstract	83
8	Literaturverzeichnis	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Pankreaskarzinoms in Deutschland	1
Abbildung 2: Pankreas-Karzinom-Sequenz	3
Abbildung 3: Palliative medikamentöse Therapie des PDACs	6
Abbildung 4: Funktionen von ATM	9
Abbildung 5: Genotypisierung	29
Abbildung 6: Vergleich des Gewichts von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	39
Abbildung 7: Vergleich der Länge von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	40
Abbildung 8: Nachweis der <i>Atm</i> -Defizienz im Pankreas von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	41
Abbildung 9: Nachweis der <i>Ezh2</i> -Defizienz im Pankreas der <i>KATMEC</i> Mauslinie	42
Abbildung 10: HE-Färbung in zwei Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen	43
Abbildung 11: HE-Färbung in drei Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	44
Abbildung 12: HE-Färbung von Tumorerläsionen in drei Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	45
Abbildung 13: HE-Färbung von sechs Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen	46
Abbildung 14: Untersuchung der Zellproliferation in zwei Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	47
Abbildung 15: Untersuchung der Zellproliferation in drei Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	48
Abbildung 16: Untersuchung der Zellproliferation in sechs Monate alten <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	48
Abbildung 17: Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67 in festen Endpunkten der <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien.....	49
Abbildung 18: Untersuchung des epithelialen Markers E-Cadherin.....	50
Abbildung 19: Untersuchung des Gesamtüberlebens in <i>KC</i> , <i>KEC</i> , <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	51
Abbildung 20: Untersuchung des tumorassoziierten Überlebens in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mauslinien	52
Abbildung 21: Tumorzinzidenz nach <i>EZH2</i> -Verlust im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz.....	53
Abbildung 22: Morphologie der Pankreastumoren <i>in situ</i> in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen	54
Abbildung 23: Vergleich von absolutem und relativem Pankreastumorgewicht, Mausegewicht und Milzgewicht zwischen Tumor-Survival-Kohorten von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> .	55
Abbildung 24: HE-Färbung von Pankreastumoren in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Mäusen.....	56
Abbildung 25: Makrometastasierung von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Pankreastumoren in Leber und Zwerchfell.....	57
Abbildung 26: Makro- und Mikrometastasierung im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz.....	58
Abbildung 27: Quantifizierung der Mikrometastasierung von <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Pankreastumoren in die Leber.....	58
Abbildung 28: Zellmorphologie von <i>KATMC</i> Zelllinien nach 48 h <i>Ezh2</i> -Knockdown	60
Abbildung 29: Bestätigung des <i>Ezh2</i> -Knockdowns in <i>KATMC 1-3</i>	60
Abbildung 30: Behandlungsschema zur Apoptosemessung nach <i>Ezh2</i> -Knockdown in <i>KATMC 1-3</i>	61
Abbildung 31: Untersuchung der Apoptoserate nach <i>Ezh2</i> -Knockdown in <i>KATMC 1-3</i>	62
Abbildung 32: Bestätigung des <i>Ezh2</i> -Knockdowns und der Apoptoseinduktion nach Annexin- PI-Färbung und Analyse im Durchflusszytometer.....	62
Abbildung 33: Untersuchung der Zellviabilität nach <i>Ezh2</i> -Knockdown im Kontext der <i>Atm</i> - Defizienz	63

Abbildung 34: Bestätigung des <i>Ezh2</i> -Knockdowns in <i>KATMC 1–3</i> für MTT-Test	63
Abbildung 35: Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 im Kontext der <i>Atm</i> - Defizienz	64
Abbildung 36: Zellmorphologie von <i>KATMC</i> Zelllinien nach 72 h EPZ-6438 Behandlung....	64
Abbildung 37: Behandlungsschema zur Apoptosemessung nach EPZ-6438 Behandlung	65
Abbildung 38: Bestimmung der Apoptoserate nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz.....	66
Abbildung 39: Kontrolle der Effektivität der EPZ-6438 Behandlung in <i>KATMC 1–3</i> nach Apoptosemessung.....	66
Abbildung 40: Untersuchung der Zellviabilität nach Hemmung der EZH2 Methyltransferaseaktivität.....	67
Abbildung 41: Kontrolle der Effektivität der EPZ-6438 Behandlung in <i>KATMC 1–3</i> für MTT- Test.....	67
Abbildung 42: Isolation primärer Pankreaskarzinomzelllinien der <i>KATMEC</i> Tumor-Survival- Kohorte	68
Abbildung 43: Genotypisierungs-PCR <i>Kras</i> ^{G12D}	68
Abbildung 44: Untersuchung von Fibroblasten in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Pankreaskarzinomzelllinien	69
Abbildung 45: Bestätigung der <i>Atm</i> - und <i>Ezh2</i> -Defizienz in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Zelllinien auf RNA-Ebene	69
Abbildung 46: Bestätigung der Abwesenheit von ATM und EZH2 in <i>KATMC</i> und <i>KATMEC</i> Zelllinien auf Protein-Ebene.....	70
Abbildung 47: Apoptoserate nach <i>Ezh2</i> -Knockout im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz	70
Abbildung 48: Zellviabilität nach <i>Ezh2</i> -Knockout im Kontext der <i>Atm</i> -Defizienz	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 2: Laborgeräte.....	15
Tabelle 3: Software.....	17
Tabelle 4: Chemikalien.....	18
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 6: Pharmakologische Inhibitoren.....	23
Tabelle 7: Material Knockdown.....	23
Tabelle 8: Kits.....	23
Tabelle 9: Primärantikörper Western Blot.....	24
Tabelle 10: Sekundärantikörper Western Blot.....	24
Tabelle 11: Primärantikörper Immunhistochemie.....	24
Tabelle 12: Sekundärantikörper Immunhistochemie.....	24
Tabelle 13: Primer für Genotypisierung.....	25
Tabelle 14: Primer für qRT-PCR.....	25
Tabelle 15: Mausmodell.....	26
Tabelle 16: PCR-Ansätze.....	27
Tabelle 17: PCR Programme zur Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien.....	28
Tabelle 18: Zelllinien.....	31
Tabelle 19: PCR Programm <i>Kras^{G12D}</i>	33
Tabelle 20: cDNA Programm.....	36
Tabelle 21: qRT-PCR Programm.....	36
Tabelle 22: p-Wert Kennzeichnung.....	38

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Azinär-duktales Metaplasie
α SMA	α smooth muscle actin
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
Bp	Basenpaar(e)
BRCA1/2	Breast-Cancer-1/2-Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
CC3	<i>Cleaved caspase 3</i>
CDKN2A	Cyclin-abhängiger-Kinase-Inhibitor 2A
cDNA	Komplementäre DNA
DAB	3',3 Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZNep	3-Deazaneplanocin A
EMT	Epithelial mesenchymale Transition
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Folsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
H3	Histon 3
H3K27me3	Trimethyliertes Histon 3 an Lysin 27
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
KATMC	<i>Kras^{G12D}; Atm^{lox/lox}; p48Cre</i>
KATMEC	<i>Kras^{G12D}; Atm^{lox/lox}; Ezh2^{lox/lox}; p48Cre</i>
KC	<i>Kras^{G12D}; p48Cre</i>
KEC	<i>Kras^{G12D}; Ezh2^{lox/lox}; p48Cre</i>
KPC	<i>Kras^{G12D}; TP53^{R172H/+}; p48Cre</i>
LSL	<i>Lox-stop-lox</i>
M.O.M.	<i>Mouse-on-mouse</i>
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid
nab-Paclitaxel	<i>Nanoparticle albumin bound paclitaxel</i>
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäurelösung
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1</i>
NKC	<i>Kras^{G12D}; konstitutiv aktives NFATc1; p48Cre</i>
OTI	Trypsininhibitor
p48/PTF1a	<i>Pancreas associated transcription factor 1a</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit <i>tween 20</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PRC1/2	Polycomb-Repressor-Komplex 2
PS	Performance-Status
qRT-PCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STS	Staurosporin
SWI/SNF-Komplex	SWitch/Sucrose-Non-Fermentable-Komplex
TP53	Tumor Protein p53
TBS	Tris-gepufferte-Saline
TBST	Tris-gepufferte-Saline mit <i>tween 20</i>
UICC	Union for International Cancer Control
UKU	Universitätsklinikum Ulm
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Prognose des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist aktuell die vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache für Männer und Frauen in Deutschland (Christ et al. 2019) und die siebthäufigste krebsassoziierte Todesursache weltweit (Ferlay et al. 2019). Bis in das Jahr 2030 soll das Pankreaskarzinom die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache vor Mamma-, Prostata- und Kolorektalem Karzinom in den USA darstellen (Rahib et al. 2014). Die altersstandardisierte Inzidenzrate in Deutschland blieb in den letzten Jahren weitgehend unverändert und lag im Jahr 2016 bei 14,4 pro 100.000 Einwohner für Männer und 10,9 pro 100.000 Einwohner für Frauen. Zudem lag die Mortalitätsrate von 2010 bis 2016 nur knapp unter der Inzidenzrate und betrug im Jahr 2016 13,7 pro 100.000 Einwohner für Männer und 10,1 pro 100.000 Einwohner für Frauen (siehe Abbildung 1) (Robert Koch-Institut und GEKID e.V. 2020). Dabei spiegelt sich die ungünstige Prognose des Pankreaskarzinoms in der 5-Jahres-Überlebensrate wider. Diese ist mit 9 % für beide Geschlechter weiterhin infaust (Christ et al. 2019). Die mittlere Überlebensrate umfasst zumeist nur wenige Monate nach Diagnosestellung (Bailey et al. 2016).

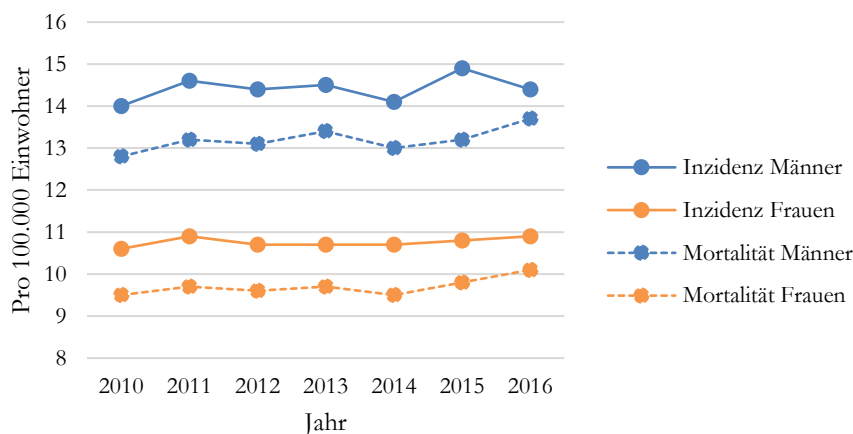


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Pankreaskarzinoms in Deutschland Inzidenz und Mortalität des Pankreaskarzinoms in Deutschland nach Zahlen des GEKID Atlas (Robert Koch-Institut und GEKID e.V. 2020), dargestellt als altersstandardisierte Raten auf den Europastandard (Europastandard = Bevölkerungsvorausschätzung der europäische Standardbevölkerung gemittelt für 2011–2030 (Luxembourg: Publications Office of the European Union 2013)) für Männer und Frauen pro 100.000 Einwohner.

Ein Grund für die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms ist die späte Diagnosestellung in fortgeschrittenen Tumorstadien nach Union for International Cancer Control (UICC). Aufgrund der fehlenden oder unspezifischen Symptomatik erfolgen 52 % der

Diagnosestellungen bei Männern und 50 % der Diagnosestellungen bei Frauen erst im UICC-Stadium 4 (Christ et al. 2019). Eine Resektabilität ist in diesem späten Stadium nicht mehr gegeben. Aber auch bei Diagnosestellung in frühen Stadien ist die Prognose ungünstig. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im UICC-Stadium 1 zwar noch bei 50 % für Männer und 55 % für Frauen, jedoch bereits im UICC-Stadium 2 nur noch bei 18 % für Männer und 16 % für Frauen (Christ et al. 2019). Zudem konnten in den letzten Jahren nur wenige Therapiefortschritte verzeichnet werden. Weitere Probleme stellen das komplexe Genom und hohe Stromaanteile dar, die eine ausgeprägte molekulare und zelluläre Heterogenität des Pankreaskarzinoms bedingen und das Therapieansprechen beeinflussen (Collisson et al. 2011; Feig et al. 2012; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016; Mueller et al. 2018; Looi et al. 2019). Außerdem spielen Resistenzbildungen (Hessmann et al. 2017), aggressives, lokales Tumorstadium und frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung (Mihaljevic et al. 2010) eine entscheidende Rolle für die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms.

1.2 Initiation und Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC)

Physiologisch besteht das Pankreas aus einem exokrinen und einem endokrinen Teil. Der exokrine Teil, bestehend aus Azinuszellen und duktales Zellen (Ausführungsgänge), produziert Verdauungsenzyme, die über den Ductus pancreaticus in das Duodenum sezerniert werden. Zudem besteht das Pankreas aus einem endokrinen Teil, welcher die Langerhans'schen Inselzellen umfasst und Hormone, wie z. B. Insulin und Glucagon produziert und sezerniert (Schünke et al. 2012, S. 252-253).

Die Entstehung des Pankreaskarzinoms wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Als sicherer Risikofaktor gilt hierbei das aktive und passive Rauchen. Aber auch Patientinnen und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, starker Adipositas, chronischem und starkem Alkoholkonsum, chronischer Pankreatitis oder Infektionen mit *Helicobacter pylori*, Hepatitis-B-Virus oder Humanem Immundefizienz-Virus haben ein erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Zudem spielen erbliche Faktoren, wie Mutationen im Breast-Cancer-2-Gen (*BRCA2*) eine Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms (Christ et al. 2019).

Beim Pankreaskarzinom handelt es sich in über 95 % der Fälle um ein duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), welches durch Dysplasien und genetische Alterationen in duktales Epithelzellen des exokrinen Teils des Pankreas entsteht (Hingorani et al. 2003; Mihaljevic et al. 2010). Durch die Untersuchung verschiedener Vorläuferläsionen konnte die Entstehung und Progression des PDACs weiter charakterisiert werden. Zu den Vorläuferläsionen gehören mikroskopisch darstellbare pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) sowie makroskopische Zystenformierungen, wie intraduktales papillär muzinöse Neoplasien und muzinös zystische Neoplasien (Brugge et al. 2004; Maitra et al. 2005; Hezel et al. 2006; Matthaei et al. 2011). Bereits im Jahr 2000 wurde von Hruban et al. anhand von PanIN-Läsionen

und dem zeitlichen Auftreten von genetischen Alterationen eine Pankreas-Karzinom-Sequenz entworfen (siehe Abbildung 2).

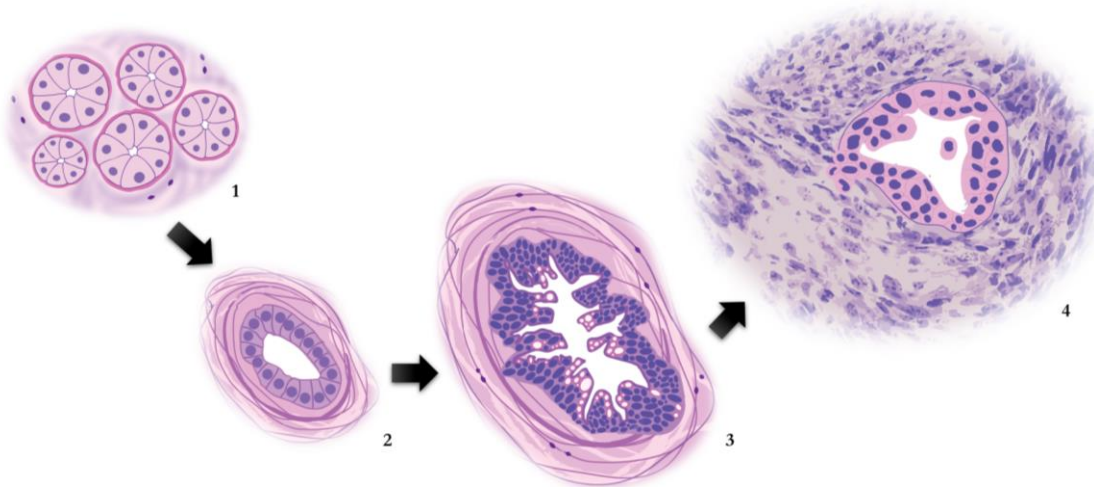


Abbildung 2: Pankreas-Karzinom-Sequenz Schematische Darstellung der Pankreas-Karzinom-Sequenz nach Hruban et al. (2000). Veränderung der Pankreasarchitektur von physiologischen Azinuszellen des Pankreas, über PanIN-Läsionen hin zum invasiven Adenokarzinom des Pankreas. 1: physiologische Azinuszellen, 2: PanIN-1-/PanIN-2-Läsion, 3: PanIN-3-Läsion, 4: invasives Adenokarzinom des Pankreas.

Diese Sequenz berücksichtigt die histologischen Veränderungen des physiologischen Pankreasepithels hin zum invasiven Adenokarzinom des Pankreas. Dieser Vorgang umfasst die Progression von physiologischem Pankreasepithel zu PanIN-1-Läsionen. Diese sind durch den Umbau duktaler Epithelzellen von kubischem Epithel zu Zylinderepithel, mit Einlagerung von muzinreichem Zytoplasma und dem Auftreten von dukталen Läsionen mit erhaltener Zellpolarität gekennzeichnet (Hingorani et al. 2003). Hier wird der aktivierenden Mutation von *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*Kras*) eine initiiierende Rolle zugerechnet, die in 92 % der PDACs nachgewiesen werden konnte (Hezel et al. 2006; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016). Neben aktivierenden Mutationen in *Kras* konnte die Überexpression des Wachstumsfaktors *human epidermal growth factor receptor 2* bereits in PanIN-1-Läsionen gezeigt werden (Hruban et al. 2000). Bei der Progression von PanIN-1- zu PanIN-2-Läsionen treten im Verlauf auch moderate Zellkernatypien und ein Verlust der Zellpolarität auf (Hingorani et al. 2003). Außerdem werden zusätzlich Mutationen des Tumorsuppressorgens Cyclin-abhängiger-Kinase-Inhibitor 2A (*CDKN2A*) beobachtet (Hruban et al. 2000). Bei der weiteren Progression zu hochgradigen PanIN-3-Läsionen kommen vermehrte nukleäre Atypien, in das Lumen einwandernde Zellcluster, ein kompletter Verlust der Zellpolarität, Becherzellen, vermehrte duktale Läsionen und fibroinflammatorisches Stroma hinzu (Hingorani et al. 2003). Zudem treten Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *Tumor Protein p53* (*TP53*), *deleted in pancreatic cancer 4* und *BRCA2* auf, welche physiologisch den Zellzyklus regulieren und die Reparatur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) initiieren. PanIN-3-Läsionen haben im Verlauf ein hohes Risiko in ein invasives Adenokarzinom überzugehen (Hruban et al. 2000). Dieses drei Stufen Modell wurde 2015 von Basturk et al.

zu einem zwei Stufen Modell zusammengefasst, welches niedrig gradige Vorläuferläsionen als PanIN-1- und PanIN-2-Läsionen sowie hochgradige Vorläuferläsionen als PanIN-3-Läsionen definiert.

Die Frage nach der Ursprungszelle des PDACs ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Zunächst ging man aufgrund der Histologie des PDACs von duktalem Zellen als Ursprungszellen aus (Hezel et al. 2006; Wang et al. 2019). Heutzutage nimmt man jedoch an, dass es sich bei den Ursprungszellen des PDACs um azinäre Zellen handelt, die sich durch azinär-duktalem (ADM)-Metaplasie zu PanIN-Läsionen und somit zu Vorläuferläsionen des PDACs entwickeln (Means et al. 2005; Hezel et al. 2006; Kopp et al. 2012; Russell et al. 2015; Wang et al. 2019).

1.3 Genetisch modifizierte PDAC Mausmodelle

Genetisch modifizierte (transgene) PDAC Mausmodelle spielen in der aktuellen Forschung eine sehr wichtige Rolle. Durch sie können u. a. die Pathogenese des PDACs mit spezifischen genetischen Alterationen und diagnostische und therapeutische Strategien präklinisch untersucht und getestet werden (Hingorani et al. 2003; Hezel et al. 2006).

In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung und der Vergleich zweier konditional transgener Mausmodelle anhand des von Hingorani et al. 2003 etablierten Mausmodells mit konditionaler (*p48Cre*) Expression von konstitutiv aktivem *Kras^{G12D}*. Konstitutiv aktivem KRAS wird eine initiiierende Rolle in der Entwicklung des PDACs zugeschrieben und konnte, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, in 92 % der fortgeschrittenen Karzinome nachgewiesen werden (Hruban et al. 2000; Hingorani et al. 2003; Bailey et al. 2016). Bei der *Kras^{G12D}* Mutation handelt es sich um eine Punktmutation in Codon 12. Dies führt zu einem Einbau von Aspartat anstatt Glycin, wodurch onkogenes KRAS entsteht (Hingorani et al. 2003). In dem von Hingorani et al. (2003) etablierten Modell wird diese Mutation pankreasspezifisch exprimiert, welches durch den Einbau einer Lox-Stop-Lox (LSL)-Kassette vor die eben beschriebene Punktmutation eines Allels erfolgt. Dies verhindert zunächst die Transkription und Translation von onkogenem KRAS (*Kras^{wildtyp/-}*). LSL-*Kras^{G12D}*-Mäuse können nun mit Mäusen verpaart werden, die Cre-Rekombinase von pankreasspezifischen Promotoren *pancreatic-duodenal homeobox factor-1/insulin promoter factor-1* oder *pancreas associated transcription factor 1a (p48/PTF1a)* exprimieren. Beide Promotoren werden während der Embryonalentwicklung der Mäuse an Tag 8,5 und 9,5 exprimiert und führen zur Differenzierung der Pankreasknospe in endokrine und exokrine Zellen des Pankreas (Hingorani et al. 2003; Schünke et al. 2012, S. 434). Durch die Verpaarung von LSL-*Kras^{G12D}*-Mäusen und *p48-Cre* exprimierenden Mäusen entstehen heterozygote *Kras^{WT/G12D}*-Mäuse (Hingorani et al. 2003). Diese werden im Weiteren als KC-Mäuse bezeichnet. KC-Mäuse entwickeln duktalem Läsionen, die den bereits beschriebenen drei Stadien der humanen PanIN-Läsionen gleichen. Invasive und metastasierende Adenokarzinome treten ebenso auf. Metastasen in KC-Mäusen treten zudem, wie bei humanen PDACs, in Leber, Zwerchfell und Pleura auf. Beides spricht für die

Vergleichbarkeit des genetisch modifizierten Mausmodells mit den Prozessen in humanen PDACs (Hingorani et al. 2003; Hingorani et al. 2005). Durch Verpaarung der *KC*-Maus mit anderen transgenen Mauslinien kann zudem der Einfluss der Expression verschiedener Gene auf die Karzinogenese und Progression des PDACs analysiert werden (Hingorani et al. 2005; Hezel et al. 2006). So untersuchte Hingorani et al. 2005 den Einfluss der *TP53*^{R172H/+} Mutation im Kontext von konstitutiv aktivem *Kras*^{G12D} (*KPC*-Mäuse) im PDAC.

1.4 Aktuelle Therapieansätze des PDACs

Die Therapie des PDACs richtet sich nach der TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Lymphknoten, M = Fernmetastasen) sowie nach dem Allgemeinzustand der Patientinnen und Patienten (Ducreux et al. 2015). Trotz 50 Jahren Forschung (Vogelzang et al. 2012) ist die chirurgische Entfernung des Tumors mit adjuvanter Chemotherapie aktuell der einzig kurative Therapieansatz des PDACs. Allerdings weisen bei Diagnosestellung nur 15–20 % der Patientinnen und Patienten einen resektablen, nicht metastasierten Tumor auf (Ducreux et al. 2015). Die Resektabilität des Tumors wird bei Diagnosestellung durch Sonographie des Abdomens, Computertomographie des Thorax und Abdomens und fakultativ der Endosonographie der Pankreasregion festgestellt (Ducreux et al. 2015).

1997 konnte die Überlegenheit der Gemcitabin-Monotherapie gegenüber 5-Fluoruracil bewiesen werden (Burris et al. 1997). Seitdem gilt Gemcitabin als Standardtherapeutikum, anhand dessen aktuelle Therapieansätze in klinischen Studien verglichen werden. In den letzten 20 Jahren wurde das Therapieschema FOLFIRINOX, bestehend aus 5-Fluoruracil, Folin-säure, Oxaliplatin und Irinotecan, für die palliative medikamentöse Therapie des PDACs bei gutem Performance-Status (PS) nach der *eastern cooperative oncology group* eingeführt (Conroy et al. 2011). FOLFIRINOX konnte das mediane Gesamtüberleben von 6,6 Monaten unter Gemcitabin-Monotherapie auf 11,1 Monate verlängern. Trotz des Auftretens von Nebenwirkungen unter FOLFIRINOX, wie Neutropenie, Thrombozytopenie, erhöhten Alanin-Aminotransferase-Werten, Diarrhö und Neuropathie verschlechterte sich die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten unter FOLFIRINOX nach sechs Monaten nur bei 33 % im Gegensatz zu 66 % bei Gemcitabin-Monotherapie (Conroy et al. 2011). Zudem wurde durch Von Hoff et al. 2013 die Überlegenheit der Kombination von *nanoparticle albumin bound paclitaxel* (nab-Paclitaxel) und Gemcitabin im Vergleich zu Gemcitabin-Monotherapie in einer Phase-3-Studie gezeigt. So konnte die Kombination das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben signifikant gegenüber der Monotherapie verbessern.

Die Therapie des PDACs erfolgt anhand von Leitlinien. Hier orientiert sich die Leitlinie der European Society for Medical Oncology, wie bereits oben beschrieben, an der Resektabilität, Fernmetastasierung und dem Allgemeinzustand sowie den Komorbiditäten der Patientinnen und Patienten (Ducreux et al. 2015). Patientinnen und Patienten mit resektablen Tumoren ohne Fernmetastasierung erhalten eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin-Monotherapie oder 5-Fluoruracil in Kombination mit Folin-säure. Patientinnen und Patienten mit

sogenannten Borderline-resektablen Tumoren erhalten im Rahmen von klinischen Studien eine neoadjuvante Chemotherapie, je nach Allgemeinzustand mit FOLFIRINOX, nab-Paclitaxel in Kombination mit Gemcitabin oder Gemcitabin-Monotherapie mit dem Behandlungsziel eine Resektabilität des Tumors zu erreichen. Sollte im Anschluss an die neoadjuvante Chemotherapie keine Resektabilität erreicht werden, wird eine palliative medikamentöse Therapie angestrebt. Bei Patientinnen und Patienten mit nicht resektablem, lokal fortgeschrittenem PDAC ohne Fernmetastasierung kann zunächst eine Chemotherapie mit FOLFIRINOX oder nab-Paclitaxel und Gemcitabin erfolgen. Bei PDAC mit Fernmetastasierung wird eine palliative medikamentöse Therapie verfolgt (siehe Abbildung 3). Die Art der palliativen Chemotherapie richtet sich nach dem PS. Bei einem PS von 0–1 kann eine Therapie mit FOLFIRINOX oder nab-Paclitaxel in Kombination mit Gemcitabin erfolgen. Bei einem PS von 2 und/oder einem Anstieg des Bilirubins über 1,5 des oberen Normalwerts erfolgt die Gabe von Gemcitabin-Monotherapie. Bei einem PS von 3–4 oder schweren Komorbiditäten mit einer sehr kurzen Lebenserwartung erfolgt die supportive Behandlung (Ducreux et al. 2015).

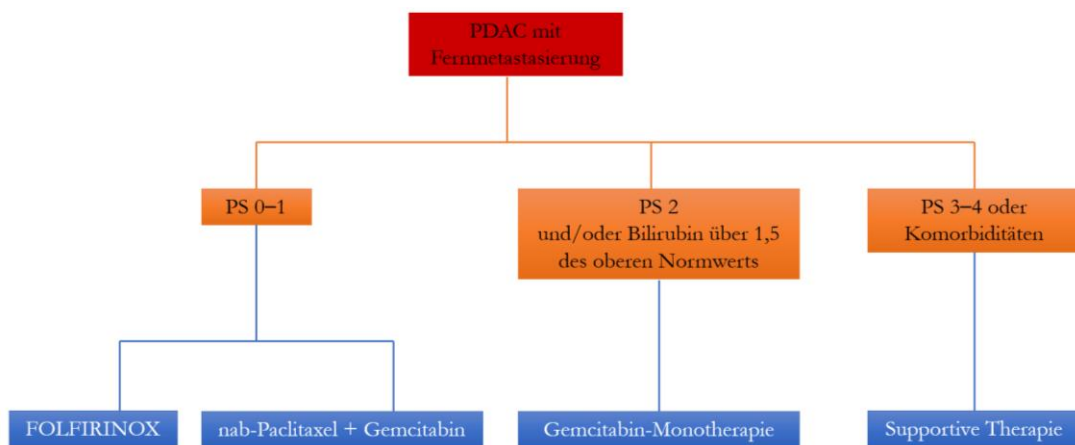


Abbildung 3: Palliative medikamentöse Therapie des PDACs Schematische Darstellung der palliativen medikamentösen Therapie des PDACs nach der Leitlinie der European Society for Medical Oncology zum Pankreaskarzinom (Ducreux et al. 2015). PS = Performance-Status nach *eastern cooperative oncology group*.

Für die adjuvante Radiochemotherapie von resektablen, lokal fortgeschrittenen Tumoren ohne Fernmetastasierung konnte kein Vorteil gegenüber der alleinigen Chemotherapie gezeigt werden und wird daher nicht empfohlen. Die kombinierte Radiochemotherapie kann jedoch bei nicht resektablen, lokal fortgeschrittenen Tumoren ohne Fernmetastasierung zum Einsatz kommen, um eine Resektabilität des Tumors zu erreichen (Neoptolemos et al. 2001; Kleger et al. 2014).

Aktuelle Forschungsarbeiten zielen auf die Entwicklung und Etablierung neuer personalisierter Therapieansätze, die zu einer Lebensverlängerung und Verbesserung der Lebensqualität für Patientinnen und Patienten mit Pankreaskarzinom führen könnten. Der Fokus liegt dabei auf der molekularen Subtypisierung sowie der zielgerichteten Therapie in Bezug auf genetische Aberrationen, Veränderungen des Epigenoms sowie der Zusammensetzung des

Stromas und der Interaktion mit dem Immunsystem (therapeutische Stratifizierung) (Ying et al. 2016).

1.5 Molekulare Subtypen des PDACs

Molekulare intra- und intertumorale Heterogenität und Resistenzmechanismen führen häufig zum Scheitern aktueller und neuer Therapieansätze des PDACs (Waddell et al. 2015). Molekulare Subtypisierungen von Patientinnen und Patienten können bei dieser Problematik entscheidend dazu beitragen zielgerichtete individualisierte Therapieansätze auszuwählen und somit das Gesamtüberleben der Patientinnen und Patienten zu verbessern (Collisson et al. 2011; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016; Ying et al. 2016). Anhand von genomischen Analysen großer Patientengruppen konnten in den letzten zehn Jahren Subtypen definiert werden, die wesentlich zur Entwicklung personalisierter, therapeutischer Herangehensweisen beitragen sollen (Collisson et al. 2011; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016).

Collisson et al. definierte 2011, anhand von Transkriptionsprofilen, drei verschiedene Subtypen des PDACs. Der klassische Subtyp ist charakterisiert durch hohe Expression von adhäsionsassoziierten und epithelialen Genen sowie durch ein verlängertes Gesamtüberleben nach operativer Tumorentfernung. Der quasi-mesenchymale Subtyp weist hingegen eine hohe Expression von mesenchymalen Genen und ein kürzeres Gesamtüberleben nach Tumoresektion auf als der klassische Subtyp. Der exokrine Subtyp ist durch eine hohe Expression von Genen der Verdauungsenzyme gekennzeichnet (Collisson et al. 2011; Ying et al. 2016). In humanen und murinen Zelllinien konnten sowohl der klassische als auch der quasi-mesenchymale Subtyp nachgewiesen werden. Zudem konnten Subtyp-spezifische Charakteristika definiert werden, die als prognostische und therapeutische Indikatoren fungieren (Collisson et al. 2011).

Waddell et al. definierte 2015 durch genomische Analysen von 100 Patientinnen und Patienten mit primärem PDAC vier Subtypen, basierend auf der Häufigkeit und Verteilung struktureller Variationen und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Dabei konnten Alterationen in Onkogenen wie *KRAS* und Tumorsuppressorgenen, wie *TP53*, *CDKN2A* und *small mothers against decapentaplegic 4* bestätigt werden. Der instabile Subtyp ist hierbei vor allem durch eine Vielzahl struktureller Variationen in DNA Reparaturgenen gekennzeichnet (Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016). Bei *BRC A1* und *2* mutierten Patientinnen und Patienten resultieren hieraus therapeutische Konsequenzen mit einem verbesserten Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapeutika in klinischen Studien (Pihlak et al. 2017; Rebelatto et al. 2019; Peretti et al. 2021).

Im Jahr 2016 wurde durch Bailey et al. das Genom von 456 PDACs analysiert, woraus 32 signifikant mutierte Gene in zehn molekulare Signalwege, auch bekannt als *bailey-circle* (Bailey-Kreis), eingeteilt wurden. Diese Signalwege umfassen (1) aktivierende *KRAS* Mutationen in 92 %, (2) Alterationen von Zellzyklus regulierenden Genen, betreffend den Übergang der Gap-1-Phase (G1) in die Synthese-Phase (S) in 78 %, (3) den *transforming growth factor β*

Signalweg in 47 %, (4) Histonmodifikationen in 24 %, (5) den SWitch/Sucrose-Non-Fermentable-Komplex (SWI/SNF-Komplex) in 14 %, (6) den DNA-Reparatur-Signalweg, auch als „BRCAness-Subtyp“ bezeichnet, mit Keimbahnmutationen in 5 % und somatischen Mutationen in 12 %, (7) WNT-Signaldefekte in 5 %, (8) Alterationen in Ribonukleinsäure(RNA)-Prozessierungsgenen in 16 %, (9) sowie Veränderungen des NOTCH-Signals und (10) Deregulierungen im SLIT-ROBO-Signalweg (Bailey et al. 2016). Zudem knüpft Bailey et al. (2016) an die drei Subtypen von Collisson et al. (2011) an. Durch Genexpressionsanalysen von primären PDACs definiert Bailey et al. (2016) vier Subtypen mit unterschiedlichen histopathologischen Charakteristika und Gesamtüberlebensraten. Erstens den squamösen Subtyp in Analogie zum quasi-mesenchymalen Subtyp, welcher einen unabhängig schlechten prognostischen Faktor mit kürzerem medianen Gesamtüberleben darstellt. Zweitens den Pankreasvorläufer-Subtyp, in Analogie zum klassischen Subtyp, drittens den abweichend endokrin-exokrin differenzierten Subtyp in Analogie zum exokrinen Subtyp. Sowie viertens den immunogenen Subtyp, der mit signifikanter Immuninfiltration assoziiert ist und vermutlich ein Artefakt darstellt, als Ergänzung zu den drei Subtypen von Collisson et al. (2011) (Bailey et al. 2016). Jüngste Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass eine Verbesserung der Prognose und des Therapieansprechens des Pankreaskarzinoms nur durch eine molekulare Therapiestratifizierung erreicht werden kann, die die molekularen Charakteristika des Pankreaskarzinoms bei der Therapieentscheidung berücksichtigt (Collisson et al. 2011; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016; Ying et al. 2016).

1.6 *ATM* Mutation im PDAC und zielgerichtete Therapie

Einer der molekularen Subtypen des Pankreaskarzinoms mit potenzieller Therapie-prädiktiver Relevanz ist der „BRCAness Subtyp“. Dieser bezieht sich auf genetische Alterationen in DNA-Reparatur-Signalwegen (Kapitel 1.5). Dazu zählen neben Keimbahnmutationen oder sporadischen Mutationen des *BRCA* Tumorsuppressorgens auch Veränderungen in weiteren DNA-Reparaturmechanismen (Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016). Hierzu gehört *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), eine Serin-Proteinkinase, die physiologisch bei DNA-Doppelstrangbrüchen über den MRE11-RAD50-NBS1-Komplex rekrutiert wird und über Phosphorylierung nachfolgender Effektorproteine Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose initiieren kann (siehe Abbildung 4). Zu diesen Effektorproteinen gehören u. a. p53, Checkpoint-Kinase-2 und BRCA1 (Lavin und Kozlov 2007; Blasius und Bartek 2013; Shiloh und Ziv 2013; Choi et al. 2016).

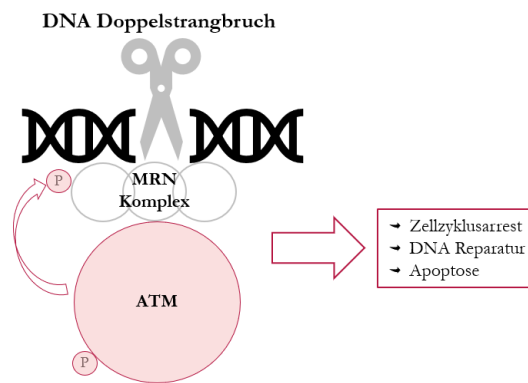


Abbildung 4: Funktionen von ATM Gekürzte, schematische Darstellung der Funktionen des DNA-Reparaturproteins ATM nach Choi et al. (2016). MRN-Komplex = MRE11-RAD50-NBS1-Komplex, P = phosphoryliert

Genomanalysen konnten zeigen, dass Alterationen in *ATM* in 9-18 % der humanen Pankreaskarzinome auftreten (Russell et al. 2015). Zudem sind im PDAC Keimbahnmutationen von *ATM* häufiger vorzufinden als Keimbahnmutationen in *BRC A1* und *BRC A2* (Perkhofer et al. 2020). Genetische Alterationen von *ATM* im PDAC gehen mit einem deutlich verkürzten progressionsfreien und Gesamtüberleben betroffener Patientinnen und Patienten einher (Russell et al. 2015; Perkhofer et al. 2017). Transgene Mäuse mit konditionaler (*p48-Cre*) Expression von konstitutiv aktivem *Kras^{G12D}* und homozygoter oder heterozygoter *Atm*-Defizienz wurden durch Russell et al. (2015) und Perkhofer et al. (2017) charakterisiert und mit *KC*-Mäusen verglichen. Der Verlust von *Atm* führte hierbei zu einer schnelleren Tumorprogression und einer Verkürzung des Gesamtüberlebens. Bereits zehn Wochen alte Mäuse mit *Atm*-Defizienz wiesen mehr ADM- und PanIN-Läsionen auf als *KC*-Mäuse. Außerdem zeigte sich eine stärkere Metastasierungsrate im Vergleich zu *KC*-Mäusen (Russell et al. 2015; Perkhofer et al. 2017)

Die funktionelle Bedeutung der ATM Kinase für DNA Reparaturvorgänge eröffnet zielgerichtete therapeutische Möglichkeiten in Bezug auf platinhaltige Chemotherapeutika sowie Poly(ADP-Ribose)-Polymerase(PARP)-Inhibitoren. Zwar konnte bei genetischen Alterationen in *ATM*, im Gegensatz zu *BRC A1*, kein subtyp-spezifischer Vorteil von platinhaltigen Chemotherapeutika gezeigt werden (Waddell et al. 2015; Gout et al. 2020), jedoch war eine Therapie mit dem PARP-Inhibitor Olaparib in Kombination mit Gemcitabin bei *Atm*-Defizienz *in vivo* sehr effizient und führte zur Stabilisierung des Tumorwachstums (Perkhofer et al. 2017). Diese Inhibition von DNA-Reparatur-Signalwegen in Krebszellen mit bereits vorhandenem Defekt in einem anderen DNA-Reparatur-Signalweg wird als synthetische Letalität bezeichnet (Curtin 2012). Allerdings zeigte die Therapie mit dem PARP-Inhibitor Olaparib eine frühe Resistenzbildung sowie eine zunehmende Toxizität bei Dosissteigerung (Curtin 2012; Perkhofer et al. 2017; Roger et al. 2020). Eine Dreifachinhibition der DNA-Reparatur-Effektoren PARP, *ataxia teleangiectasia and rad-3 related* und DNA-abhängige-Proteinkinase-katalytische-Untereinheit konnte zu einer Reduktion dieser Resistenzbildung führen. Zudem konnte durch Kombination der Inhibitoren die Dosis der einzelnen Komponenten

reduziert und somit die Toxizität bei gleicher Therapiepotenz gesenkt werden (Gout et al. 2020; Roger et al. 2020). Im Folgenden veröffentlichte Roger et al. (2020) eine präklinische, Placebo-kontrollierte Studie zur Testung eben genannter Dreifachinhibition nach Induktionstherapie mit der Chemotherapie-Kombination FOLFIRINOX im orthotopen Mausmodell mit Pankreastumorzellen von *Atm*-defizienten *KC* Mäusen. Im Vergleich zur FOLFIRINOX Monotherapie und der Placebogruppe zeigte sich hierbei ein signifikant verlängertes progressionsfreies und Gesamtüberleben sowie ein Rückgang der Lebermetastasierung (Gout et al. 2020; Roger et al. 2020). Bei Patientinnen und Patienten mit metastasiertem PDAC mit *BRC1* Keimbahnmutation konnte in einer Phase III Studie (POLO-Studie) bereits ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben unter Olaparib Behandlung gezeigt werden (Golan et al. 2019; Roger et al. 2020). Aktuelle Therapieansätze in Hinblick auf synthetische Letalität könnten also in Zukunft zu einer Verbesserung der Prognose von PDAC-Patientinnen und Patienten mit genetischen Alterationen in DNA-Reparaturgenen beitragen.

1.7 EZH2 Überexpression im PDAC und aktuelle Therapieansätze

Neben genetischen Alterationen, die zu der Tumorerogenität beitragen, spielen in der Pathophysiologie des PDACs ebenso epigenetische Alterationen eine wichtige Rolle (Hessmann et al. 2017; Lomberk et al. 2018). Epigenetik umfasst Prozesse der Genexpressionkontrolle, die nicht auf Veränderungen der DNA Sequenz zurückzuführen sind (Roy et al. 2014). Diese Alterationen können durch unterschiedliche Mechanismen, wie z. B. Chromatinumstrukturierungen erfolgen (Hessmann et al. 2017). Das Chromatin kann als Heterochromatin vorliegen, wodurch die Transkription von Genen unterbunden wird oder als Euchromatin, welches die offene Form darstellt in der Transkription möglich ist (Roy et al. 2014). Die funktionelle Untereinheit des Chromatins stellt das Nukleosom dar, in der ca. 147 Basenpaare (bp) der DNA um ein Histon-Oktamer, bestehend aus je zwei Histonen von Histon 2A, Histon 2B, Histon 3 (H3) und Histon 4, gewickelt werden (Margueron und Reinberg 2011). Die Regulation der Chromatin-Konformation kann durch DNA Methylierung, Chromatin-Umstrukturierungen und Histon Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung erfolgen (Roy et al. 2014). Die Trimethylierung von H3 an Lysin 27 (H3K27me3) führt zur Geninaktivierung (Grzenda et al. 2011). Diese wird durch den Polycomb-Repressor-Komplex 2 (PRC2), bestehend aus vier Untereinheiten, katalysiert (Lomberk et al. 2008). Der PRC2 vermittelt die Inaktivierung von Zielgenen, die u. a. in Zellzyklusregulierung, Seneszenz- und Differenzierungsprozesse involviert sind (Sauvageau und Sauvageau 2010; Chang und Hung 2012). Die katalytische Untereinheit, welche die Trimethylierung vermittelt, ist *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) (Cao et al. 2002). Von EZH2 sind verschiedene Alterationen bekannt, wobei es in soliden Tumoren hauptsächlich überexprimiert ist (Völkel et al. 2015). Diese Überexpression von EZH2 korreliert mit einer hohen Therapieresistenz gegenüber etablierten Chemotherapeutika (Ougolkov et al. 2008), fortgeschrittenen Tumorstadien und

einer schlechten Prognose (Kim et al. 2015). Zudem sind hohe EZH2-Level vorwiegend in dedifferenzierten Formen des PDACs zu finden (Ougolkov et al. 2008; Avan et al. 2012). Nach EZH2-Verlust im PDAC *in vitro* und *in vivo* konnte zudem ein Subtypenwechsel vom squamösen zum klassischen PDAC Subtyp nachgewiesen werden (Patil et al. 2020). Durch Inhibierung von EZH2 in präklinischen Studien konnten Tumoren gegenüber Chemotherapeutika wieder sensibilisiert werden (Ougolkov et al. 2008; Avan et al. 2012). Der Inhibitor EPZ-6438 (Tazemetostat), welcher spezifisch die Methyltransferaseaktivität von EZH2 hemmt, erhielt im Januar 2020 eine beschleunigte Zulassung für die Therapie des epitheloiden Sarkoms sowie des follikulären Lymphoms (Hoy 2020; U.S. FDA 2020a; U.S. FDA 2020b). Die Studie NCT01897571, in welcher Tazemetostat zugelassen wurde, umfasste zudem die Untersuchung des Wirkstoffes in fortgeschrittenen, soliden Tumoren inklusive PDAC (Phase I) (Hessmann et al. 2017; Epizyme, Inc. 2021). Wegen der starken kontextabhängigen Regulierung von Zielgenen durch EZH2 (Chen et al. 2017; Hessmann et al. 2017) ist es allerdings wahrscheinlich, dass nur bestimmte Patientengruppen von einer solchen EZH2 Inhibition profitieren werden.

1.8 Interaktionen von ATM mit chromatin-regulatorischen Proteinen

Neben bereits beschriebenen Funktionen von ATM in Bezug auf DNA-Reparaturmechanismen, integriert und reguliert die Serin-Proteinkinase auch unterschiedliche Signalwege, welche für die Homöostase der Zelle entscheidend sind (Shiloh und Ziv 2013; Cremona und Behrens 2014; Russell et al. 2015). So hat der Verlust von *Atm* auch Einfluss auf die PDAC Biologie, wie z. B. als Auslöser von genomischen Umstrukturierungen (Perkhofer et al. 2017) oder als Impuls für epithelial-mesenchymale Transition (Russell et al. 2015). Außerdem moduliert ATM das Chromatin, um DNA-Reparaturmechanismen zu initiieren (Shiloh und Ziv 2013; Kwon et al. 2015). Ebenso rekrutiert die Serin-Proteinkinase Teile von PRC1 und PRC2 bei DNA-Doppelstrangbrüchen, welche eine Geninaktivierung, des zu reparierenden Bereichs initiieren und somit die richtigen Bedingungen für die DNA-Reparatur schaffen (Kakaroukas et al. 2014; Berger et al. 2017).

Weitere Auswirkungen der *ATM*-Defizienz auf die Zellintegrität, konnten bei Untersuchungen der genetischen Krankheit Ataxia-Teleangiectatica (A-T), auch Louis-Bar-Syndrom genannt, gezeigt werden. A-T ist eine neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (Sedgwick und Boder 1960; Biton et al. 2008). Der Verlust von *Atm* hat verschiedene Auswirkungen auf die Zellhomöostase. Bei A-T kann die Histondeacetylase HDAC4, aufgrund des fehlenden ATMs vom Zytoplasma in den Zellkern übertreten, wodurch wichtige Gene für die neuronale Funktion inaktiviert werden. Dies führt letztlich zum Tod der neuronalen Zelle (Li et al. 2012). Außerdem konnte durch Li et al. (2013) gezeigt werden, dass ATM durch posttranslationale Modifikationen zu einer Destabilisierung onkogener Proteine, wie z.B. der Histonmethyltransferase EZH2 führt. Die *Atm*-Defizienz führte im Mausmodell zu hoher EZH2 Expression sowie zu starker, genomweiter Trimethylierung von H3K27. Als

Konsequenz führte die Hemmung von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz zur Reduktion des Untergangs von Purkinjezellen und zu einer Reduktion von Verhaltensauffälligkeiten (Li et al. 2013). Dies deutet auf die Wichtigkeit epigenetischer Dysregulationen im Kontext der *ATM*-Defizienz hin.

1.9 Hypothese und Ziele der Arbeit

Auch im PDAC spielt, wie bereits in Kapitel 1.7 beschrieben, die Überexpression von EZH2 eine prognoseentscheidende Rolle. Zudem ist die Differenzierung von Patientengruppen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf eine EZH2 Inhibierung ansprechen, von entscheidender Bedeutung. In unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe von Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des Universitätsklinikums Ulm (UKU) und der Arbeitsgruppe von Professor Dr. med. Elisabeth Heßmann der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) konnten bereits eine gesteigerte Expression und Aktivität von EZH2 in *Atm*-defizienten murinen Pankreaskarzinomzellen gezeigt werden. Auf dieser Grundlage der beschriebenen Arbeiten postulieren wir, dass die verstärkte Expression von EZH2 zu den tumorprogressionsfördernden Eigenschaften *ATM*-defizienter Pankreaskarzinomsubtypen beiträgt und die Inhibition von EZH2 somit eine vielversprechende therapeutische Option spezifisch in *ATM*-defizienten Pankreaskarzinomsubtypen darstellen könnte. Basierend auf dieser Hypothese möchte ich unter Verwendung eines transgenen Mausmodells in meiner Doktorarbeit die funktionelle Bedeutung der EZH2 Expression in der Entstehung und Progression *Atm*-defizienter Pankreaskarzinome im transgenen Mausmodell untersuchen.

Die Ziele meiner Doktorarbeit lauten daher erstens die Charakterisierung der Konsequenzen des EZH2-Verlusts auf die Entstehung und Progression *Atm*-defizienter PDAC Subtypen *in vivo* und zweitens die Charakterisierung des Einflusses des EZH2-Verlusts auf die Progression *Atm*-defizienter PDAC Zellen *in vitro*.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Größe	Firma	Firmensitz
Abdeckfolie für 96-Well-Platten		Applied Bio-systems	Carlsbad (USA)
Alkoholisches Flächendesinfektionsmittel		DesoMed	Freiburg
Autoklavenband		gke	Waldems
Casting Frame		Bio-Rad	Hercules (USA)
Combitips für die Multipipette	5 ml	Eppendorf	Hamburg
Deckgläschen	32x24mm	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Descosept Sensitive Wipes		Dr. Schumacher GmbH	Malsfeld-Beiseförth
Einbettkassetten für Biopsien		Carl Roth	Karlsruhe
Einweghandschuhe, Latex	S	Semperguard	Northamptonshire (UK)
Einweghandschuhe, Nitril	S	LLG Lab-ware GmbH	Meckenheim
FACS Röhrchen	5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Falkons	15 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Falkons	50 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Homogenisierstab		Bio-Rad	Hercules (USA)
Intransparente Multiwellplatten	96-Well-Platte für Bradford	Sarstedt	Nümbrecht
Kamm für Western Blot		Bio-Rad	Hercules (USA)
Kryoröhrchen	5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Labortücher		Kimberly-Clark	Surrey (UK)
Microvette K3E	500 µl	Sarstedt	Nümbrecht
Mikroplatte Cell Star 96 Well		Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Mikrotomklinge S35		Feather	Osaka (Japan)
Multiwellplatten	96-Well-Platte für PCR	Applied Bio-systems	Carlsbad (USA)
Multiwellplatten	6-Well-Platte	Sarstedt	Nümbrecht

Bezeichnung	Größe	Firma	Firmensitz
Nitrocellulosemembran		Bio-Rad	Hercules (USA)
Objektträger Superfrost Plus		Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Parafilm M		Pechiney Plastic Packaging	Chicago (USA)
Petrischalen	6 cm	Sarstedt	Nümbrecht
Petrischalen	10 cm	Sarstedt	Nümbrecht
Pipetten (serologische)	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Pipetten (serologische)	5 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Pipetten (serologische)	10 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Pipetten (serologische)	25 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Pipetten (serologische)	50 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Pipettenspitzen	1000 µl	StarLab	Hamburg
Pipettenspitzen	200 µl	StarLab	Hamburg
Pipettenspitzen	10 µl	StarLab	Hamburg
Polystyrol Röhrchen mit Schraubverschluss	12 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Reagiergefäße	0,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reagiergefäße	1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reagiergefäße	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reinigungstücher - Kimtech Science		Kimberly-Clark- Professional	
Skalpell		Dahlhausen	Köln
Slide-Halter		Ted Pella Inc.	Redding (USA)
Spritzen	1 ml	BD Plastipak	Madrid (Spanien)
Sterile Filter	100 µm	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Transferfilterpapier		Bio-Rad	Hercules (USA)
Western blot Glasscheiben groß und klein		Bio-Rad	Hercules (USA)
Western Blot Mebranroller		Bio-Rad	Hercules (USA)
Zellkulturflasche	T75	Sarstedt	Nümbrecht
Zellkulturflasche	T25	Sarstedt	Nümbrecht
Zellscharber 25cm		Sarstedt	Nümbrecht

2.2 Laborgeräte

Tabelle 2: Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Firma	Firmensitz
Abzug "Airflow Control EN 14175"	Weidner Laboreinrichtungs GmbH	Hardeggen
Agarosegel Elektrophoresekammer	Peqlab, Fisher Scientific	Scherte
Analysewaage "PCB M Memory"	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Arium Pro Reinstwasser Systeme	Sartorius	Göttingen
Automatische Gewebeeinfiltration "TP 1020"	Leica	Wetzlar
ChemoCam	Intas Science Imaging	Göttingen
CO ₂ Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Cryo Cooler "Mr Frosty"	Nalgene	Rochester (USA)
Drucker "Ecosys P3125dn"	Kyocera	Kyoto (Japan)
Durchflusszytometer „FACSCanto II“	BD Biosciences	San José (USA)
Eingießmaschine "EG 1150H"	Leica	Wetzlar
Eismaschine "AF 80"	Scotsman	Vernon Hills (USA)
Gelelektrophorese "PowerPac Basic Power Supply"	BioRad	Hercules (USA)
Heizblock "Dri Block, DB 2A"	Techne	Staffordshire (UK)
Heizplatte	Leica	Wetzlar
Kühlplatte HistoCore Arcadia C	Leica	Wetzlar
Laborautoklav „Fedegari FVA/2 A1	tecnomara	Fernwald
Lumineszenz Messgerät "LUMO"	Autobiolabtec Instruments Co. Ltd	Zhengzhou City (China)
Magnetrührer "RH B S000"	Ika-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Mikrotom "RM2265"	Leica	Wetzlar
Mikrowelle "NN-E201W"	Panasonic	Kadoma (Japan)
MSA Minischüttler	Ika-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Multipette plus	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
NanoPhotometer P-360	Intas Science Imaging	Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Assistent	Sondheim vor der Röhn
PCR-Cycler "Step one plus"	Applied BioSystems, Thermo Fisher	Foster City (USA)

Gerätebezeichnung	Firma	Firmensitz
pH-Meter "Five Easy-Plus FEP20"	Mettler Toledo	Columbus (USA)
Photometer "PHOmo"	Autobiolabtec Instruments Co. Ltd	Zhengzhou City (China)
Pipetboy acu 2	Integra Biosciences	Biebertal
Pipetten "Reference" 0,1–2,5µ, 0,5–10µl, 50–200µl, 10–100µl, 2–20µl, 100–1000µl)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Präzisionswaage PCB	Kern & Sohn GmbH	Balingen
PSU-20i Orbitalschüttelplattform	Grant Instruments	Cambridgeshire (UK)
Sequenza™ slide rack Halterung (Cadenza-System)	TED Pella Inc.	Redding (USA)
Shandon Coverplate Glasdeckplatten (Cadenza-System)	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Sicherheitswerkbank (S2020 - 1.2)	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Thermo Mixer "5436"	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Tischabsauger "Aspirator with trap flask, FTA-1"	Grant-bio, Fisher Science	Schwerte
Tischzentrifuge "Sprout"	Heathrow Scientific	Vernon Hills (USA)
Trockenschrank "UN55"	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach
Turbo-Blotter "Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems"	BioRad	Hercules (USA)
VacuuHandControl VHC ^{pro}	Vacuubrand	Wertheim
Vacuum Pumpe BVC Control	Vacuubrand	Wertheim
Wasserbad "WNB14"	Memmert	Schwabach
Mikroskope		
Lichtmikroskop "BX43" mit Kamera („SC180“)	Olympus	Shinjuku (Japan)
Lichtmikroskop „CKX 53“ mit Kamera	Olympus	Shinjuku (Japan)
Zentrifugen		
Große Kühl-Zentrifuge "Heraeus Multifuge X1R Centrifuge"	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Kleine Kühl-Zentrifuge "Perfect Spin 24R Refrigerated Microcentrifuge"	Peqlab, Fisher Scientific	Scherte
Kleine Zentrifuge "Perfect Spin 24Plus"	Peqlab, Fisher Scientific	Scherte
Gefriergeräte		
Gefrierschrank – 20°C	Liebherr	Bulle (Schweiz)

Gerätebezeichnung	Firma	Firmensitz
Gefrierschrank – 80°C	Sanyo electric	Moriguchi (Japan)
Gefriertruhe – 150°C	pHcbi	Etten-Leur (Niederlande)
Kühlschrank 4°C	Liebherr	Bulle (Schweiz)

2.3 Software

Tabelle 3: Software

Bezeichnung	Benutzung	Firma	Firmensitz
Adobe Illustrator	Bildbearbeitung	Adobe Systems	San José (USA)
BD FACSDiva	FACS-Messung	BD Bioscience	Franklin Lakes (USA)
CellSens	Lichtmikroskopie	Olympus	Shinjuku (Japan)
ChemoStar Imager 3.2	Chemielumineszenz	Intas Science Imaging Instruments	Göttingen
FACS Diva Software 6.1.3	Analyse Annexin- und Propodiodid-Färbung	BD Biosciences	San José (USA)
Fiji-Image J2	Auswertung/Quantifizierung der Immunhistochemie	Freeware	
FlowJo	FACS-Auswertung	Milteny Biotec	Gladbach
GraphPad PRISM® 8 für Windows	Datenverarbeitung	GraphPad Software, www.graphpad.com	San Diego (USA)
ImageLab	Auswertung Genotypisierungs PCR	BioRad	Hercules (USA)
Microsoft Office 365 für Windows	Textverarbeitung, Datenverarbeitung	Microsoft	Redmond (USA)
NanoPhotometer PVC-Viewer	RNA und DNA-Konzentrationsmessung	Intas Science Imaging	Göttingen
PHOmo AutoSoft	Protein-Konzentrationsmessung und MTT Auswertung	Autobio	Zhengzhou City (China)
Step One Plus Software v2.3	Quantitative Real Time-PCR	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)

2.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Acetacetat	J.T. Baker	Radnor (USA)
Acrylamid-Lösung, 30%	Appllichem	Darmstadt
Agarose	Nippon	Düren
Albumin bovine fraction V	Serva	Heidelberg
Annexin-V-Antikörper	Biolegend	San Diego (USA)
Annexin V Bindungspuffer	Biolegend	San Diego (USA)
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
β -Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Calciumchlorid	Merck	Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Citronensäure-Monohydrat	Carl-Roth	Karlsruhe
Complete 25x	Roche	Basel (Schweiz)
Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Dihydrat)	Carl-Roth	Karlsruhe
Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; Dihydrat)	Carl-Roth	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
DNA-Leiter Fast Gene 100 bp	Nippon	Düren
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Eosin Y	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Ethanol, 99% , unvergällt	TH. Geyer	Renningen
Ethanol, 99%, vergällt	Otto Fischar GmbH & Co.KG	Saarbrücken
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest	Nuaillé (Frankreich)
Formaldehyd (4%), gepuffert	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Glycerol	Carl-Roth	Karlsruhe
Glycin	Carl-Roth	Karlsruhe
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl-Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Carl-Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid (K ₂ Cl)	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Applichem	Darmstadt
Liberase Blendenzym 1	Roche	Basel (Schweiz)
Magnesiumchlorid	Merck	Darmstadt
MEM Amino Acids 50x (Aminosäurelösung)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
MEM NEAA 100x (Nicht essenzielle Aminosäurelösung)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Milchpulver	Carl-Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl-Roth	Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Natriumorthovanadat (NaO)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Natriumpyruvat 100 mM (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Natronlauge (NaOH)	Merck	Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht GmbH	Edermünde
Pen-Strep	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (nach Bradford)	Bio-Rad	Hercules (USA)
RNAse-freies Wasser	Braun	Melsungen
Roticlear	Carl-Roth	Karlsruhe
Rotimount-Kleber	Carl-Roth	Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Applichem	Darmstadt
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio-Rad	Hercules (USA)
Tris-HCl	Carl-Roth	Karlsruhe

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris Base)	Acros Organics / Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Triton X100	Carl-Roth	Karlsruhe
Trizol	Ambion	Kaufungen
Trypsin	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
Trypsin Inhibitor	Roche	Basel (Schweiz)
<i>Tween 20</i>	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂)	Carl-Roth	Karlsruhe
<i>Western lightning ECL plus</i>	Perkin Elmer	Waltham (USA)
<i>Western lightning ECL ultra</i>	Perkin Elmer	Waltham (USA)
Xylol	Chemsolute	Renningen

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Lagerung
Alkalischer-Lyse-puffer	NaOH	25mM	RT
pH = 12	EDTA	0,2mM	
Citrat Puffer	Citronensäure-Monohydrat	2,1g	4°C
pH = 6	Aqua dest.	1l	
Digestion-Puffer	Waschpuffer	15ml	4°C
	Liberase Blendenzym 1 (5mg in 1ml HBSS)	200µl	
	Trypsin Inhibitor	75µl	
Lämmli 5x	Tris-HCL pH 6,8	225mM	4°C
	Glycerol	50%	
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	5%	
	Dithioereitol (DTT)	100mM	
	Bromphenolblau	0,02%	
	β-Mercaptothanol	5%	
Laufpuffer 10x	Tris-Base	250 mM	RT
	Glycin	1.92 M	
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	1 % (w/v)	
Laufpuffer 1x	Laufpuffer 10x	100ml	RT
	Aqua dest.	900ml	
Lysepuffer	HEPES	50mM	-20°C
pH 7,5–7,9	Natriumchlorid (NaCl)	150mM	
	EGTA	1mM	

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Lagerung
	Glycerin	10%	
	Triton X100	1%	
	Natriumfluorid (NaF)	100mM	
	Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	10mM	
Milch, 5% in TBST	10g Milchpulver	10g	4°C für maximal 48h
	TBST	200ml	
Neutralisationspuffer pH = 4,1	Tris-HCL	40mM	RT
	Aqua dest.	100ml	
PB	Natriumphosphat monobasisch (NaH ₂ OP ₄)	2,4g	4°C
	Natriumphosphat dibasisch (NaH ₂ OP ₄)	11,31g	
	Aqua dest.	1l	
PBS	Natriumchlorid (NaCl)	40g	RT
	Kaliumchlorid (KCl)	1g	
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1g	
	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	3,8g	
	Aqua dest.	5l	
PBST	PBS	999ml	RT
	<i>Tween 20</i>	1ml	
Sammelgelpuffer "Stock" pH = 6,8	Tris-Base	0,5M	4°C
	SDS	0,40%	
Sammelgelpuffer "ready to use"	Sammelpuffer "Stock"	25ml	4°C
	Aqua dest.	59ml	
	Acrylamit	16ml	
Solubilisierungslösung	HCl 100mM		
	Triton X100 in Isopropanol	10%	
TBE 5x	Tris-Base	54g	4°C
	Borsäure	27,5g	-
	EDTA	20ml	-
	Aqua dest.	1l	-
TBS	Tris-Base	121,4g	RT
pH = 7,4–7,6	Natriumchlorid	400,31g	
	Aqua dest.	5l	
TBST	TBS	999ml	RT

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Lagerung
	<i>Tween</i> 20	1ml	
TE-Puffer	Tris-Base	12,1g	RT
pH = 9	EDTA	3,7g	
	Aqua dest.	1l	
Trenngelpuffer "ready to use" 7,5%	Trenngelpuffer "Stock"	25ml	4°C
	Aqua dest.	45ml	
	Acrylamid	25ml	
	Glycerol	5ml	
Trenngelpuffer "ready to use" 10%	Trenngelpuffer "Stock"	25ml	4°C
	Aqua dest.	36,7ml	
	Acrylamid	33.3ml	
	Glycerol	5ml	
Trenngelpuffer "ready to use" 15%	Trenngelpuffer "Stock"	25ml	4°C
	Aqua dest.	20ml	
	Acrylamid	50ml	
	Glycerol	5ml	
Trenngelpuffer "Stock"	Tris-Base	1,5M	4°C
pH = 8,8	SDS	0,40%	
Turbo-Blot-Puffer	5x Turbo Blot Puffer (BioRad)	200ml	
	Ethanol	200ml	RT
	Aqua dest.	600ml	
Wasch-Puffer	HBSS	770ml	4°C
pH = 6	HEPES 1M	3,3ml	
	MEM Amino Acids 50x	20ml	
	MEM NEAA 100x	10ml	
	Natriumpyruvat 100M	10ml	
	Magnesiumchlorid 200mM	135µl	
	Calciumchlorid 100mM	80µl	
	Natriumcitrat 0,68M, pH = 7,6	10ml	
	Glycerol	2,1ml	
	Aqua dest.	1000ml	
WCL-Lysepuffer	Lysepuffer	500µl	4°C
	Complete 25x	20µl	
	Natriumorthovanadat (NaO)	5µl	
	Natriumfluorid (NaF)	5µl	
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	5µl	

2.6 Inhibitoren

Tabelle 6: Pharmakologische Inhibitoren

Inhibitoren	Firma	Bestellnummer	Firmensitz	Lösungsmittel
EPZ-6438 (Tazemetostat) 1mM	ChemieTek	CT-EPZ438	Indianapolis (USA)	DMSO
Staurosporin	CellSignaling	9953	Cambridge (UK)	DMSO

Tabelle 7: Material Knockdown

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
siLentFect Lipid	Bio-Rad	Hercules (USA)
siRNA <i>Ezh2</i> (AM 16704)	Ambion	Carlsbad (USA)

2.7 Kits

Tabelle 8: Kits

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
DAB-Peroxidase-Substrat-Kit	Vector Laboratories	Burlingame (USA)
DNeasy-Blood-&-Tissue-Kit	QIAGEN	Venlo (Niederlande)
iScript™ cDNA Synthese Kit	Bio-Rad	Hercules (USA)
iTaq-Universal-SYBR-Green-Supermix	Bio-Rad	Hercules (USA)
KAPA-Genotypisierung-Mastermix	Kapa Biosystems	Cape Town (Südafrika)
M.O.M Basic Kit	Vector Laboratories	Burlingame (USA)
Midori Green Direct	Nippon Genetics	Düren
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza	Basel (Schweiz)
Trans-Blot Turbo RTA Midi Nitrocellulose Transfer Kit	Bio-Rad	Hercules (USA)
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Maus IgM)	Vector Laboratories	Burlingame (USA)
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Kaninchen IgG)	Vector Laboratories	Burlingame (USA)

2.8 Antikörper

Tabelle 9: Primärantikörper Western Blot

Name	Artikelnummer	Spezies	Verdünnung	Firma	Firmensitz
α SMA	M0851	Maus	1:1000	DAKO	Glostrup (Dänemark)
ATM	ab78	Maus	1:1000	abcam	Cambridge (UK)
β -actin (Horseradish-Peroxidase-konjugiert)	A3854		1:40000	Sigma	St. Louis (USA)
Caspase3, cleaved	9661	Kaninchen	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
ERK 1/2	9102	Kaninchen	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
EZH2	5246	Kaninchen	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
Histone 3	ab1791	Kaninchen	1:1000	abcam	Cambridge (UK)
Histone 3 (trimethyl K27)	9733	Kaninchen	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)

Tabelle 10: Sekundärantikörper Western Blot

Spezies	Verdünnung	Firma	Firmensitz
Maus (Horseradish-Peroxidase-konjugiert)	1:6500	Cell Signaling	Cambridge (UK)
Kaninchen (Horseradish-Peroxidase-konjugiert)	1:6500	Cell Signaling	Cambridge (UK)

Tabelle 11: Primärantikörper Immunhistochemie

Bezeichnung	Artikelnummer	Spezies	Verdünnung	Firma	Firmensitz
ATM	ab78	Maus	1:200	abcam	Cambridge (UK)
Ki67	RM-9105-SO	Kaninchen	1:600	Neo Markers	Fremont (USA)

Tabelle 12: Sekundärantikörper Immunhistochemie

Spezies	Verdünnung	Firma	Firmensitz
Maus	1:200	Biozol	Eching
Kaninchen	1:200	Biozol	Eching

2.9 Primer

Tabelle 13: Primer für Genotypisierung

Gen (murin)	Orientierung	Sequenz
<i>Atm</i>	P1 (ATMgF86723)	5' ATCAAATGTAAAGGCGGCTTC
	P2 (ATM BAC 13)	5' CATCCTTTAATGTGCCTCCCTTCGCC
	P3 (ATM BAC 7)	5' GCCCATCCCGTCCACAATATCTCTGC
<i>p48Cre</i>	Forward-Sequenz	5' TGCTGTTTCACTGGTTATGCGG
	Reverse-Sequenz	5' TTGCCCTGTTCCTACTATCCAG
<i>Ezh2</i>	Forward-Sequenz	5' CTGCTCTGATGGCAACTCC
	Reverse-Sequenz	5' TTATTCATAGAGCCACCTGG
<i>Kras</i>	Forward-Sequenz	5' AGCTAGCCACCATGGCTTGAG-TAAGTCTGCG
	Reverse-Sequenz	5' CCTTTACAAGCGCACGCAGACTGTAGA
<i>1 lox Kras^{G12D}</i>	Forward-Sequenz	5' GGGTAGGTGTTGGGATAGCTG
	Reverse-Sequenz	5' TCCGAATTCAGTGACTACAGATGTACAGAG

Tabelle 14: Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Spezies	Orientierung	Sequenz
<i>Atm</i>	murin	Forward-Sequenz	GAAACTGACTATCTGCACATACAAG
		Reverse-Sequenz	GCACTGAAATCATTTGGCCTG
<i>Ezh2</i>	murin	Forward-Sequenz	CAACCCGAAAGGGCAACAAA
		Reverse-Sequenz	ACCAGTCTGGATAGCCCTCT
<i>Rpo1</i>	human/	Forward-Sequenz	TGGGCAAGAACACCATGATG
	murin	Reverse-Sequenz	AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT

3 Methoden

3.1 Mausmodell

Tabelle 15: Mausmodell

Bezeichnung	<i>Atm</i>	<i>Ezh2</i>	<i>Kras</i> ^{G12D}	<i>p48Cre</i>
<i>KATMC</i>	<i>flox/flox</i>	+ / +	mutiert / +	positiv
<i>KATMEC</i>	<i>flox/flox</i>	<i>flox/flox</i>	mutiert / +	positiv

Zwei transgene Mausmodelle mit gemischtem Hintergrund wurden im European Neuroscience Institut und in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der UMG gezüchtet und gehalten. Die Bezeichnung der beiden untersuchten Mauslinien erfolgte anhand des genetischen Hintergrunds. Die Linie, welche durch eine heterozygote *Kras*^{G12D} Mutation sowie einen homozygoten Knockout (*flox/flox*) des *Atm* Gens gekennzeichnet war, wurde als *KATMC* Mauslinie bezeichnet. Verglichen wurde diese mit der Mauslinie, welche zusätzlich zur heterozygoten *Kras*^{G12D} Mutation und zum homozygoten Knockout (*flox/flox*) des *Atm* Gens, durch einen homozygoten Knockout (*flox/flox*) des *Ezh2* Gens gekennzeichnet war. Diese wurde als *KATMEC* Mauslinie bezeichnet (siehe Tabelle 15). Alle Merkmale wurden unter der Kontrolle von *p48Cre* pankreasspezifisch exprimiert. *KATMC* und *KATMEC* Mäuse wurden im März 2019 in folgende Kohorten unterteilt: finale Endpunkte (zwei Monate, drei Monate und sechs Monate) und eine Survival-Kohorte. Dabei wurde auf eine ausgeglichene Geschlechterverteilung geachtet, sodass jede Gruppe annähernd gleich viele Weibchen und Männchen beinhaltete. Die Mäuse wurden einmal wöchentlich gewogen und der Bauch hinsichtlich Raumforderungen abgetastet. Bei Gewichtsverlust $\geq 20\%$, Schmerzzeichen oder Aszites wurden die Mäuse durch Überdosierung von CO₂ und darauffolgende zervikale Dislokation geopfert. Es wurden Pankreas, Milz und ein Stück der Leber entnommen und gewogen sowie das relative Pankreasgewicht (Pankreasgewicht/Mausgewicht) berechnet. Ein Teil des Pankreas wurde in flüssigem Stickstoff zur Proteinanalyse eingefroren. Der andere Teil des Pankreas wurde zusammen mit Milz und Leber in 4%igem Formaldehyd für die Histologie konserviert. Außerdem wurde die Mausschwanzspitze zur Regentypisierung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz unter folgenden Aktenzeichen bewilligt: 33.9.43502-04-14/1634 und 33.9.43502-04-19/3085.

3.2 Gewinnung von Proteinlysaten aus Pankreastumorgewebe

Teile des Pankreastumors wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Gewinnung der Proteinlysate wurde der Pankreastumor in eine Petrischale auf Trockeneis überführt. Mit Hilfe eines Skalpell wurde ein 2–4 mm großes Stück des Tumors

abgeschnitten und in ein Reagiergefäß mit 500 µl des WCL-Lysepuffers auf Eis überführt. Der Lysepuffer (siehe Tabelle 5) wurde direkt vor Gebrauch mit 25xComplete, Natriumfluorid (NaF), Natriumorthovanadat (NaO) und Phenylmethylsulfonylfluorid angesetzt. Daraufhin wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines autoklavierten Homogenisierstabs im WCL-Lysepuffer homogenisiert und danach 10 s gevortext. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14000 *revolutions per minute* (rpm) und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Fettschicht wurde vorsichtig abgesaugt. Daraufhin wurden die Lysate in ein neues Reagiergefäß überführt und das Pellet verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, um die Lysate aufzureinigen. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte über den Bradford-Test. Anschließend wurden die Proteinlysate auf 1 mg/µl verdünnt, mit 5xLämmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lagerung der isolierten sowie der angesetzten Proteinlysate erfolgte bei -20 °C.

3.3 Genotypisierung

Mausschwanzbiopsien wurden zur DNA-Isolation und anschließender Genotypisierung verwendet. Zur Aufarbeitung der Mausschwanzbiopsien wurden die Biopsien zunächst 30 min bei 95 °C mit je 75 µl alkalischem Lysepuffer lysiert. Die Reaktion wurde auf Eis mit der gleichen Menge an Neutralisationspuffer gestoppt.

Zur Bestimmung von *p48Cre*, *Kras*-Mutation sowie *Atm*- und *Ezh2*-Knockout wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurden PCRBIO-DNA-Mix für *p48Cre* und *Kras* bzw. KAPA-Genotypisierungs-Mastermix für *Atm* und *Ezh2*, Primer und doppelt destilliertes Wasser mit der lysierten DNA gemischt (siehe Tabelle 16).

Daraufhin wurden die Proben im Thermozykler mit dem entsprechenden Programm amplifiziert (siehe Tabelle 17).

Tabelle 16: PCR-Ansätze

Reagenzien	PCR-Ansatz <i>Kras, p48Cre</i>	PCR-Ansatz <i>Atm</i>	PCR-Ansatz <i>Ezh2</i>
Mastermix	PCRBIO-DNA-Mix 6,25µl	KAPA-Genotypisierung Mastermix 6,25µl	KAPA-Genotypisierung- Mastermix 12,5µl
Primer	Forward-Primer Reverse-Primer Je 1 µl	Primer INT2s-5 Primer INT3s-2 Primer INT3As-2 Je 1 µl	Forward-Primer Reverse-Primer Je 1 µl
Doppelt destilliertes Wasser	4,25µl	3,75µl	6µl
DMSO	0	0	2,5µl
Genomische DNA	1µl	2µl	2µl

Tabelle 17: PCR Programme zur Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien

<i>Kras & p48Cre</i>	95 °C	2 min	
	95 °C	30 s	
	60 °C	30 s	29 Zyklen
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

<i>Ezh2</i>	95 °C	2 min	
	94 °C	30 s	
	56,6 °C	30 s	36 Zyklen
	72 °C	15 s	
	72 °C	5 min	

<i>Atm</i>	94 °C	5 min	
	94 °C	45 s	
	63 °C	45 s	35 Zyklen
	72 °C	45 s	
	68 °C	5 min	

Es erfolgte die Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels zur Bestimmung von *p48Cre* und *Kras* sowie die Herstellung eines 2%igen Agarosegels zur Bestimmung von *Atm* und *Ezh2*. Zur Herstellung des Gels wurde 1x Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (TBE-Puffer, siehe Tabelle 5) mit Agarosepulver in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich das Agarosepulver löste. Nach kurzem Abkühlen wurde 4 µl *midori green* pro 100 ml hinzugegeben. Pro Probe wurden 10 µl der amplifizierten DNA pro Tasche des Agarosegels geladen. Zur Bestimmung der DNA-Länge wurden DNA Standard als Marker sowie eine Positivkontrolle von heterozygoten Mäusen aufgetragen. Die Negativkontrolle enthielt doppelt destilliertes Wasser anstatt DNA. Für *Kras* und *p48Cre* lief das Gel bei 160 V für 30 min. Für *Atm* und *Ezh2* bei 100 V für 50 min. Die Auswertung erfolgte mittels Image-Lab-Software. Abbildung 5 zeigt eine repräsentative Genotypisierung von Mausschwanzbiopsien für *Atm*, *Ezh2*, *Kras* und *p48Cre*.

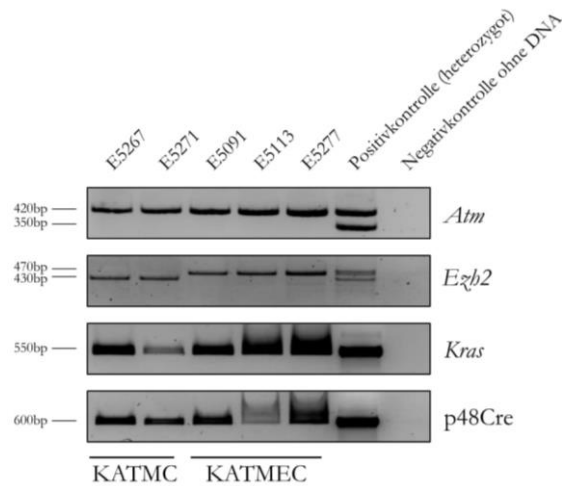


Abbildung 5: Genotypisierung Repräsentative Genotypisierung für zwei *KATMC* Mäuse (E5267 und E5271) und drei *KATMEC* Mäuse (E5091, E5113 und E5277) für *Atm* (*flox/flox* bei 420 bp), *Ezh2* (*flox/flox* bei 470 bp), *Kras* (550 bp) und *p48Cre* (600 bp). Positivkontrollen wurden für heterozygote *Atm*- und *Ezh2*-Defizienz sowie für *Kras*-Mutation und für *p48Cre* geladen. Die Negativkontrolle enthält den PCR-Ansatz mit doppelt destilliertem Wasser ohne DNA.

3.4 Histologie

3.4.1 Gewebeaufbereitung

Das entnommene Gewebe wurde 24–72 h in 4%igem Formaldehyd konserviert und daraufhin über die automatische Gewebeeinfiltration in Ethanol und im letzten Schritt in Xylol entwässert. Über die Eingießmaschine wurde das Gewebe in Paraffin gegossen und bis zum Schneiden bei 4 °C aufbewahrt. Die Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom 4 µm dick geschnitten und auf Objektträgern über Nacht bei 37 °C getrocknet.

3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die histologischen Schnitte in Schiffchen überführt und zweimal 10 min in *roticlear* entparaffiniert. Über die absteigende Alkoholreihe wurde das Gewebe rehydriert (zweimal 99 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Alkohol) und danach dreimal in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die histologischen Schnitte 6 min in Hämatoxylin gefärbt und danach 5 s in 0,2%igem Acetacetat inkubiert. Danach wurde 8 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und daraufhin 3 min in Eosin gefärbt. Nach kurzem Waschen in Leitungswasser, welches die Intensität der Färbung bestimmte, folgte die aufsteigende Alkoholreihe und viermal 10 min Inkubation in *roticlear*. Die Schnitte wurden mit Rotimount-Kleber und Deckgläschen eingedeckelt und unter dem Abzug über Nacht getrocknet. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mittels Lichtmikroskopie und Cell-Sens-Software.

3.4.3 Quantifizierung der Mikrometastasen von Pankreastumoren in der Leber

Zur Quantifizierung der Mikrometastasen von Pankreastumoren in der Leber wurden 4 µm dicke histologische Schnitte in drei Ebenen der Paraffinblöcke angefertigt. Der Abstand zwischen den Ebenen betrug 100 µm. Pro Ebene wurde eine HE-Färbung (siehe Kapitel 3.4.2) angefertigt. Die HE-Färbungen der Leber wurden daraufhin mittels Lichtmikroskopie auf Mikrometastasierungen untersucht.

3.4.4 Immunhistochemie

Zur Immunhistochemie wurden die histologischen Schnitte in Schiffchen überführt und zweimal 10 min in *roticlear* entparaffiniert. Über die absteigende Alkoholreihe wurde das Gewebe rehydriert (zweimal 99 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 %), dreimal in Leitungswasser gewaschen und je nach Antikörper in Citratpuffer oder Tris-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (TE-Puffer) überführt. Danach wurden die histologischen Schnitte in dem entsprechenden Puffer 5 min bei 800 W aufgekocht und darauffolgend 10 min bei 400 W geköchelt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 20 min auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Inkubation von 10 min mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂), um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu blockieren. Danach wurden die histologischen Schnitte mit 600 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 0,1 % *tween* 20 (PBST) in das Cadenza-System überführt. Anschließend wurden sie zweimal mit PBST gewaschen und mit 10 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBST (600 µl/ Schnitt) bei RT für eine Stunde inkubiert. Der zu entsprechende Primärantikörper (siehe Tabelle 11) wurde in 10 % BSA in PBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit 200 µl pro Schnitt inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte mit PBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper der entsprechenden Spezies (siehe Tabelle 12) bei RT für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wurde AB-Komplex (VECTASTAIN Avidin-Biotin-Komplex *horseradish peroxidase-linked* Kit, siehe Tabelle 8) auf die Schnitte gegeben und wieder für 1 h bei RT inkubiert. Der AB-Komplex wurde bereits 30 min vorher angesetzt, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Anschließend wurden die Schnitte mit 3',3 Diaminobenzidin(DAB)-Peroxidase-Substrat-Kit inkubiert und die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Länge unterschied sich je nach verwendetem Antikörper, wurde allerdings bei gleichem Antikörper konstant gehalten. Danach wurde 6 min mit Hämatoxylin gefärbt und 8 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe und viermal 10 min Inkubation mit *roticlear*. Die Eindeckelung erfolgte wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskopie, Cell-Sens-Software und Fiji-Image-J2-Software.

3.4.5 M.O.M.-Kit

Bei Verwendung von Primärantikörpern der Spezies Maus (hier ATM Antikörper der Firma Abcam) wurde bei Färbung von Mausgewebe das Mouse-On-Mouse(M.O.M.)-Kit genutzt.

Die ersten Schritte (Rehydrierung, Kochen in Citratpuffer, Abkühlen und Blockade mit 3%igem H_2O_2) erfolgten wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben. Es erfolgte die Überführung der histologischen Schnitte in das Cadenza System. Unspezifische Bindungen wurden daraufhin mit M.O.M.-Ig-Blocking-Reagenz für 1 h bei RT blockiert. Nach kurzer Inkubation der Schnitte mit M.O.M. *diluent* (Verdünnungsmittel) für 5 min wurde der Primärantikörper (ATM, abcam) in M.O.M. *diluent* verdünnt (1:200) und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte ebenso über Nacht bei 4 °C.

Am zweiten Tag wurde nach dreimal Waschen mit PBST M.O.M. biotinylierter Anti-Maus IgG Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben und 12 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der AB-Komplex nach 30 min Reifen auf die Schnitte gegeben und erneut 30 min inkubiert. Nach Inkubation mit DAB-Peroxidase-Substrat-Kit (30 s für ATM) erfolgten die gleichen Schritte, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben. Die Auswertung wurde mittels Lichtmikroskopie, Cell-Sens-Software und Fiji-Image-J2-Software durchgeführt.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zelllinien

Es wurde mit murinen PDAC Zelllinien gearbeitet. *KATMC 1–3* Zelllinien wurden von Mäusen mit konditionaler (*p48Cre*) Expression von konstitutiv aktivem *Kras*^{G12D} sowie homozygotem Knockout des *Atm* Gens isoliert (*Kras*^{G12D}, *Atm*^{fl^{ox}/fl^{ox}}). *KATMEC 1, 3* und *4* Zelllinien wiesen zusätzlich einen homozygoten Knockout des Gens *Ezh2* auf (*Kras*^{G12D}, *Atm*^{fl^{ox}/fl^{ox}}, *Ezh2*^{fl^{ox}/fl^{ox}}). *KATMC* Zelllinien *1–3* wurden am UKU durch die Arbeitsgruppe von Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger isoliert und zur Verfügung gestellt. *KATMEC* Zelllinien *1, 3* und *4* wurden im Rahmen meiner Promotion an der UMG isoliert.

Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie in Medium bestehend aus *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 1 % nicht essenzieller Aminosäurelösung (NEAA) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Zelllinien

Zelllinien	Zelltyp	Spezies	Medium
<i>KATMC 1, 2, 3</i>	Tumorzellen des Pankreas	murin	DMEM + 1 % NEAA + 10 % FCS
<i>KATMEC 1, 3, 4</i>	Tumorzellen des Pankreas	murin	DMEM + 1 % NEAA + 10 % FCS

3.5.2 Subkultivierung/ Passagieren

Bei Konfluenz ≥ 70 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin (1:10 in PBS verdünnt) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion mit der doppelten Menge an Medium gestoppt. Mit einer serologischen Pipette (5 ml) wurden die Zellen

durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in ein 15 ml Falcon überführt. Anschließend wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension, entsprechend der gewünschten Verdünnung, in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Zum Aussähen der Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt, die gewünschte Zellzahl berechnet und anschließend in eine neue Zellkulturflasche oder eine Multiwellplatte ausgesät.

3.5.3 Primäre Tumorzellisolation

Zur primären Tumorzellisolation des Pankreas aus tumortragenden *KATMEC* Mäusen wurde eine 2–3 mm große Tumorbioptie in eine Petrischale mit Digestion-Puffer auf Eis gegeben und mit einer autoklavierten Schere in kleine Stücke geschnitten. Danach wurden die Gewebestücke für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in ein 50 ml Falcon überführt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Es erfolgte die Resuspension des Pellets mit 10 ml Digestion-Puffer und die erneute Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die Gewebesuspension wurde erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und danach der Überstand abgesaugt und verworfen. Es wurde ein Ansatz aus 15 ml Waschpuffer und 75 µl Trypsininhibitor (OTI, 50 mg in 1 ml *bank's balanced salt solution*) hergestellt. Das Pellet wurde mit 5 ml des Waschpuffers und OTI resuspendiert und über einen sterilen, 100 µm dicken Filter in ein neues 50 ml Falcon überführt. Dabei wurde das Gewebe vorsichtig mit dem Stempel einer sterilen Spritze durch den Filter gedrückt und zweimal mit 5 ml Waschpuffer und OTI nachgespült. Die Zellsuspension wurde daraufhin erneut 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden daraufhin in 5 ml Medium aus DMEM mit 1 % NEAA, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Zur Quantifizierung der vorhandenen Zellen wurden vorher 100 µl Zellsuspension und 100 µl Bromphenolblau gemischt und über eine Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Je nach Konzentration der Zellsuspension wurde in einem Six Well oder in eine T25 Zellkulturflasche ausgesät und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die ausgebildeten Zellnester begutachtet und das Medium gewechselt. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte weiterhin an allen zwei bis drei folgenden Tagen. Bei starker Fibroblastenbildung zwischen den Zellnestern wurden die Fibroblasten vorsichtig abtrypsiniert. Dafür wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und 0,5 ml Trypsin (pro 6-Well-Platte) oder 1 ml Trypsin (pro T25 Zellkulturflasche) hinzugegeben. Unter Trypsin lösten sich die Fibroblasten schneller von der Wachstumsfläche als Tumorzellen. Dies wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Fibroblasten abgesaugt, bevor sich die Tumorzellen lösten. Danach wurde frisches Medium zu den Tumorzellen hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine Fibroblasten mehr nachweisbar waren. Eine reine Tumorzellkultur wurde mittels Proteinlysate und genomischer DNA nachgewiesen. Bei negativem Ergebnis von α *smooth muscle actin* (α SMA) im Western Blot und Nachweis der *Kras*^{G12D} Mutation in der PCR wurde ein Vorhandensein von Fibroblasten in der Tumorzellkultur ausgeschlossen.

(siehe Ergebnisse Abbildung 43 und Abbildung 44). Außerdem wurde eine Kontamination mit Mykoplasmen durch Anwendung des Myco-Alert-Kits ausgeschlossen.

3.5.4 Genomische DNA-Isolation aus Zelllinien

Zur Isolation genomischer DNA wurde das DNeasy-blood-&-tissue-Kit verwendet. Hierfür wurde beim Passagieren der Zellen 1,3 ml Zellsuspension abgenommen und in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Danach wurde bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 305 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden 500 µl PBS dazu pipettiert und kurz gevortext. Nach erneutem Zentrifugieren bei 305 x g wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und zur Lyse der Zellen 20 µl Proteinase K (aus dem Kit) dazu pipettiert. Danach wurden 200 µl AL Puffer (aus dem Kit) hinzu pipettiert und bei 56 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 99%iges, unvergälltes Ethanol dazugegeben, gevortext und in das DNeasy-Reagiergefäß mit Membran pipettiert. In mehreren Zentrifugationsschritten mit Hinzugabe von Puffer AW1 und AW2 (aus dem Kit) erfolgte die selektive Adsorption der DNA an die Membran sowie die Entfernung von Verunreinigungen und Enzyminhibitoren. In einem letzten Schritt wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl AE Puffer (aus dem Kit) und Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min wieder von der Membran gelöst und in einem Reagiergefäß aufgefangen.

Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte durch das Nano Photometer P-Klasse 360 und die dazugehörige Software.

Es erfolgte eine Genotypisierungs-PCR auf die aktivierte *Kras*^{G12D} Mutation, zum Ausschluss einer Verunreinigung der Tumorzelllinien mit Fibroblasten. Dafür wurden 12,2 µl doppelt destilliertes Wasser mit 200 ng/µl genomischer DNA, 6,8 µl KAPA-Genotypisierungs-Mastermix und je 1 µl des 1 *lox* *Kras*^{G12D} Forward- und Reverse-Primers (siehe Tabelle 13) gemischt.

Tabelle 19: PCR Programm *Kras*^{G12D}

<i>Kras</i>^{G12D}	94 °C	3 min	
	94 °C	30 s	
	68 °C	1,5 min	40 Zyklen
	68 °C	3 min	

Es erfolgte die Amplifizierung der Proben im Thermozykler mit dem entsprechenden Programm (siehe Tabelle 19) und die Auftragung der Proben auf ein 2%iges Agarosegel. Die Auswertung erfolgte, wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben. Eine heterozygote *Kras*^{G12D} Mutation wurde nachgewiesen bei vorliegender Doppelbande in Höhe von 285 bp und 325 bp. Bei Vorliegen von Fibroblasten und somit keiner heterozygoten *Kras*^{G12D} Mutation war nur eine Bande in Höhe von 285 bp sichtbar (siehe Abbildung 43).

3.5.5 Kryokonservierung der Zelllinien

Es wurden von allen verwendeten Zelllinien Kryostocks hergestellt. Hierfür wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, abtrypsiniert und in ein 15 ml Falcon überführt. Dieses wurde bei 1200 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Daraufhin wurde das Pellet mit Einfriermedium, bestehend aus 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 900 µl DMEM (mit 10 % FCS und 1 % NEAA) pro Stock, resuspendiert und je 1 ml pro Kryoröhrchen gegeben. Die Stocks wurden in einen *cryo cooler (mr frosty)* überführt und bei – 80 °C für eine Woche gelagert. Nach einer Woche konnten die Stocks in die – 150 °C Gefriertruhe oder in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen der Stocks wurden 9 ml des Mediums in ein 15 ml Falcon vorgelegt, das Kryoröhrchen aufgetaut und vorsichtig mit dem Medium im Falcon gemischt. Danach wurde bei 1200 rpm, 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit 5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und nach zwei Tagen in eine T75 Zellkulturflasche passagiert.

3.5.6 Transfektion mit gegen *Ezh2* gerichteter siRNA

Der *Ezh2* Knockdown erfolgte in *KATMC 1–3* Zelllinien mittels *small interfering* RNA (siRNA), wodurch die Genexpression von *Ezh2* auf RNA Ebene unterbrochen wurde. Zu transfizierende Zellen wurden in 6-Well-Platten oder 96-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Transfektion. Der Transfektionsansatz wurde 20 min vorher inkubiert bestehend aus 200 µl serumfreiem DMEM Medium, 6 µl siRNA und 6 µl *siLentfect*, zum Transport der Nukleinsäure in den Zellkern. Die Kontrolle erfolgte zeitgleich mit dem gleichen Transfektionsansatz ohne siRNA. Die Zellen wurden daraufhin für 48 h inkubiert.

3.5.7 EPZ-6438 Behandlung

EPZ-6438 (Tazemetostat) Behandlung erfolgte in *KATMC 1–3* Zelllinien zur pharmakologischen Inhibition der Methyltransferaseaktivität des Proteins EZH2. Hierfür wurden die zu behandelnden Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt. EPZ-6438 wurde in DMSO gelöst und in Medium auf zwei verschiedene Konzentrationen (500 nM und 1 µM) verdünnt. Die Konzentration des EPZ-6438 Stocks betrug 1 mM. Zum Ausschluss des alleinigen Effekts von DMSO, wurden zur Kontrolle Zellen der gleichen Kondition mit 1 µM DMSO in Medium behandelt. Die Zellen wurden daraufhin mit 1,5 ml des jeweiligen Ansatzes pro Well behandelt und für 72 h inkubiert.

3.5.8 MTT-Test

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe von Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) gemessen. Je nach Behandlung oder Transfektion wurden 2000 oder 3000 Zellen in

fünffacher Bestimmung in eine 96-Well-Platte ausgesät und am nächsten Tag behandelt oder transfiziert. 48 h nach Transfektion mit siRNA für *Ezr2* oder 72 h nach EPZ-6438 Behandlung wurde ein Ansatz aus 10 µl MTT (5 mg/ml in destilliertem Wasser) und 90 µl Medium pro Well hergestellt. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 100 µl des Ansatzes pro Well hinzugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl Solubilisierungslösung pro Well auf die Zellen pipettiert. Nach 15 min auf der Schüttelplattform erfolgte die Auswertung über das Photometer PHOmo bei 595 nm Wellenlänge. Mit der dazugehörigen PHOmo-Software erfolgten die Auswertung und die Subtraktion des Hintergrundes. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 8.

3.5.9 Staurosporin-Behandlung und Annexin- und Propidiumiodid-Färbung mit nachfolgender Analyse im Durchflusszytometer

Die Apoptoserate wurde mit Hilfe der Annexin- und Propidiumiodid(PI)-Färbung analysiert. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und behandelt oder transfiziert. Nach 48 h oder 72 h wurden die Zellen zur Apoptoseinduktion mit 400 nM Staurosporin (STS) behandelt, welches in DMSO verdünnt wurde. Die Konzentration des STS Stocks betrug 1 mM. Zum Ausschluss des alleinigen Effekts von DMSO wurden Zellen der gleichen Kondition mit derselben Menge DMSO ohne STS behandelt. Nach 24 h Behandlung mit STS wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Nach Stoppen der Trypsin-Reaktion mit Medium wurden die Zellen in Fluorescence-Activated-Cell-Sorting(FACS)-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet in 0,5 ml Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand erneut abgekippt und die Zellen in 100 µl Annexin-V-Bindungspuffer aufgenommen. Hinzu wurden 5 µl Annexin-V-Antikörper und 3 µl PI pipettiert. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln wurde erneut 400 µl Annexin-V-Bindungspuffer hinzu pipettiert. Danach wurden die Proben im Durchflusszytometer mit der FACS-Diva-Software analysiert: Daraufhin wurde mit der FloJow-Software ausgewertet und die Ergebnisse mit GraphPad Prism 8 dargestellt.

3.6 Molekulare Methoden

3.6.1 RNA Isolation

Zur Isolation von RNA aus der Zelle wurde nach Aussähen in 6-Well-Platten, und ggf. Behandlung der Zellen, das Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Danach wurden pro Well 500 µl Trizol hinzu pipettiert. Nach 2–3 min Einwirkzeit wurden die Zellen in Trizol in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Es wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach Vortexen und 5 min Inkubation wurde bei 13500 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die obere, klare Phase, welche die RNA enthielt, ohne Interphase

und Trizol, in neue Reagiergefäße überführt. Daraufhin wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und bei RT 10 min inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 30 min. Anschließend erfolgten zwei identische Waschschriffe des RNA-Pellets mit 75%igem Ethanol und Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 5 min. Daraufhin wurde das Pellet 30 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und 5 min bei RT inkubiert. Die RNA konnte nun im Reagiergefäß bei –80 °C gelagert werden. Die RNA Konzentrationsmessung erfolgte über das Nano-Photometer P-360.

3.6.2 Komplementäre DNA-Synthese

Zur Genexpressionsanalyse wurde RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe des iScript-cDNA-Kits von Bio-Rad umgeschrieben. RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 1 µg verdünnt und mittels reverser Transkriptase umgeschrieben (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: cDNA Programm

cDNA	25 °C	5 min
	46 °C	20 min
	95 °C	1 min

Danach wurde die cDNA mit doppelt destilliertem Wasser auf 200 ng verdünnt und bei –20 °C gelagert.

3.6.3 qRT-PCR

Die cDNA wurde mittels Real-Time-quantitativer-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert. Dafür wurde iTaq-Universal-SYBR-Green-Supernix mit den entsprechenden Primern (siehe Tabelle 14) und doppelt destilliertem Wasser gemischt und 9 µl pro Well in eine 96-Multiwellplatte pipettiert. Anschließend wurde 1 µl der zu analysierenden cDNA pro Well hinzu pipettiert. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und zentrifugiert bevor sie im Thermozykler das entsprechende Programm durchlief (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: qRT-PCR Programm

qRT-PCR	95 °C	10 min	
	95 °C	20 s	
	60 °C	30 s	40 Zyklen

Die Analyse erfolgte über Normierung der Werte mit dem Haushaltsgen *R/po1* (siehe Tabelle 14) und delta delta Ct-Methode.

3.6.4 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden zum gewünschten Zeitpunkt das Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Der Lysepuffer (siehe Tabelle 5) wurde direkt vor Gebrauch mit 25xComplete, NaF und NaO versetzt und je nach gewünschter Verdünnung auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin abgeschabt und in Reagiergefäße pipettiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 14000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß pipettiert und das Pellet verworfen. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte über den Bradford-Test. Anschließend wurden die Proteinlysate auf 1 mg/µl verdünnt, mit 5xLämmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lagerung der isolierten sowie der angesetzten Proteinlysate erfolgte bei -20 °C.

3.6.5 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der Proteine erfolgte durch Vorbereitung der SDS-Gele in verschiedenen Konzentrationen. Je nach Proteingröße wurden 7,5 % Gele für große Proteine bis 350 kDa, 10 % Gele für Proteine zwischen 30 kDa und 180 kDa sowie 15 % Gele für kleine Proteine < 30 kDa verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte in 1xLaufpuffer mit Material der Firma Bio-Rad. Es wurden 5 µl des passenden Markers und 20 µl der angesetzten Proteinlysate pro Tasche geladen. Zunächst erfolgte die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel für ca. 20 min bei 120 V. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel für ca. 1 h bei 160 V.

3.6.6 Western-Blot

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine im SDS-Gel erfolgte der Proteintransfer mittels Semi-Dry-Turbo-Blot auf eine Nitrocellulosemembran. Die Dauer variierte von 15 min bei 15 % Gelen, 22 min bei 10 % Gelen und 35 min bei 7,5 % Gelen. Danach wurde die Membran für 1 min mit Ponceau S inkubiert, um die Übertragung der Proteine zu überprüfen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 5 %iger Milch in Tris-gepufferter-Saline (TBS, siehe Tabelle 5) mit 0,1 % *tween* 20 (TBST) oder 5 % BSA in TBST für 1 h. Daraufhin wurde der gewünschte Primärantikörper (siehe Tabelle 9) in 5%iger Milch in TBST oder 5 %igem BSA in TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte à 10 min mit TBST und daraufhin die Inkubation der Membran mit entsprechendem Horseradish-Peroxidase-konjugiertem-Sekundärantikörper (siehe Tabelle 10). Dieser wurde 1:6500 in 5%iger Milch in TBST verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneuten drei Waschschrten à 10 mit TBST erfolgte die Auswertung mit Western-Lightning-Enhanced-Chemoluminescence-plus- oder Western-Lightning-Enhanced-Chemoluminescence-ultra-Lösung. Die Lösung wurde auf die Höhe aufgetragen, auf der die Proteine zu erwarten waren und für 1 min bei Licht inkubiert.

Danach erfolgte die Belichtung mit der Chemo-Cam-Kamera. Die Dauer der Belichtungszeit wurde je nach nachzuweisendem Protein angepasst. Als Ladekontrolle diente Horseradish-Peroxidase-konjugiertes- β -actin. Die Auswertung erfolgte mittels ChemoStar-Imager-Software und die Darstellung der Ergebnisse in Power Point.

3.7 Quantifizierung und statistische Analyse

Die Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mittels Fiji-ImageJ2-Software (Schindelin et al. 2012). Statistische Analysen wurden mit der GraphPad-Prism-8-Software (www.graphpad.com) mittels ungepaartem T-Test durchgeführt. Der T-Test wurde als statistisch signifikant markiert, wenn $p < 0,05$ entsprach. Dies wurde mittels graphischer Darstellung mit * gekennzeichnet (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: p-Wert Kennzeichnung

$p < 0.05$	*
$p < 0.01$	**
$p < 0.001$	***
$p < 0.0001$	****

Die Darstellung und Auswertung der Survival-Ergebnisse der transgenen Mauslinien erfolgte ebenso mittels GraphPad-Prim-8-Software. Die Ergebnisse wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und über den Log-Rank-(Mantel-Cox)-Test analysiert. Hierbei erfolgte die p-Wert-Kennzeichnung ebenso, wie in Tabelle 22 dargestellt.

Die Analyse der Tumorinzidenzen, Mikro- und Makrometastasierung der *KATMC*- und *KATMEC*-Mauslinien erfolgte mittels exaktem Test nach Fisher in der GraphPad-Prim-8-Software.

4 Ergebnisse

4.1 Konsequenzen und Auswirkungen des EZH2-Verlusts auf die Entstehung und Progression *Atm*-defizienter Pankreaskarzinome (*in vivo*)

In dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss von EZH2 im Kontext der konditionalen (*p48Cre*) Expression von konstitutiv aktivem *Kras*^{G12D} und der *Atm*-Defizienz durch Vergleich zweier transgener Mausmodelle *in vivo* charakterisiert.

4.1.1 Vergleich des Mausphänotyps von transgenen *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien

Der Phänotyp der in Kapitel 3.1 beschriebenen transgenen Mausmodelle *KATMC* (*Kras*^{G12D}, *Atm*^{flx/flx}, *p48Cre*) und *KATMEC* (*Kras*^{G12D}, *Atm*^{flx/flx}, *Ezh2*^{flx/flx}, *p48Cre*) wurde verglichen, um mögliche EZH2-abhängige Unterschiede in Gewicht oder Größe im Kontext der *Atm*-Defizienz festzustellen. Mäuse beider Mauslinien wurden nach normalen mendelschen Regeln geboren. Bei Geburt waren sowohl Mäuse der *KATMC* als auch der *KATMEC* Mauslinien lebensfähig und zeigten eine unauffällige Pankreasmorphologie. Nachdem im Alter von sechs Wochen die Ergebnisse der Genotypisierung mittels Schwanzbiopsien vorlagen (siehe Methoden: Kapitel 3.3), wurde das Gewicht der Mäuse bei sechs, acht, zehn und zwölf Wochen bestimmt. Beim Einschluss der zu wiegenden Mäuse wurde auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis geachtet. Dabei ergab sich jedoch kein Unterschied im Gewicht zwischen den beiden transgenen Mauslinien (siehe Abbildung 6).

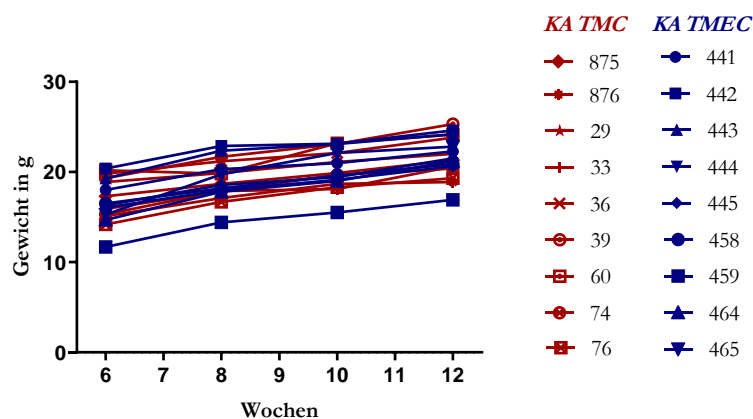


Abbildung 6: Vergleich des Gewichts von *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien Mäuse der Mauslinien *KATMC* und *KATMEC* wurden mit sechs, acht, zehn und zwölf Wochen nach erfolgter Genotypisierung gewogen. Dargestellt sind Gewichtsverläufe in Gramm von *KATMC* Mäusen ($n = 9$) in rot und *KATMEC* Mäusen ($n = 9$) in blau. Jede Nummer kennzeichnet eine Maus.

Zudem wurde die Mausgröße zwei und drei Monate alter Tiere beider Linien bestimmt und verglichen. Hierfür wurden Mäuse genutzt, die zu diesen fest definierten Zeitpunkten für

eine Analyse des Pankreasphänotyps geopfert wurden. Es wurde der Abstand zwischen Nasenspitze und Schwanzansatz vermessen. Auch hier zeigte sich kein *EZH2*-abhängiger Unterschied zwischen den beiden transgenen Mauslinien (siehe Abbildung 7).

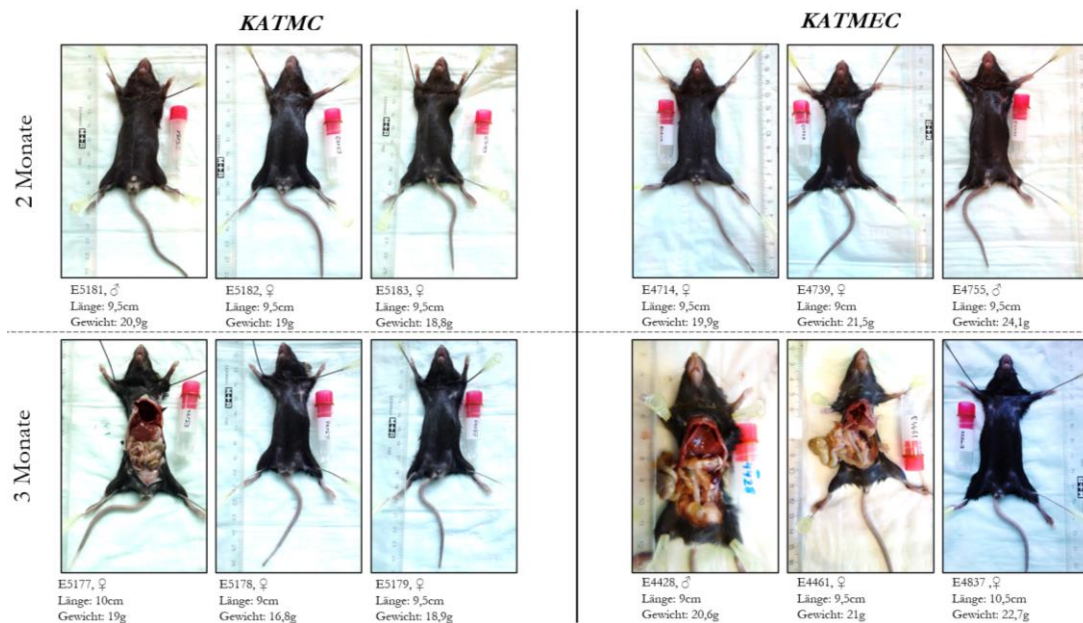


Abbildung 7: Vergleich der Länge von *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien Repräsentative Fotos von Mäusen der transgenen Mauslinien *KATMC* und *KATMEC* im Alter von zwei (obere Reihe) und drei (untere Reihe) Monaten. Die Mäuse wurden von Nasenspitze bis Schwanzansatz vermessen.

4.1.2 Bestätigung der *Atm*-Defizienz und *Ezh2*-Defizienz

Um zusätzlich zur Genotypisierung der Schwanzbiopsien den pankreasspezifischen Knock-out des *Atm*-Gens zu bestätigen, wurde die *Atm*-Defizienz durch immunhistochemische Färbungen in *KATMC* und *KATMEC* Mäusen bestätigt. Als Positivkontrolle dienten hierfür histologische Schnitte von Cisplatin behandelten C56BL/6J-Wildtyp-Mäusen, die in einem syngenem Modell orthotop mit PDAC Zellen von Mäusen mit konditional (*p48Cre*) aktiviertem *Kras^{G12D}* und heterozygoter *p53*-Mutation (*p53^{R172H/+}*) (*KPC*-Zellen) transplantiert wurden. Die Entstehung eines Pankreaskarzinoms wurde Ultraschall-gesteuert bestätigt und dann mit der Cisplatinbehandlung (4 mg/kg, intraperitoneal) begonnen. Dieser Versuch wurde durchgeführt durch Frau Dr. Shilpa Patil in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Matthias Dobbstein. Die histologischen Schnitte von Cisplatin behandelten Mäusen wurden von Frau Dr. Geske Schmidt zur Verfügung gestellt. GammaH2AX-Färbungen der histologischen Schnitte dieser Mäuse (Ergebnisse der Arbeitsgruppe Dobbstein) zeigten wie erwartet eine DNA-Damage-Induktion der Cisplatin behandelten Tiere, wodurch die Expression von ATM induziert wurde. Im Vergleich hierzu konnte sowohl in jungen, zwei Monate alten Tieren mit PDAC Vorläuferläsionen, als auch in tumortragenden *KATMC* und *KATMEC* Mäusen keine ATM Expression im Pankreas nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8).

Histologische Schnitte für *KATMC* Mäuse wurden in dieser Arbeit u. a. durch die Arbeitsgruppe von Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des UKU zur Verfügung gestellt, um HE-Färbungen und immunhistochemische Färbungen in festen Endpunkten und Tumoren anzufertigen. Hierfür wurde die Nomenklatur der Arbeitsgruppe Kleger *AAKC* mit fortlaufender Nummerierung für die *KATMC* Mauslinie beibehalten. Alle histologischen Schnitte von *KATMC* und *KATMEC* Mäusen der Arbeitsgruppe Heßmann der UMG wurden mit fortlaufenden E-Nummern bezeichnet.

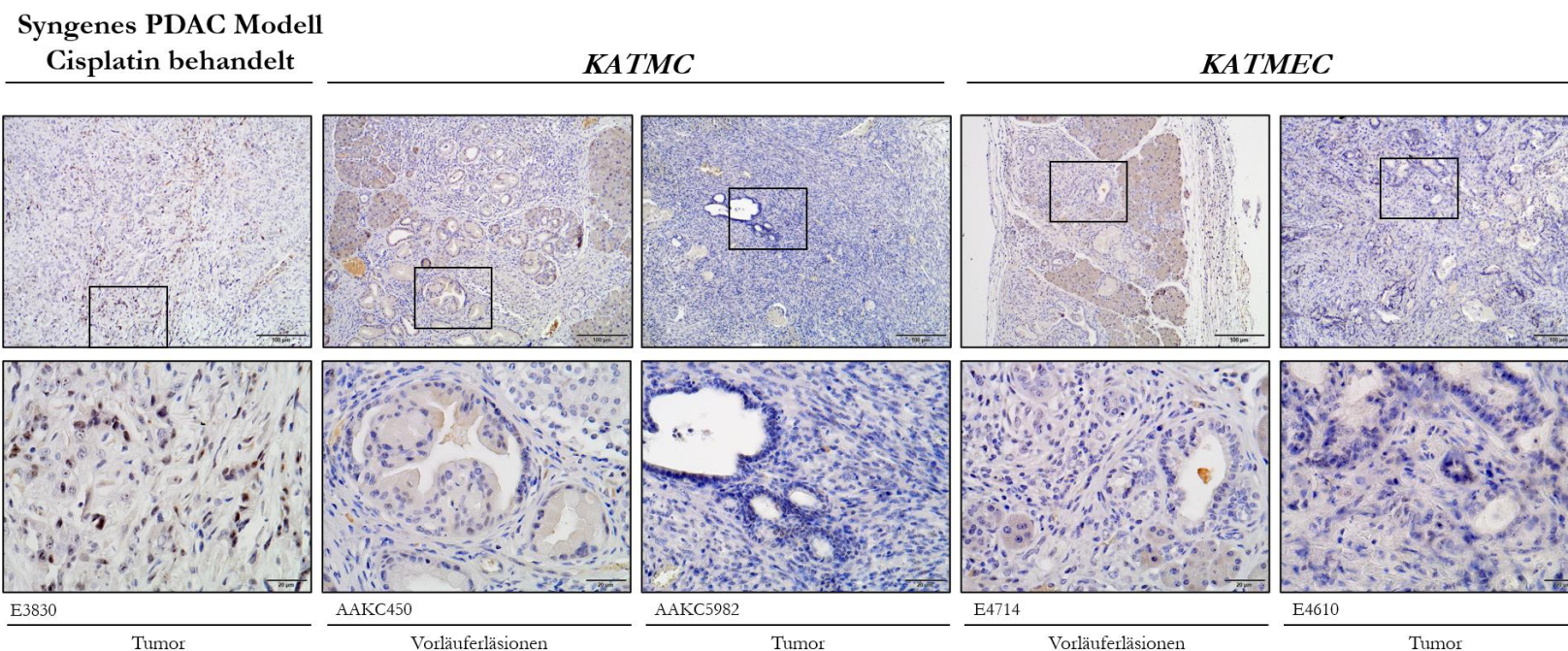


Abbildung 8: Nachweis der *Atm*-Defizienz im Pankreas von *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien Immunhistochemische Färbung in histologischen Pankreasschnitten für ATM. Im Vergleich zu syngenem Cisplatin behandelten Mäusen mit positiver ATM Färbung der epithelialen Zellen, wiesen *KATMC* und *KATMEC* Schnitte keine ATM Färbung der epithelialen Zellen des Pankreas auf. Repräsentative Fotos der Färbung wurden in 100-facher und 400-facher Vergrößerung aufgenommen. AAKC450 und E4714 zeigten Vorläuferläsionen im Alter von 2 Monaten. E3830, AAKC5982 und E4610 zeigten Tumorkläsionen und stammten aus den Survival-Kohorten des entsprechenden Mausmodells.

Zudem wurde, zusätzlich zur Genotypisierung der Schwanzbiopsien, der pankreasspezifische Knockout des *Ezh2*-Gens mit Hilfe von Proteinlysaten aus Pankreastumorgewebe verifiziert. Hier konnte im Western Blot eine deutliche Reduktion der EZH2-Expression in der *KATMEC* Mauslinie bestätigt werden. Als Positivkontrolle dienten hierfür Pankreasproteinlysate der *KATMC* Mauslinie. Außerdem zeigten sich hohe EZH2-Level in *KATMC* Mäusen (siehe Abbildung 9).

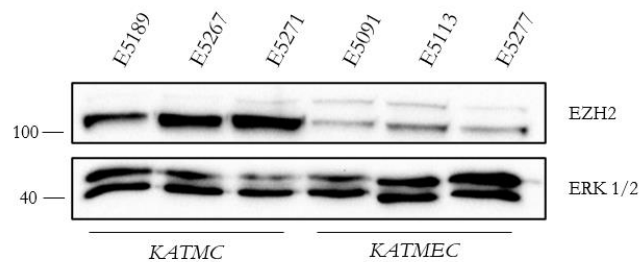


Abbildung 9: Nachweis der *Ezh2*-Defizienz im Pankreas der *KATMEC* Mauslinie Western Blot von EZH2 mit Proteinlysaten aus Pankreastumorgewebe von *KATMC* und *KATMEC* transgenen Mäusen. Bestätigung der *Ezh2*-Defizienz in *KATMEC* E5091, E5113 und E5277. Als Positivkontrolle wurden *KATMC* E5189, E5267 und E5271 verwendet. Zur Ladekontrolle diente ERK 1/2 (Doppelbande). Markerhöhe links in Kilodalton.

4.1.3 Charakterisierung des Einflusses der EZH2 Expression auf die Pankreaskarzinogenese

Um den Einfluss von EZH2 auf die Entstehung des *Atm*-defizienten PDACs zu untersuchen, wurden zwei, drei und sechs Monate alte Mäuse der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien miteinander verglichen. Pro Zeitpunkt und pro Mauslinie wurden je sechs bis acht Mäuse untersucht. Zunächst wurde mittels einer Übersichtsfärbung des Pankreas mit Hämatoxylin und Eosin untersucht, ob EZH2-abhängige Unterschiede in der Karzinogenese in Bezug auf das Auftreten von Tumorvorläuferläsionen vorhanden waren. In den Übersichtsfärbungen des Pankreas konnten in allen drei Zeitpunkten sowohl azinäre Zellen als auch duktale Strukturen angefärbt werden. In 200- und 400-facher Vergrößerung zeigten sich unterschiedliche duktale Läsionen. Bei dukталen Läsionen ohne Zellkernatypien, mit erhaltener Zellpolarität, Zylinderepithel und muzinreichem Zytoplasma handelte es sich vermutlich um frühe PanIN-1-Läsionen. Außerdem konnte zwischen späten dukталen Läsionen unterschieden werden. Bei solchen mit Verlust der Polarität mit nur moderaten Zellkernatypien wurden PanIN-2-Läsionen angenommen. Läsionen mit einem Verlust der Zellpolarität, nukleären Vergrößerungen, Pleomorphismen, einem vermehrten Auftreten von Becherzellen und in das Lumen einwandernden Zellclustern waren wahrscheinlich späte PanIN-3-Läsionen.

Im Pankreas zwei Monate alter *KATMC* und *KATMEC* Mäuse konnte das Auftreten von azinären Zellen sowie von dukталen Läsionen mit frühen und späten PanIN-Läsionen beobachtet werden (siehe Abbildung 10).

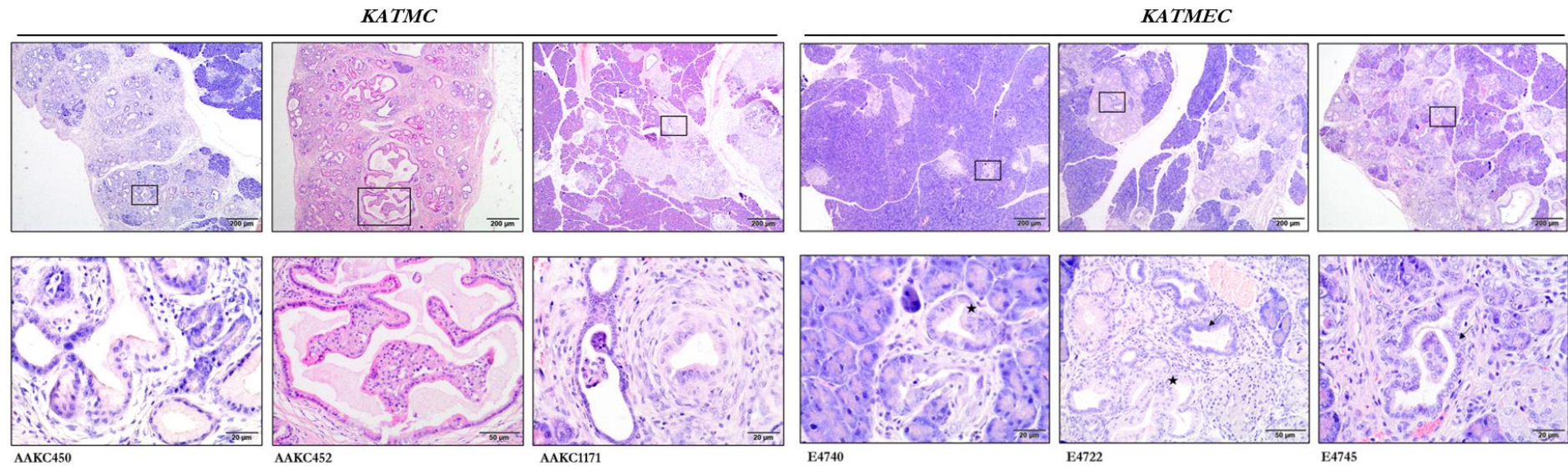


Abbildung 10: HE-Färbung in zwei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos von HE-Färbungen des Pankreas in 40-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung in zwei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen. Ein vermehrtes Auftreten von dukталen Strukturen konnte in AAKC450 und 452 (*KATMC*) sowie in E4722 und E4745 (*KATMEC*) beobachtet werden. In AAKC1171 und E4740 wurden große Bereiche azinärer Zellen dargestellt. Zudem beispielhafte Darstellung von PanIN-Läsionen verschiedener Stadien in allen sechs Mäusen. Es zeigten sich frühe PanIN-1-Läsionen in AAKC450 sowie spätere PanIN-2-Läsionen in AAKC 452, E4740 (Stern), und E4722 (Stern). Späte PanIN-3-Läsion mit einem in das Lumen einwanderndem Zellcluster fanden sich in AAKC1171, E4722 (Pfeil) sowie E4745 (Pfeil).

In drei Monate alten Mäusen nahm in den *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien die Fläche azinärer Zellen ab und die Fläche an dukталen Läsionen und Tumorarealen zu. Wie in beiden zwei Monate alten Kohorten konnten frühe und späte PanIN-Läsionen beobachtet werden (siehe Abbildung 11).

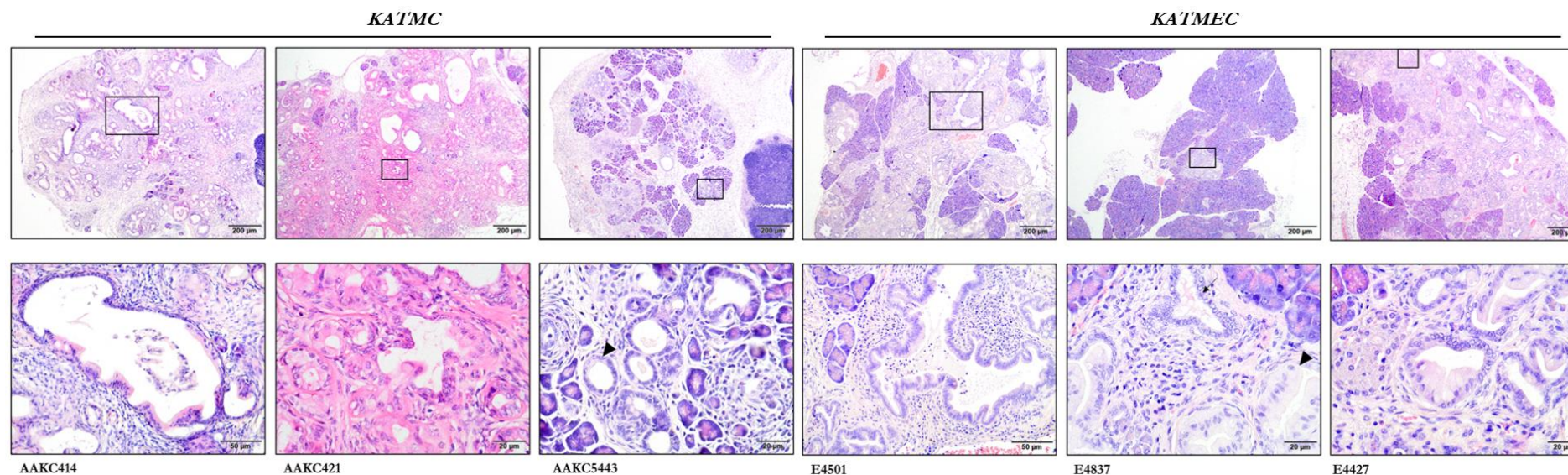


Abbildung 11: HE-Färbung in drei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos von HE-Färbungen des Pankreas in 40-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung in drei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen. Ein häufiges Auftreten von dukталen Strukturen mit vereinzelt, azinären Zellen konnte in AAKC414, AAKC421 und AAKC5443 (*KATMC*) und in E4501 und E4427 (*KATMEC*) beobachtet werden. Dabei war das Gewebe in AAKC5443 sehr Fett- und Stroma-reich mit lymphatischem Gewebe. Größere Areale azinärer Zellen fanden sich in E4837 (*KATMEC*). Zudem beispielhafte Darstellung von PanIN-Läsionen verschiedener Stadien in allen sechs Mäusen. Es konnten PanIN-1-Läsionen (Pfeilspitze) in AAKC5443 und E4837 beobachtet werden. Außerdem zeigten sich PanIN-2-Läsionen in AAKC414, E4501 und E4427 sowie PanIN-3-Läsionen mit Zellkernatypien in AAKC421 und E4837 (Pfeil).

Auffällig waren außerdem zwei Mäuse mit Tumorerkrankungen in dieser Endpunkt-Kohorte. So war im Pankreas der *KATMC* Maus Nummer 419 ein schlecht differenzierter Tumor mit großen nekrotischen Arealen zu sehen. In der *KATMEC*-Maus E4837 traten zudem intrapankreatische Unterschiede auf. So waren bei dieser Maus neben Bereichen azinärer Zellen mit nur vereinzelt duktalem Strukturen und PanIN-Läsionen (siehe Abbildung 11) ebenso Bereiche mit einem dedifferenzierten Tumor und fibroinflammatorischem Stroma zu beobachten (siehe Abbildung 12).

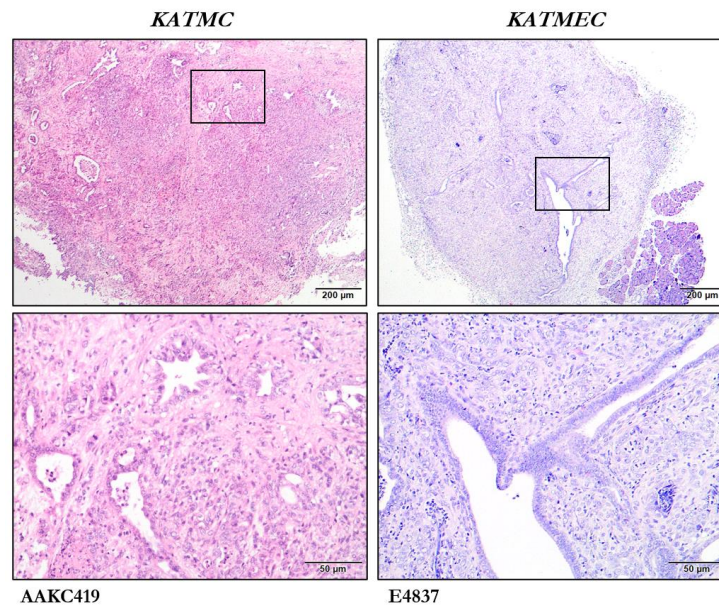


Abbildung 12: HE-Färbung von Tumorerkrankungen in drei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen
Repräsentative Fotos von HE-Färbungen des Pankreas in 40-facher und 200-facher Vergrößerung in *KATMC* Maus Nummer AAKC419 und *KATMEC* Maus Nummer E4837. Bei beiden waren dedifferenzierte Tumoren und fibroinflammatorisches Stroma zu sehen. In AAKC419 konnten zudem nekrotische Areale beobachtet werden. In E4837 waren hingegen auch Areale azinärer Zellen zu sehen.

In sechs Monate alten Mäusen konnten in beiden Mauslinien nur noch vereinzelt Areale azinärer Zellen beobachtet werden. Bereiche duktaler Strukturen überwogen. Ebenso wie in den zwei und drei Monate alten Mäusen traten auch bei sechs Monate alten Mäusen sowohl frühe PanIN-1-Läsionen als auch späte PanIN-2- und PanIN-3-Läsionen in *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien auf (siehe Abbildung 13).

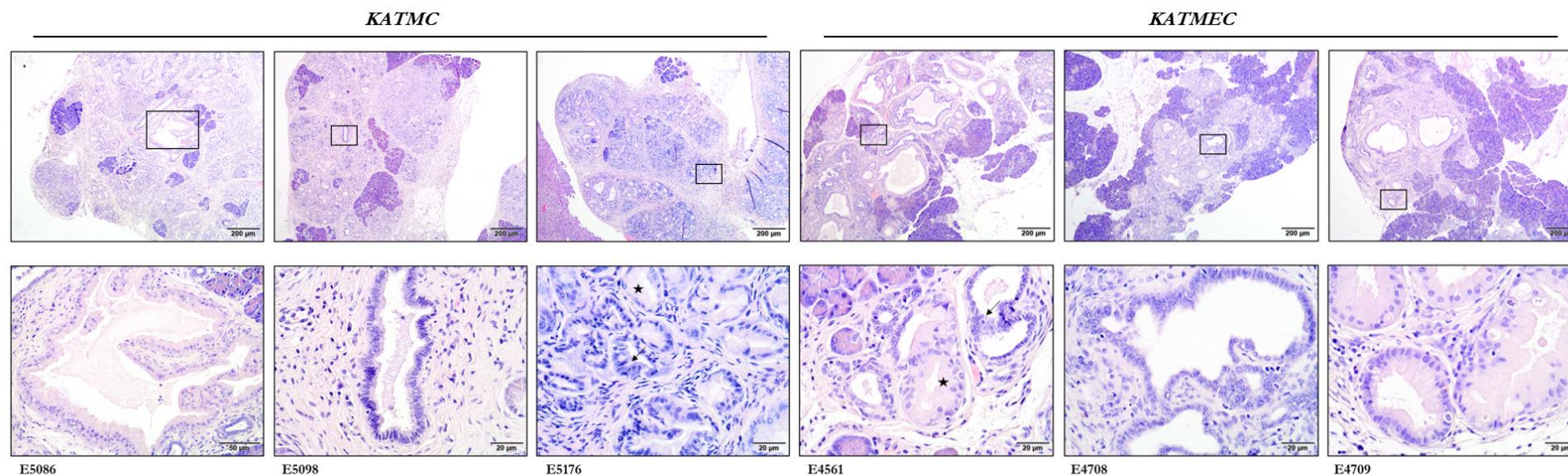


Abbildung 13: HE-Färbung von sechs Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos von HE-Färbungen des Pankreas in 40-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung in sechs Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen. Ein vermehrtes Auftreten von dukталen Strukturen mit vereinzeltm Auftreten von azinären Zellen konnte in allen sechs dargestellten histologischen Schnitten des Pankreas beobachtet werden. Zudem Darstellung von PanIN-Läsionen verschiedener Stadien in allen sechs Mäusen. Beispielhaft dafür waren PanIN-2-Läsionen in *KATMC* E5086, E5176 (Stern) und in *KATMEC* E4561 (Stern) und E4709. PanIN-3-Läsionen waren in *KATMC* E5098 und E5176 (Pfeil) sowie in *KATMEC* E4561 (Pfeil) und E4708 zu erkennen.

In den dargestellten repräsentativen Übersichtsfärbungen ließ sich also eine starke Heterogenität, sowohl zwischen Mäusen der gleichen Kohorte als auch intrapankreatisch zeigen. Dabei war ein bereits sehr frühes Auftreten von hochgradigen Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, wie PanIN-3-Läsionen, auffällig. Ebenso war ein früher struktureller Umbau des physiologischen Pankreasgewebes bestehend aus Azinuszellen, vereinzelt Inseln und seltenen duktalem Strukturen, hin zu vorwiegend duktalem Strukturen und einer Zunahme des umgebenden Stromas in beiden Genotypen zu verzeichnen. Dabei konnte in den Übersichtsfärbungen ohne Quantifizierung der Läsionen allerdings kein EZH2-abhängiger Unterschied der Pankreasarchitektur im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden. Zudem traten nur bei zwei von insgesamt 45 untersuchten Mäusen der zwei-, drei- und sechs-Monatskohorten fortgeschrittene Karzinome auf (siehe Abbildung 12).

4.1.4 Quantifizierung der Zellproliferationsrate

EZH2-abhängige Unterschiede in Bezug auf die Zellproliferation wurden durch immunhistochemische Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67 (siehe Kapitel 3.4.4) und anschließende Quantifizierung in zwei, drei und sechs Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Kohorten untersucht. Repräsentative Fotos der Ki-67 Färbung im Zellkern epithelialer Zellen werden in Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16 gezeigt. Dabei konnte eine höhere Proliferationsrate der epithelialen Zellen bei kombinierter *Atm*- und *Ezh2*-Defizienz (*KATMEC*) gezeigt werden. Dieser Unterschied war bei Mäusen aller drei Zeitpunkte zu beobachten und erreichte Signifikanz zwischen sechs Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Kohorten ($p = 0,0013$) (siehe Abbildung 17). Außerdem nahm die Zellproliferation im Trend mit steigendem Alter ab.

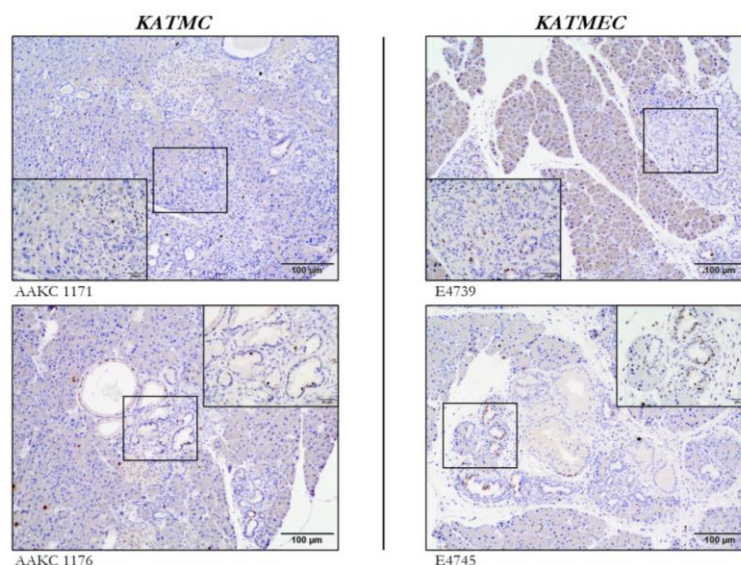


Abbildung 14: Untersuchung der Zellproliferation in zwei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen. Repräsentative Fotos der Ki-67 Färbung im Zellkern in 100-facher und 400-facher Vergrößerung für zwei Monate alte *KATMC* und *KATMEC* Kohorten.

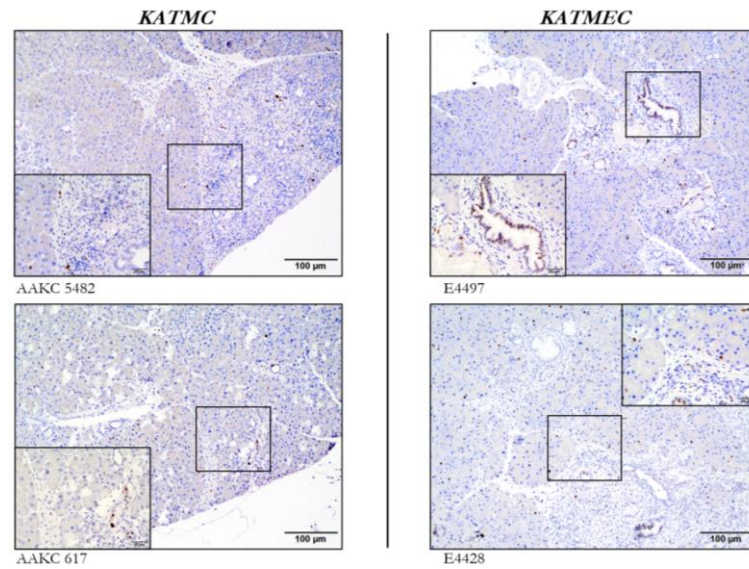


Abbildung 15: Untersuchung der Zellproliferation in drei Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos der Ki-67 Färbung im Zellkern in 100-facher und 400-facher Vergrößerung für drei Monate alte *KATMC* und *KATMEC* Kohorten.

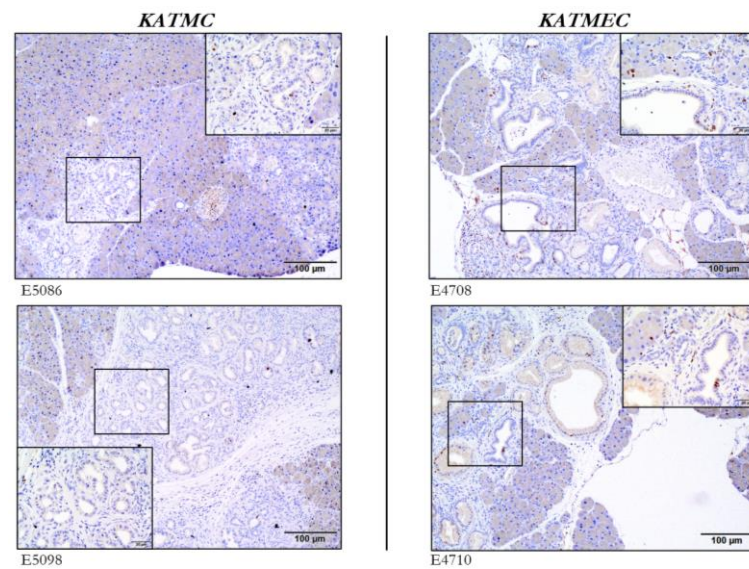


Abbildung 16: Untersuchung der Zellproliferation in sechs Monate alten *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos der Ki-67 Färbung im Zellkern in 100-facher und 400-facher Vergrößerung für sechs Monate alte *KATMC* und *KATMEC* Kohorten.

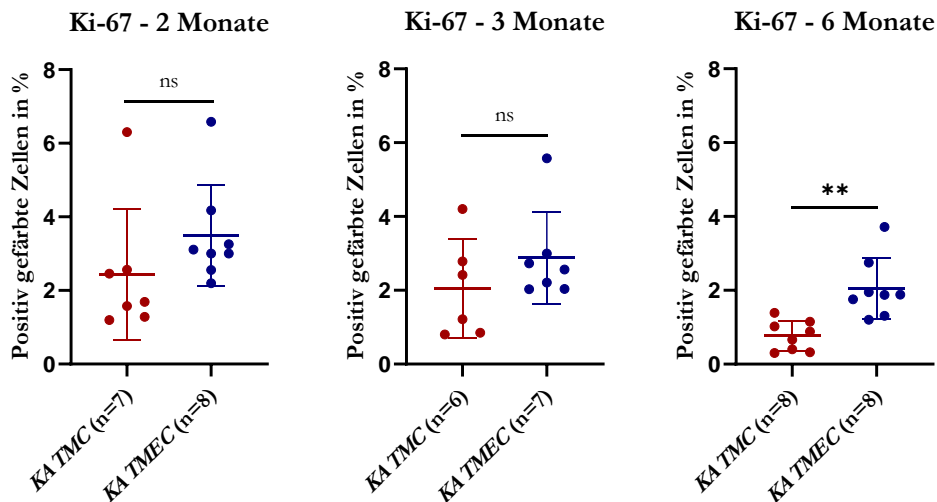


Abbildung 17: Quantifizierung der Proliferationsrate mittels Ki-67 in festen Endpunkten der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien Für die Proliferationsbestimmung wurden immunhistochemische Färbungen für Ki-67 für die Zeitpunkte zwei, drei und sechs Monate der *KATMC* und *KATMEC* Kohorten angefertigt. Pro Maus wurden je zehn Fotos in 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Es erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl epithelialer Zellkerne und der positiv gefärbten epithelialen Zellkerne. Die Darstellung der Proliferationsrate erfolgte in Prozent. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Der ungepaarte T-Test zwischen den Gruppen *KATMC* und *KATMEC* zeigte in zwei ($p = 0,22$) und drei ($p = 0,27$) Monate alten Mäusen keine Signifikanz (ns = nicht signifikant). In sechs Monate alten Mäusen zeigte sich eine signifikant stärkere Proliferationsrate ($p = 0,0013$) in *KATMEC*.

4.1.5 Untersuchung des epithelialen Markers E-Cadherin in festen Endpunkten und Tumor-Survival-Kohorten der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien

Zur Untersuchung der Differenzierungsprozesse während der Pankreaskarzinogenese erfolgte die immunhistochemische Färbung des epithelialen Markers E-Cadherin im Pankreas von zwei, drei und sechs Monate alten Mäusen sowie in den Tumor-Survival-Kohorten der Mauslinien *KATMC* und *KATMEC* durch Frau Dr. Elodie Roger der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des UKU. Repräsentative Fotos der E-Cadherin Färbung im Zytoplasma und in der Zellmembran epithelialer Zellen zeigten eine stärkere E-Cadherin Färbung nach *EZH2*-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz (siehe Abbildung 18). Dieser Unterschied konnte im Pankreas aller drei Zeitpunkte sowie in den Tumoren der Tumor-Survival-Kohorte der *KATMEC* Mauslinie beobachtet werden.

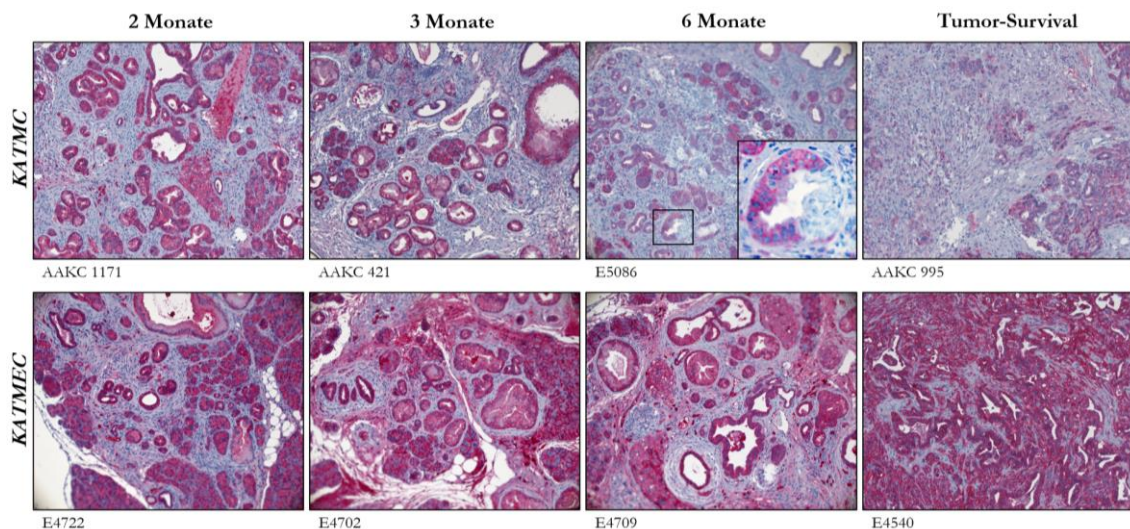


Abbildung 18: Untersuchung des epithelialen Markers E-Cadherin Repräsentative Fotos der immunhistochemischen Färbung für E-Cadherin im Zytosol und in der Zellmembran in 200-facher und 400-facher Vergrößerung für zwei, drei und sechs Monate alte Mäuse sowie die Tumor-Survival-Kohorten der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien. Färbungen und Fotos wurden von Frau Dr. Elodie Roger der Arbeitsgruppe von Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des UKU durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.1.6 Untersuchung des Gesamtüberlebens in *KC*, *KEC*, *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien

Zur Untersuchung des Einflusses von *EZH2* auf das Gesamtüberleben *in vivo* im Kontext der *Atm*-Defizienz, wurden zwei Survival-Gruppen der beiden transgenen Mauslinien *KATMC* und *KATMEC* miteinander verglichen. Nach Geburt und Genotypisierung wurden die Mäuse in die Survivalkohorten eingeschlossen. Dabei wurde auf eine annähernd gleichmäßige Geschlechterverteilung geachtet. Die Mäuse wurden in die Survival-Kohorten eingeschlossen, wenn sie entweder starben oder aufgrund des Vorliegens der folgenden Abbruchkriterien geopfert werden mussten: Gewichtsverlust $\geq 20\%$, Schmerzzeichen oder Aszites. Die *KATMEC* Überlebensdaten ($n = 47$) wurden mit *KATMC* Überlebensdaten ($n = 22$) verglichen. Beide Datensätze wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. med. Elisabeth Heßmann an der UMG erhoben. Dabei konnte ein signifikant ($p < 0,0001$) verlängertes Gesamtüberleben der transgenen *KATMEC* Mauslinie mit *EZH2*-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz, im Vergleich zur transgenen *KATMC* Mauslinie, gezeigt werden. Hier betrug das mediane Gesamtüberleben der *KATMEC*-Survival-Kohorte 50,4 Wochen im Gegensatz zu 38 Wochen in der *KATMC*-Survival-Kohorte. Zudem wurden die *KATMEC* Überlebensdaten der Göttinger Kohorte mit *KATMC* Überlebensdaten ($n = 40$) der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des UKU verglichen. Auch hier zeigte sich ein signifikant ($p < 0,0001$) verlängertes Gesamtüberleben der *KATMEC*-Survival-Kohorte im Gegensatz zur *KATMC*-Survival-Kohorte. Hierbei betrug das mediane Gesamtüberleben der Ulmer *KATMC*-Survival-Kohorte 36,9 Wochen. Die Göttinger und Ulmer *KATMC*-Survival-Kohorten wiesen daher ein vergleichbares medianes

Gesamtüberleben auf. Somit konnte im Mausmodell ein signifikanter EZH2-abhängiger Unterschied im Gesamtüberleben im Kontext der *Atm*-Defizienz *in vivo* gezeigt werden. Im Kontext dieses Ergebnisses erfolgte eine Gegenüberstellung von *KATMC* und *KATMEC* Überlebensdaten mit Überlebensdaten von Mäusen mit konditional (*p48Cre*) aktiviertem *Kras* (*KC* Mauslinie) sowie Mäusen mit konditional (*p48Cre*) aktiviertem *Kras* und homozygoter *Ezh2*-Defizienz (*KEC* Mauslinie). Die *KC* und *KEC* Mäuse exprimieren ATM-Wildtyp, welches für *KC* Mäuse 2015 durch Russell et al. gezeigt wurde. Die *KC* und *KEC* Überlebensdaten wurden durch Frau Dr. Shilpa Patil, Frau Waltraut Kopp und Herrn Benjamin Steuber der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. med. Elisabeth Heßmann des Universitätsklinikums Göttingen erhoben. Nach Gegenüberstellung der Gesamtüberlebenskurven der vier Mauslinien konnte ein signifikant ($p < 0,0001$) verlängertes Gesamtüberleben der *KC* und *KEC* Mauslinien im Vergleich zu *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien beobachtet werden. Außerdem fiel auf, dass im Gegensatz zum EZH2-abhängigen, signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben im Kontext der *Atm*-Defizienz, kein EZH2-abhängiger Unterschied des Gesamtüberlebens zwischen *KC* und *KEC* Mauslinien im Kontext von *Atm*-Wildtyp bestand (siehe Abbildung 19).

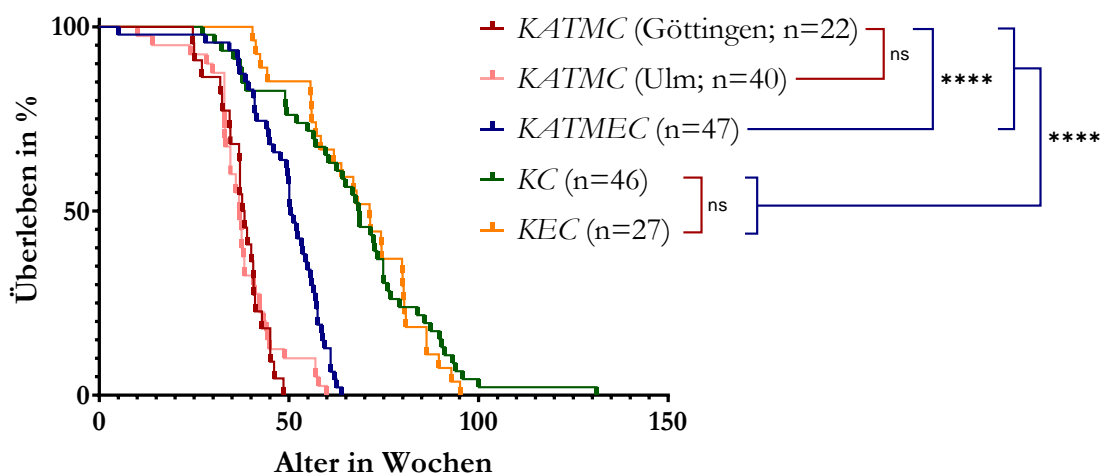


Abbildung 19: Untersuchung des Gesamtüberlebens in *KC*, *KEC*, *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien
 Dargestellt wird das Gesamtüberleben von *KATMC* (Göttinger Kohorte; rot; n = 22), *KATMC* (Ulmer Kohorte; rosa; n = 40), *KATMEC* (blau; n = 47), *KC* (grün; n = 46) und *KEC* (orange; n = 27) in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Signifikanz betrug nach Log-Rank-Test $p < 0,0001$ zwischen beiden *KATMC* Kohorten und den *KATMEC*, *KC* und *KEC* Kohorten. Keine Signifikanz bestand zwischen *KC* und *KEC* Kohorten ($p = 0,75$). Die hier gezeigten Überlebensdaten beziehen sich auf das Gesamtüberleben. *KC* und *KEC* Gesamtüberlebensdaten wurden durch Frau Dr. Shilpa Patil, Frau Waltraut Kopp und Herrn Benjamin Steuber erhoben. *KATMEC* sowie die Göttinger *KATMC* Gesamtüberlebensdaten wurden im Rahmen meiner Doktorarbeit erhoben. Ulmer *KATMC* Gesamtüberlebensdaten wurden uns durch die Arbeitsgruppe Kleger des UKU freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.1.7 Charakterisierung von *KATMC* und *KATMEC* Pankreastumoren *in vivo*

Zur Untersuchung des Einflusses von EZH2 auf das tumorassoziierte Überleben *in vivo* im Kontext der *Atm*-Defizienz, wurden beide Tumor-Survival-Kohorten der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien miteinander verglichen. Dabei umfasste die Tumor-Survival-Kohorte all jene Mäuse der Gesamt-Survival-Kohorte, welche aufgrund eines Pankreastumors mit Schmerzzeichen, Gewichtsverlust $\geq 20\%$ oder durch die Haut tastbarem Tumor geopfert werden mussten. Nicht in die Tumor-Survival-, sondern ausschließlich in die Gesamt-Survival-Kohorten wurden jene Mäuse eingeschlossen, die aufgrund von z. B. neurologischen Auffälligkeiten, wie Krampfanfällen geopfert werden mussten und bei Sektion keine Pankreastumorbildung aufwiesen. Wie in Kapitel 4.1.6, konnte auch zwischen den Tumor-Survival-Kohorten ein signifikant längeres EZH2-abhängiges Überleben ($p < 0,0001$) im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden (siehe Abbildung 20). Hier betrug das mediane Gesamtüberleben der Göttinger *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte ($n = 21$) 38,3 Wochen und das der *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte ($n = 44$) 50,7 Wochen. Das mediane Gesamtüberleben der Ulmer *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte betrug identisch mit dem Gesamt-Survival 36,9 Wochen (siehe Kapitel 4.1.6), da die Tumorzinzidenz in dieser Kohorte 100 % betrug.

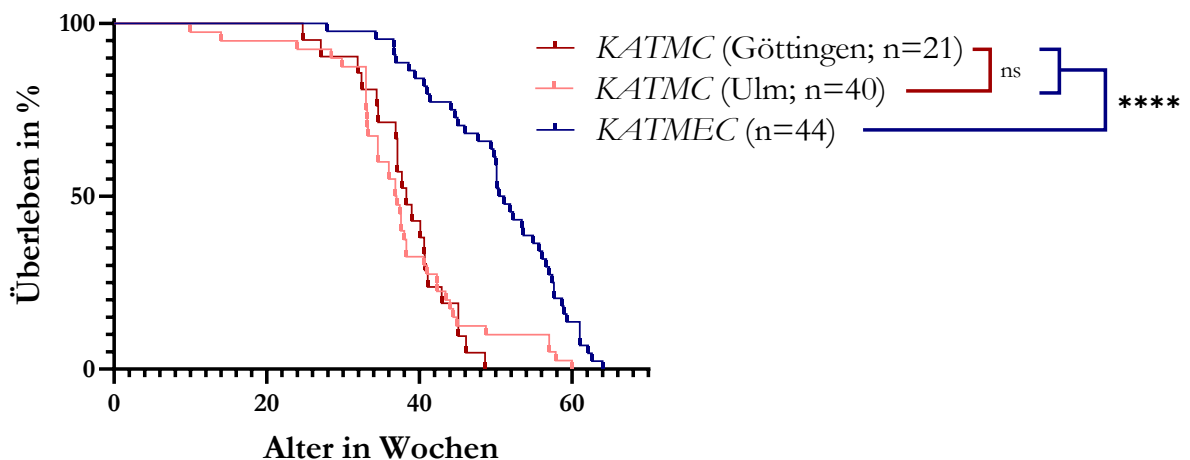


Abbildung 20: Untersuchung des tumorassoziierten Überlebens in *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien Dargestellt wird das tumorassoziierte Überleben von *KATMC* (Göttinger Kohorte; rot; $n = 21$), *KATMC* (Ulmer Kohorte; rosa; $n = 40$) und *KATMEC* (blau; $n = 44$) in einer Kaplan-Meier-Kurve. Die Signifikanz betrug nach Log-Rank-Test $p < 0,0001$ zwischen beiden *KATMC* Kohorten und der *KATMEC* Kohorte. Die hier gezeigten Überlebensdaten beziehen sich auf das tumorassoziierte Überleben. Überlebensdaten der *KATMEC* und der Göttinger *KATMC* Mauslinien wurden im Rahmen meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Heßmann der UMG erhoben. Ulmer *KATMC* Überlebensdaten wurden uns durch die Arbeitsgruppe Kleger des UKU freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung eines EZH2-abhängigen Unterschieds der Tumorzinzidenz im Kontext der *Atm*-Defizienz wurde die Tumor-Survival-Kohorte zur Gesamt-Survival-Kohorte ins Verhältnis gesetzt. Die Tumorzinzidenz der Göttinger *KATMC* Mauslinie betrug bei einer

Gesamt-Survival-Kohorte von 22 Mäusen 95,4 %. Die Tumorzinzidenz der *KATMEC* Mauslinie betrug bei einer Gesamt-Survival-Kohorte von 47 Mäusen 93,6 %. Im Gegensatz dazu betrug die Tumorzinzidenz der *KATMC* Mauslinie der Arbeitsgruppe Kleger bei einer Gesamt-Survival-Kohorte von 40 Mäusen 100 % (siehe Abbildung 21). Die Ergebnisse erreichten keine Signifikanz. Somit konnte *in vivo* kein EZH2-abhängiger Unterschied der Tumorzinzidenz im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden.

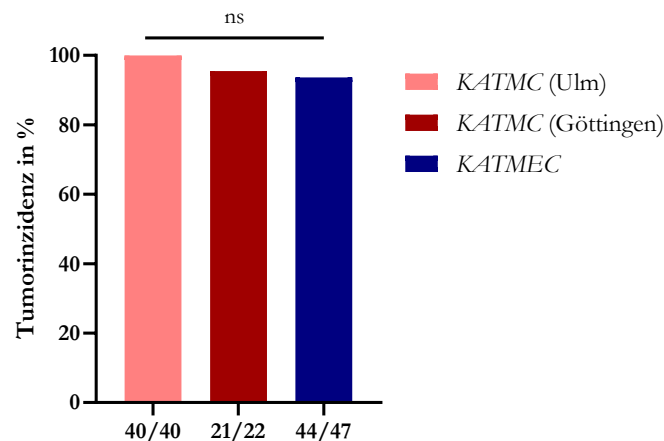


Abbildung 21: Tumorzinzidenz nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz Die Tumorzinzidenz berechnete sich aus dem Verhältnis der Anzahl der Mäuse der Tumor-Survival-Kohorte zur Gesamt-Survival-Kohorte in %. Die Göttinger *KATMC* Daten (rot) zur Tumorzinzidenz umfassten insgesamt 22 Mäuse der Gesamt-Survival-Kohorte, die *KATMEC* Daten (blau) umfassten insgesamt 47 Mäuse der Gesamt-Survival-Kohorte. Beide wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Heßmann in Göttingen erhoben. Die *KATMC* Daten (rosa) zur Tumorzinzidenz umfassten insgesamt 40 Mäuse und wurden in der Arbeitsgruppe Kleger am UKU erhoben und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Signifikanz wurde mittels exaktem Test nach Fisher berechnet (ns = nicht signifikant).

Zur Untersuchung des Einflusses von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz auf das makroskopische Aussehen und Wachstumsverhalten der Pankreastumoren wurden die Tumoren beider transgener Mauslinien gewogen und fotografiert (siehe Methoden: Kapitel 3.1). In beiden Mauslinien waren bei tumortragenden Mäusen die Tumoren zumeist durch die Haut als Vorwölbung sicht- oder tastbar. Makroskopisch stellten sich die Tumoren weißlich und derb sowie häufig in Nachbarorgane wie Leber und Milz infiltrierend dar. Bei makroskopischem Vergleich der Pankreastumoren von *KATMC* und *KATMEC* Mäusen waren keine Unterschiede sichtbar (siehe Abbildung 22).

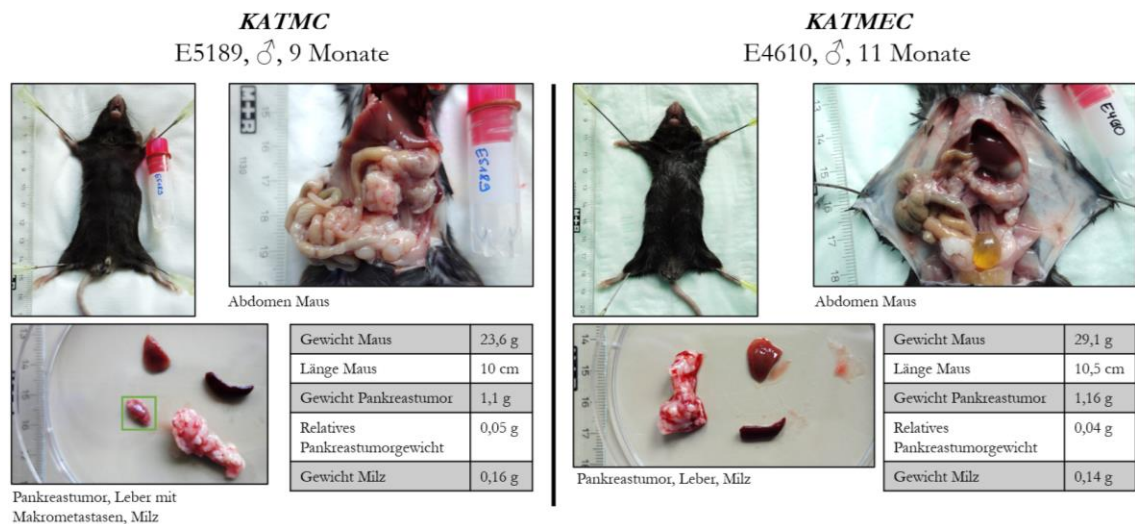


Abbildung 22: Morphologie der Pankreastumoren *in situ* in *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Repräsentative Fotos und Steckbriefe für je eine transgene *KATMC* und *KATMEC* Maus der Tumor-Survival-Kohorten. Darstellung des geöffneten Abdomens mit Pankreastumor *in situ* sowie Darstellung des entnommenen Pankreastumors und der Milz *in toto* sowie eines Leberlappens. Markierung von Lebermetastasen eines Leberlappens (grünes Rechteck) in *KATMC* E5189. Beigefügte tabellarische Auflistung der erhobenen Daten von *KATMC* E5189 und *KATMEC* E4610.

Nach Opferung der Mäuse wurden das Mausgewicht, das absolute Pankreastumorgewicht, und das Gewicht der Milz bestimmt, um EZH2-abhängige Unterschiede der Survival-Kohorten zum Todeszeitpunkt im Kontext der *Atm*-Defizienz zu untersuchen. Da eine Maus der Göttinger *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte selbst verstorben war, konnten nur die Gewichte von insgesamt 20 Mäusen für die Göttinger *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte einbezogen werden. Dabei ergab sich ein signifikant geringeres Mausgewicht ($p = 0,0179$) der *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte mit einem Mittelwert von 24,94 g im Vergleich zur *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte mit einem Mittelwert von 27,25 g. Aus dem Verhältnis von absolutem Pankreastumorgewicht zu Mausgewicht wurde das relative Pankreastumorgewicht berechnet. Jedoch konnten keine EZH2-abhängigen Unterschiede beim absoluten und relativen Pankreastumorgewicht sowie beim Milzgewicht zwischen beiden Tumor-Survival-Kohorten im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden (siehe Abbildung 23).

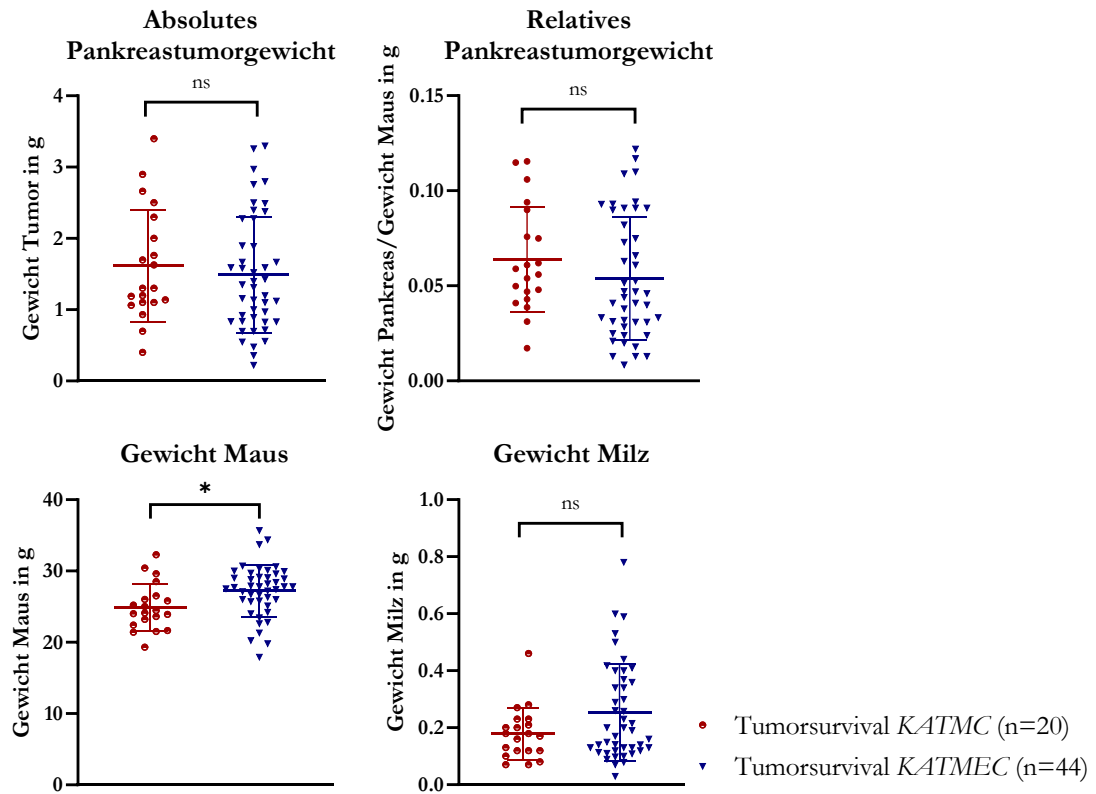


Abbildung 23: Vergleich von absolutem und relativem Pankreastumorgewicht, Mausgewicht und Milzgewicht zwischen Tumor-Survival-Kohorten von *KATMC* und *KATMEC* Darstellung der ermittelten Gewichte zum Todeszeitpunkt (Mausgewicht, absolutes und relatives Pankreastumorgewicht, Milzgewicht) der Tumor-Survival-Kohorten von *KATMC* (Göttingen; n = 20) und *KATMEC* (n = 44). Die Untersuchung erfolgte bei 20 Mäusen der Göttinger *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte, nach Ausschluss einer selbst verstorbenen Maus der *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte. Das relative Pankreastumorgewicht wurde aus dem Verhältnis Pankreastumorgewicht zu Mausgewicht berechnet. Die Signifikanz zwischen beiden Kohorten für das Mausgewicht betrug nach Log-Rank-Test $p = 0,0179$. Jeder Punkt entspricht einer Maus. ns = nicht signifikant.

Anschließend wurden Hämatoxylin und Eosin-Färbungen der Pankreastumoren angefertigt, um EZH2-abhängige Unterschiede der PDAC Morphologie zwischen *KATMC* und *KATMEC* mikroskopisch darzustellen. Die Tumoren zeigten sich stark dedifferenziert und wiesen nekrotische Areale sowie große Anteile fibroinflammatorischen Stromas auf (siehe Abbildung 24). Allerdings konnten keine EZH2-abhängigen Unterschiede im Kontext der *Atm*-Defizienz in Bezug auf die mikroskopische Morphologie der Tumoren festgestellt werden.

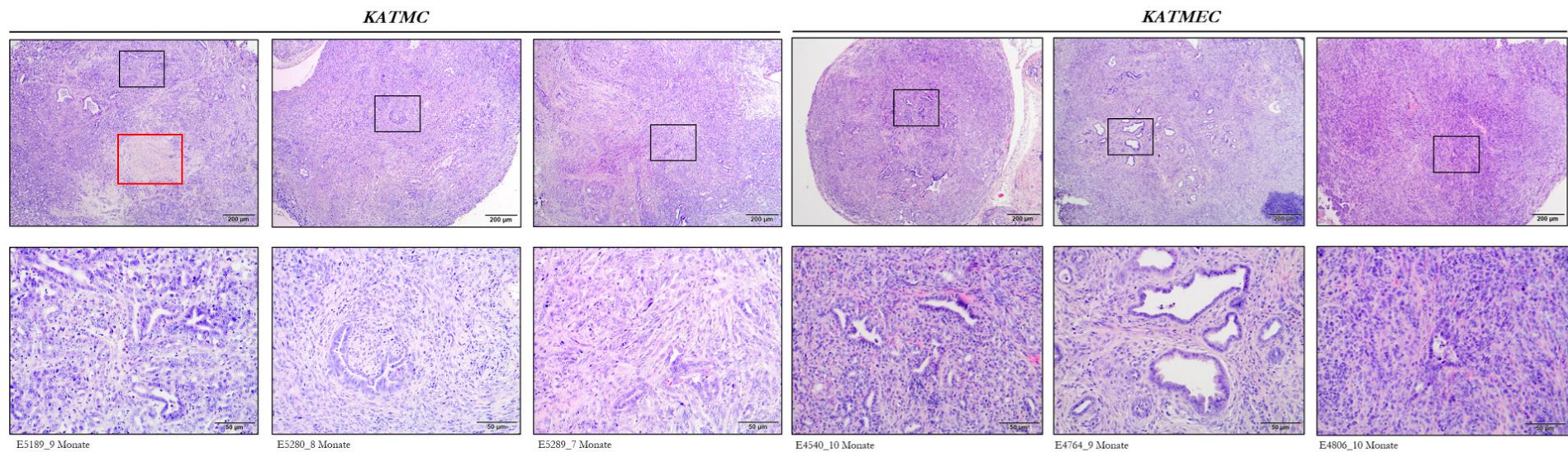


Abbildung 24: HE-Färbung von Pankreastumoren in *KATMC* und *KATMEC* Mäusen Darstellung von je drei repräsentativen HE-Färbungen von Pankreastumoren der *KATMC* und *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorten. Es zeigten sich dedifferenzierte Tumoren mit nekrotischen Arealen (rotes Rechteck). Die Fotos wurden in 40-facher und 200-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Nummer und Alter beschriftet.

Sowohl in der *KATMC* als auch in der *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte konnten teilweise Makrometastasen in der Leber festgestellt werden. Die Untersuchung auf sichtbare, makrometastatische Leber- und Zwerchfellläsionen erfolgte zum Todeszeitpunkt nach Eröffnung des Abdomens. PDAC Makrometastasen der Leber kamen in der Tumor-Survival-Kohorte der *KATMC* Mauslinie in 35 % der Fälle vor ($n = 20$). Im Gegensatz dazu traten in der Tumor-Survival-Kohorte der *KATMEC* Mauslinie Makrometastasen der Leber in 27,3 % der Fälle ($n = 44$) auf. Dieser Unterschied erreichte nach Berechnung mittels exaktem Test nach Fisher keine Signifikanz ($p = 0,56$). Makrometastasen des Zwerchfells traten nur in der Tumor-Survival-Kohorte der *KATMEC* Mauslinie in 6,7 % der Fälle ($n = 44$) auf. Auch hier erreichte der Unterschied in der Makrometastasierung keine Signifikanz ($p = 0,54$) (siehe Abbildung 25).

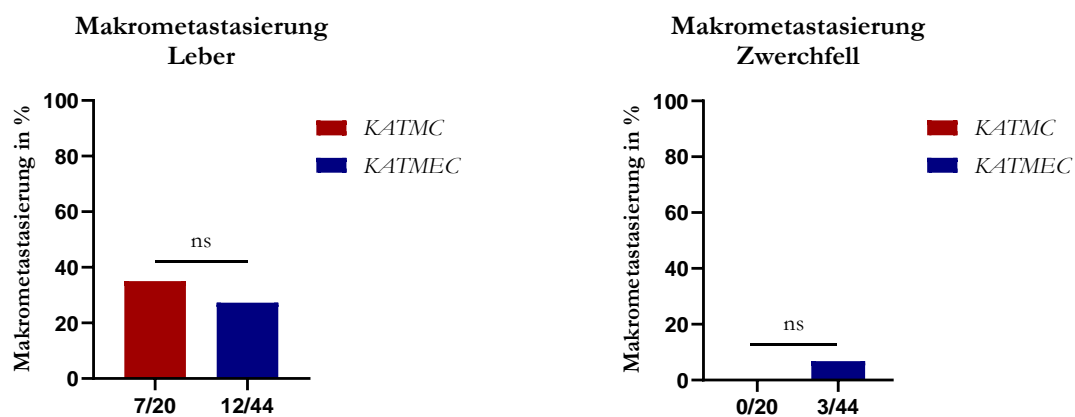


Abbildung 25: Makrometastasierung von *KATMC* und *KATMEC* Pankreastumoren in Leber und Zwerchfell Graphische Darstellung der Makrometastasierung in Leber und Zwerchfell in der Göttinger *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte (rot; $n = 20$) und in der *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte (blau; $n = 44$). Nach Berechnung mittels exaktem Test nach Fisher wurde keine Signifikanz erreicht (ns = nicht signifikant).

Repräsentative Fotos der Makro- und Mikrometastasierung der Leber und des Zwerchfells wurden in Abbildung 26 dargestellt. Zur Quantifizierung der Mikrometastasierung wurden alle Mäuse der Tumor-Survival-Kohorten auf Mikrometastasen der Pankreastumoren in die Leber untersucht. Somit sollten EZH2-abhängige Unterschiede der Metastasierung im Kontext der *Atm*-Defizienz analysiert werden. Hierfür wurden histologische Leberschnitte der *KATMC* und *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorten ausgewertet und miteinander verglichen (siehe Methoden: Kapitel 3.4.3). Waren in der HE-Färbung Mikrometastasen umgeben von gesundem Lebergewebe in mindestens einer der drei Schnittebenen detektierbar, wurden die Mäuse positiv für eine Mikrometastasierung gewertet. Mikrometastasen der Pankreastumoren in die Leber konnten in der *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte in 85 % der Fälle ($n = 20$) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten in der *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte Mikrometastasen in 72 % der Fälle ($n = 44$) nachgewiesen werden. Die Abnahme der Metastasierung nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz erreichte nach Berechnung mittels exaktem Test nach Fisher keine Signifikanz ($p = 0,35$) (siehe Abbildung 27).

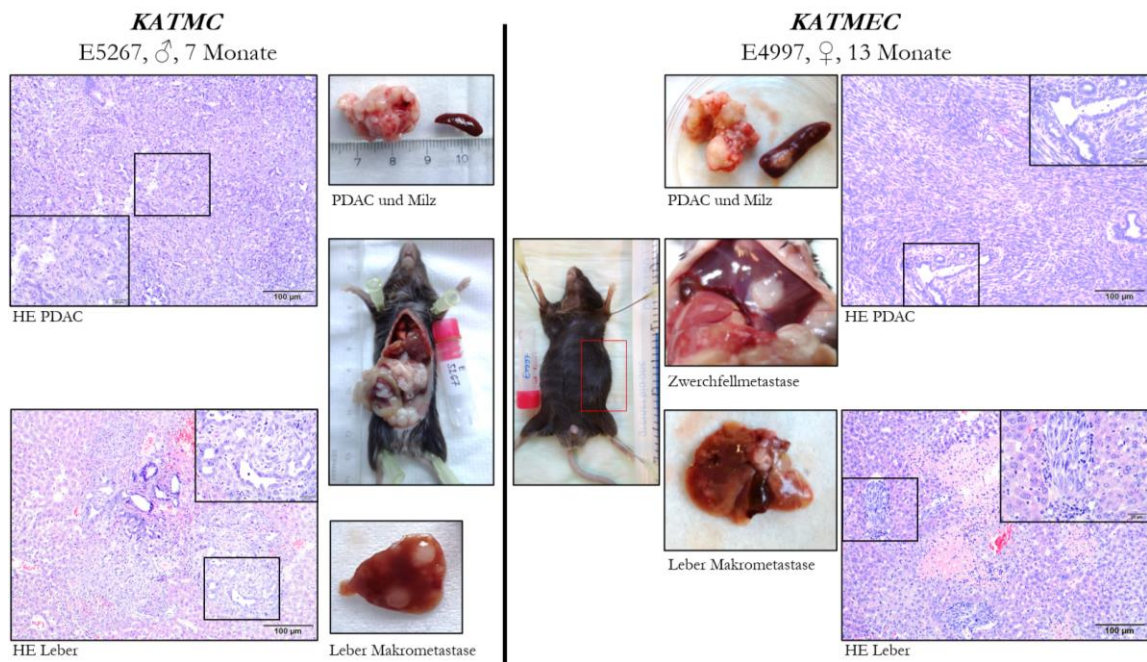


Abbildung 26: Makro- und Mikrometastasierung im Kontext der *Atm*-Defizienz Repräsentative Fotos von *KATMC* E5267 und *KATMEC* E4997. Zu sehen war eine Vorwölbungen des Abdomens (rotes Rechteck) durch Pankreastumorbildung. Außerdem Fotos der seziierten Pankreastumoren und der Milz *in toto*. Zudem wurden Makrometastasen der Leber und des Zwerchfells sowie HE-Färbungen der Pankreastumoren und der Lebermetastasen in 100-facher und 400-facher Vergrößerung dargestellt.

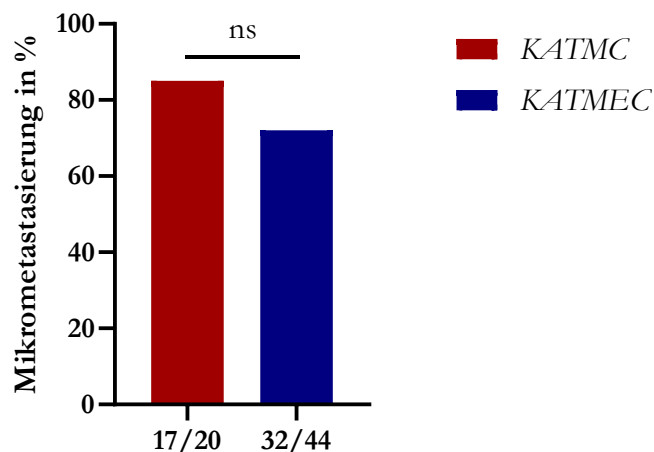


Abbildung 27: Quantifizierung der Mikrometastasierung von *KATMC* und *KATMEC* Pankreastumoren in die Leber Quantifizierung und Auswertung der Mikrometastasierung der Pankreastumoren in die Leber. Darstellung der Ergebnisse von *KATMC* (rot) und *KATMEC* (blau) in Prozent. Die Mikrometastasierung in 20 *KATMC* Mäusen (Göttinger Kohorte) betrug 85 %. Die Mikrometastasierung in 44 *KATMEC* Mäusen betrug 72 %. Nach Berechnung mittels exaktem Test nach Fisher wurde keine Signifikanz erreicht (ns = nicht signifikant).

Zusammenfassend konnte bei der Charakterisierung von EZH2 in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen *in vivo* im Gegensatz zu transgenen Mäusen mit ATM-Wildtyp-Expression ein signifikant verlängertes Gesamt- und tumorassoziertes Überleben nach EZH2-Verlust gezeigt werden. Signifikante EZH2-abhängige Unterschiede in der Tumorinzidenz sowie in der Metastasierung

waren nicht vorhanden. Jedoch waren Mäuse mit *Atm*-defizienten Tumoren und *Ezh2*-Wildtyp zum Todeszeitpunkt signifikant leichter, obwohl sich die Mäuse beider Mauslinien in den ersten zwölf Wochen gleich entwickelten. In der Pankreaskarzinogenese konnten EZH2-abhängige Unterschiede in der Proliferationsrate gezeigt werden. Außerdem waren EZH2-abhängige Unterschiede in der E-Cadherin-Regulation während der Pankreaskarzinogenese und in den Pankreastumoren vorhanden.

4.2 Einfluss des EZH2-Verlusts auf die Progression *Atm*-defizienter PDAC Subtypen *in vitro*

Durch *In-vitro*-Experimente wurde in dieser Arbeit der Verlust von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz funktionell charakterisiert. Hierfür wurden primäre Pankreaskarzinomzellen genutzt, die aus tumortragenden *KATMC* Mäusen durch die Arbeitsgruppe Kleger des UKU isoliert wurden. Diese Zellen exprimierten hohe EZH2 Level. Durch genetische Inhibition von EZH2 sowie pharmakologische Inhibition der EZH2 Methyltransferaseaktivität, wurden funktionelle Analysen zur Bestimmung der Zellviabilität und der Apoptose durchgeführt. Des Weiteren wurden primäre Pankreaskarzinomzellen aus *KATMEC* Mäusen isoliert, um die Ergebnisse der funktionellen Experimente zu verifizieren.

4.2.1 Charakterisierung von *KATMC* Zelllinien nach *Ezh2*-Knockdown

Zur Untersuchung des Einflusses von EZH2 auf die Progression *Atm*-defizienter PDAC Subtypen *in vitro*, wurden zunächst primäre Pankreaskarzinomzellen verwendet, die im Weiteren als *KATMC 1–3* Zelllinien bezeichnet werden. Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben, wiesen diese Zelllinien konditional (*p48Cre*) aktiviertes KRAS und eine *Atm*-Defizienz auf. Die Morphologie der Zelllinien variierte untereinander. *KATMC 1* und *2* wuchsen vorwiegend in Zellclustern und konfluieren zu Zellteppichen. *KATMC 3* Zellen wuchsen hingegen einzeln und hatten eine spindelförmige Morphologie (siehe Abbildung 28). Zudem unterschieden sich die drei Zelllinien in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit. *KATMC 1* und *2* mussten deutlich häufiger passagiert werden als *KATMC 3*. Alle drei Zelllinien exprimierten vergleichbare Level an EZH2 (siehe Abbildung 29). Um den Einfluss der EZH2 Expression auf die Morphologie *Atm*-defizienter PDAC Zellen zu untersuchen, wurde *Ezh2* in diesen Zelllinien mittels siRNA Technologie geblockt. Erste Auswirkungen auf die Zellmorphologie zeigten sich unter dem Mikroskop 48 h nach Transfektion mittels siRNA (siehe Abbildung 28). Hier konnte in den transfizierten Tumorzellen, im Vergleich zur Kontrolle, mehr Zellsterben beobachtet werden. Die Zellen waren kleiner, runder und lösten sich vom Boden ab. Besonders viel Zellsterben konnte in *KATMC 3* gezeigt werden.

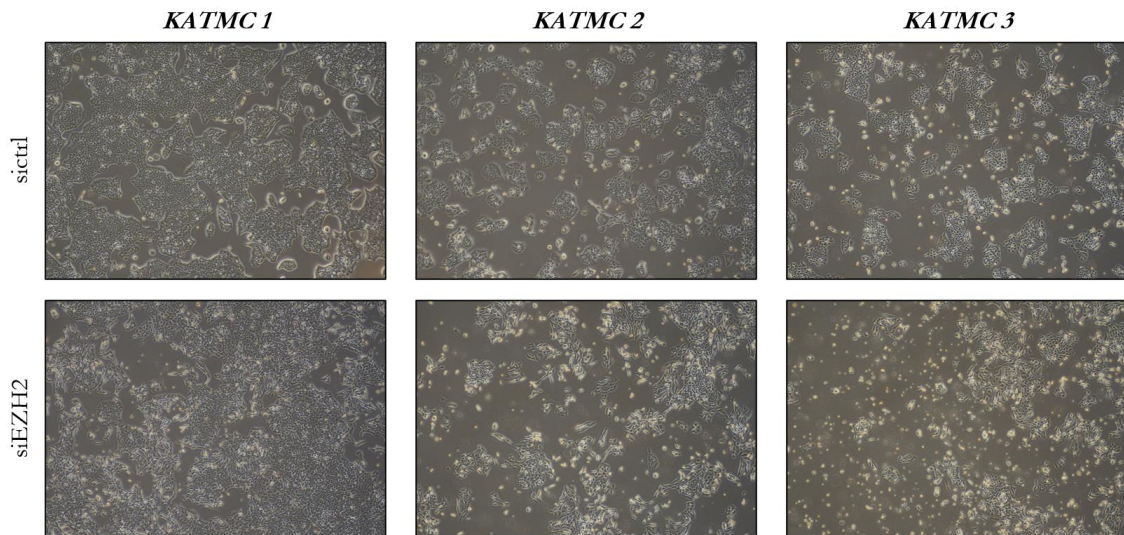


Abbildung 28: Zellmorphologie von *KATMC* Zelllinien nach 48 h *Ezh2*-Knockdown Veränderung der Zellmorphologie nach EZH2-Verlust in den Zelllinien *KATMC 1–3*. Die Fotos wurden nach 48 h *Ezh2*-Knockdown mittels siRNA bei 40-facher Vergrößerung (Lichtmikroskop CKX-53) aufgenommen. Behandlungskontrolle siehe Abbildung 29.

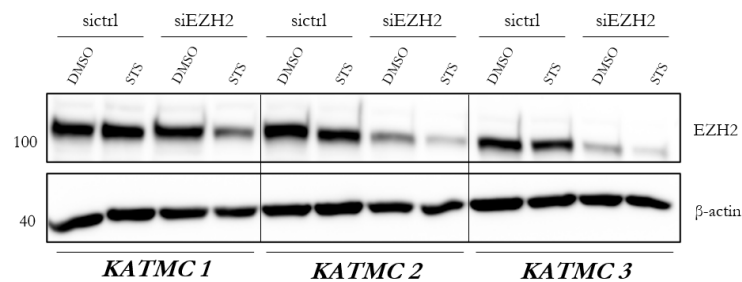


Abbildung 29: Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns in *KATMC 1–3* Western Blot von EZH2 zur Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns in *KATMC 1–3* für 48 h in Abbildung 28 (DMSO Kontrollen). Zur Ladekontrolle diente β -actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

Um zu untersuchen, ob das Zellsterben nach *Ezh2*-Knockdown auf eine gesteigerte Induktion von Apoptosemechanismen zurückzuführen ist, wurde die Apoptoserate mittels Annexin-PI-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie in *KATMC 1–3* bestimmt. Hierfür erfolgte der *Ezh2*-Knockdown für insgesamt 48 h. Danach wurden die Zellen zusätzlich für 24 h parallel mit Staurosporin (STS) behandelt, um Apoptose zu induzieren (siehe Abbildung 30).

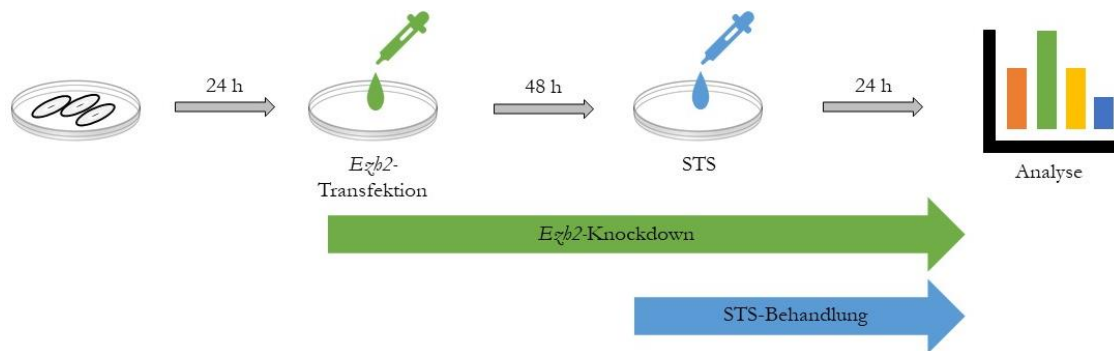


Abbildung 30: Behandlungsschema zur Apoptosemessung nach *Ezh2*-Knockdown in *KATMC 1-3* Die zu untersuchenden Zellen wurden ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein *Ezh2*-Knockdown mittels siRNA Technologie. Nach weiteren 48 h erfolgte zusätzlich die Behandlung mit 400 nM Staurosporin (STS). Nach erneuten 24 h erfolgte die Annexin-PI-Färbung und die Analyse im Durchflusszytometer.

Ohne STS-Behandlung konnte weder in der *Ezh2*-Knockdown-Kontrolle noch nach *Ezh2*-Knockdown eine Zunahme der Apoptoserate beobachtet werden. Nach STS-Behandlung in der *Ezh2*-Knockdown-Kontrolle war eine geringe Zunahme früh apoptotischer Zellen zu sehen. Nach Knockdown von *Ezh2* und Apoptoseinduktion mittels 400 nM STS erfolgte hingegen eine starke Zunahme der früh apoptotischen Zellen (siehe Abbildung 31). Die größte Zunahme von früh apoptotischen Zellen nach *Ezh2*-Knockdown und STS-Behandlung war in *KATMC 1* zu beobachten, im Gegensatz zum geringeren Zellsterben in Abbildung 28 nach *Ezh2*-Knockdown.

Zur Überprüfung des Knockdowns und der Apoptoseinduktion wurden Proteinlysate desselben Versuchsansatzes mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 32). Die Abnahme der EZH2 Expression nach *Ezh2*-Knockdown konnte sowohl nach STS-Behandlung als auch in der DMSO-Kontrolle gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Expression des Apoptosemarkers *cleaved caspase 3* (CC3) ermittelt. Nach STS-Behandlung zeigte sich eine Hochregulation von CC3, jedoch ohne EZH2-abhängige Unterschiede. Allerdings zeigte sich in der DMSO-Kontrolle, passend zum vermehrten Zellsterben nach *Ezh2*-Knockdown in *KATMC 2* und *3* (siehe Abbildung 28), eine Zunahme der CC3-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Zusammenfassend konnte nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz eine Zunahme der Apoptoserate zellmorphologisch, als auch durch spezifische Darstellung der Apoptoserate durch Annexin-PI-Färbung und Analyse im Durchflusszytometer gezeigt werden. Die Apoptoseinduktion nach STS-Behandlung schien dabei aber CC3-unabhängig zu erfolgen.

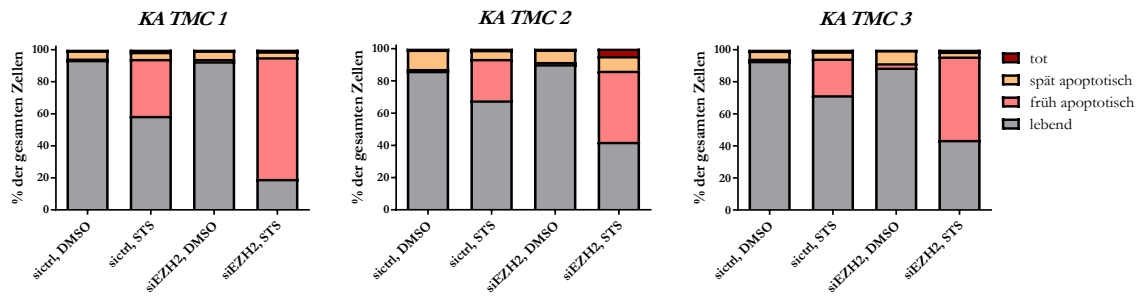


Abbildung 31: Untersuchung der Apoptoserate nach *Ezh2*-Knockdown in *KATMC 1–3* Repräsentative Darstellung der Analyse von *KATMC 1–3* nach *Ezh2*-Knockdown für 48 h und parallelem *Ezh2*-Knockdown und 400nM STS-Behandlung für 24 h. Die Analyse erfolgte nach Annexin-PI-Färbung im Durchflusszytometer. Behandlungskontrolle siehe Abbildung 32.

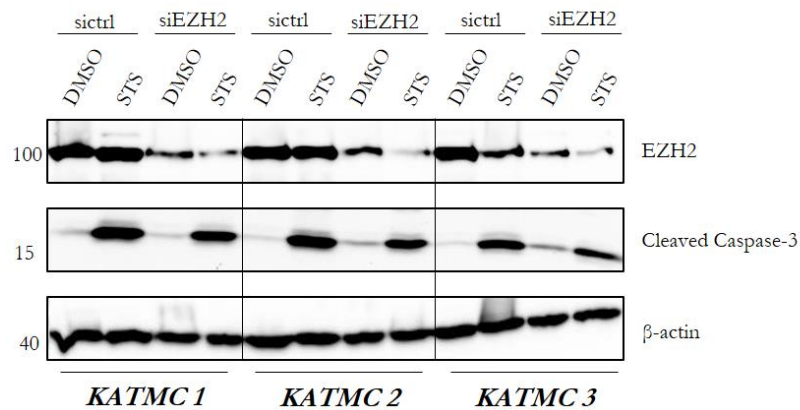


Abbildung 32: Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns und der Apoptoseinduktion nach Annexin-PI-Färbung und Analyse im Durchflusszytometer Western Blot von EZH2 zur Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns in *KATMC 1–3* für 48 h sowie zur Bestätigung der Apoptoseinduktion mit Hochregulation von CC3 nach STS-Behandlung. Zur Ladekontrolle diente β -actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

Zur Analyse der Zellviabilität nach *EZH2*-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz wurden *KATMC 1–3* mittels MTT-Test untersucht (siehe Methoden: Kapitel 3.5.8). Hierfür wurden 4000 Zellen pro Well ausgesät und für 48 h mit gegen *Ezh2* gerichteter siRNA transfiziert. Der MTT-Test wurde dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt. Jedoch ergab sich in keiner der drei Zelllinien ein signifikanter Unterschied der Zellviabilität zwischen Kontrolle und *Ezh2*-Knockdown. Dies war z. T. bedingt durch eine hohe Standardabweichung basierend auf unkontrollierbaren Zellverlusten beim Absaugen und Wechseln des Mediums (siehe Abbildung 33). Durch Auftragen von Proteinlysaten im Western Blot erfolgte die Kontrolle des *Ezh2*-Knockdowns (siehe Abbildung 34).

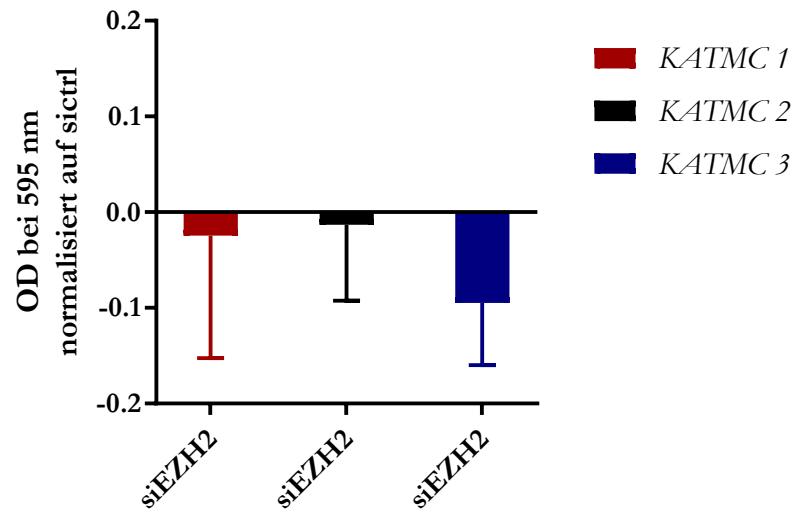


Abbildung 33: Untersuchung der Zellviabilität nach *Ezh2*-Knockdown im Kontext der *Atm*-Defizienz
Graphisch wurden drei MTT-Tests nach *Ezh2*-Knockdown in *KATMC 1–3* zusammengefasst. Ausgesät wurden 4000 Zellen pro Well in fünffacher Bestimmung pro Kondition. Danach wurde für 48 h mit siRNA für *Ezh2* transfiziert. Die Auswertung erfolgte über das Photometer PHOMo bei 595 nm Wellenlänge (OD = optische Dichte). Alle Werte wurden auf die jeweilige Knockdown Kontrolle (sictrl) normalisiert. Zur Kontrolle des Knockdowns erfolgte bei jeder Wiederholung des MTT-Tests eine Kontrolle des *Ezh2*-Knockdowns mittels Western Blot siehe Abbildung 34.

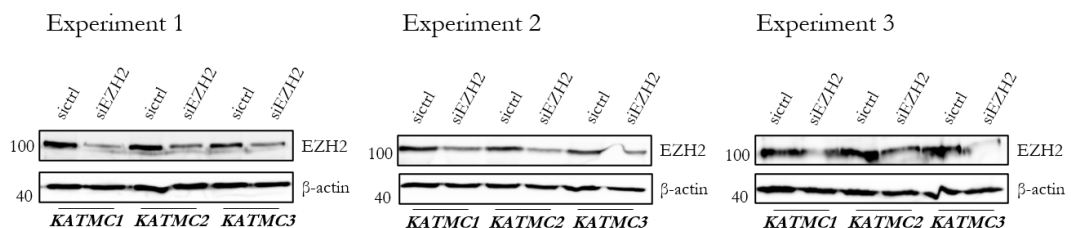


Abbildung 34: Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns in *KATMC 1–3* für MTT-Test Western Blot von EZH2 zur Bestätigung des *Ezh2*-Knockdowns für 48 h in *KATMC 1–3* für drei MTT-Tests siehe Abbildung 33 (sictrl = *Ezh2*-Knockdown Kontrolle). Zur Ladekontrolle diente β -actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

4.2.2 Charakterisierung von *KATMC* Zelllinien nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 durch EPZ-6438

Um zu untersuchen, ob die EZH2 Methyltransferaseaktivität entscheidend für die Apoptoseinduktion *in vitro* nach *Ezh2*-Knockdown im Kontext der *Atm*-Defizienz ist, wurde die Methyltransferaseaktivität von EZH2 in den Zelllinien *KATMC 1–3* pharmakologisch mit EPZ-6438 (Tazemetostat) inhibiert. Wie in Abbildung 35 gezeigt und im Einklang mit den pharmakologischen Eigenschaften des Inhibitors (Knutson et al. 2014), führte die Behandlung mit EPZ-6438 nicht zu einer Reduktion der EZH2-Expression, sondern hemmte spezifisch dessen Methyltransferaseaktivität. Dies äußerte sich in einem Rückgang der H3K27me3 Expression im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen bei annähernd gleichbleibender Expression von H3. Trotz erfolgreicher Inhibition der EZH2

Methyltransferaseaktivität konnte nach 72 h Behandlung der Zelllinien mit zwei verschiedenen EPZ-6438 Konzentrationen im Vergleich zur DMSO Kontrolle keine Veränderung der Zellmorphologie und kein vermehrter Zelluntergang beobachtet werden (siehe Abbildung 36). Zudem fiel auf, dass die *KATMC 3* DMSO Kontrolle hier eine spindelförmigere Morphologie aufwies als die *KATMC 3* Kontrolle in Abbildung 28, was vermutlich durch unterschiedliche Stocks und Passagen bedingt war.

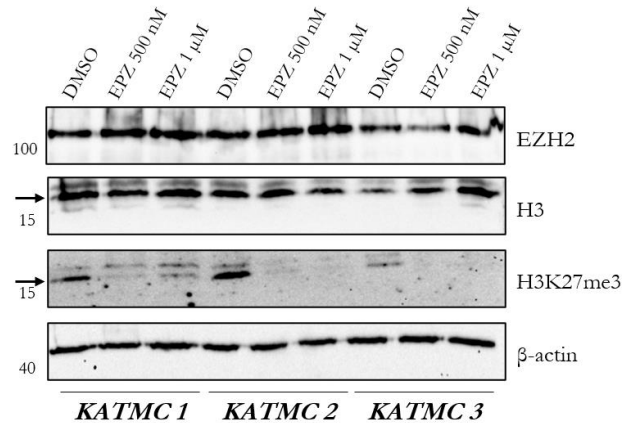


Abbildung 35: Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz Western Blot von Proteinlysaten aus *KATMC 1–3* als Behandlungskontrolle für Abbildung 36 nach 72 h EPZ-6438 Behandlung mit 500 nM oder 1 μM. Die Effektivität der Behandlung wurde durch eine Abnahme der Expression von H3K27me3 nach EPZ-6438 Behandlung gezeigt. Dabei blieb die Expression von H3 stabil. Zur Ladekontrolle diente β-actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

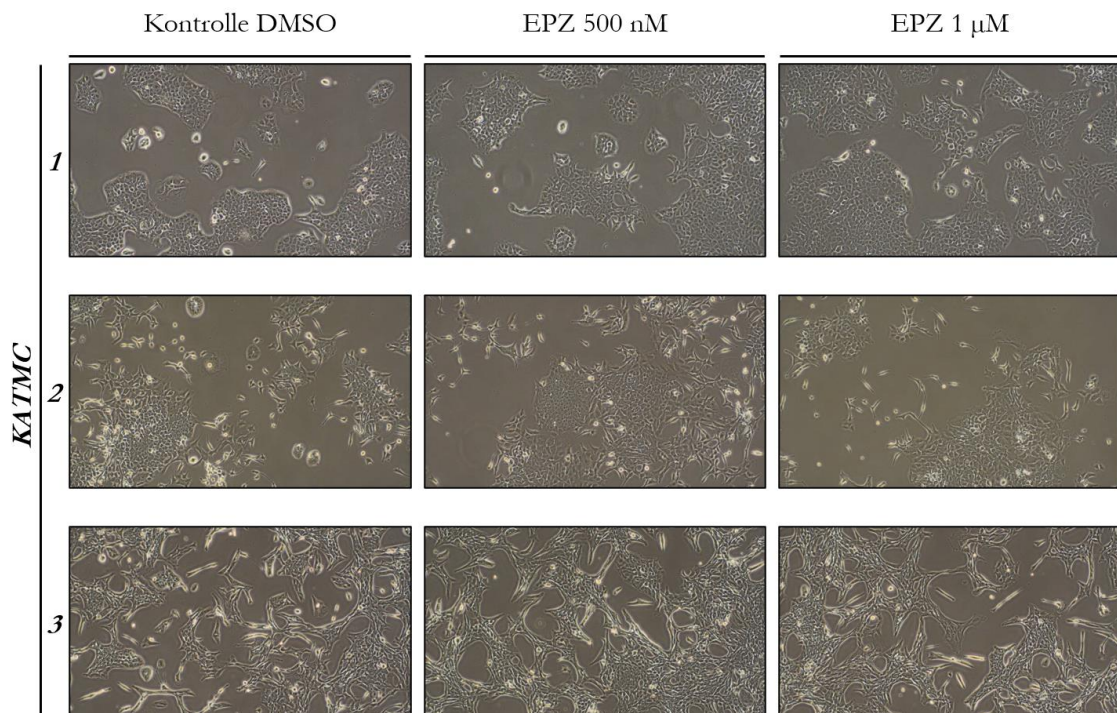


Abbildung 36: Zellmorphologie von *KATMC* Zelllinien nach 72 h EPZ-6438 Behandlung Darstellung von *KATMC 1–3* Zelllinien nach 72 h EPZ-6438 Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Fotos wurden bei 40-facher Vergrößerung (Lichtmikroskop CKX-53) aufgenommen. Behandlungskontrolle siehe Abbildung 35.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der *KATMC 1–3* Zelllinien *in vitro* wurde nach EPZ-6438 Behandlung mit 500 nM und 1 μ M für 72 h und paralleler EPZ-6438 und STS-Behandlung für weitere 24 h (siehe Abbildung 37) die Apoptoserate gemessen. Hierdurch sollte untersucht werden, ob es zu einer Zunahme der Apoptoserate nach pharmakologischer Inhibition der EZH2 Methyltransferaseaktivität im Kontext der *Atm*-Defizienz kommt. Nach STS-Behandlung konnte eine Zunahme früh und spät apoptotischer Zellen durch Annexin-PI-Färbung und Auswertung im Durchflusszytometrie festgestellt werden. Jedoch konnte kein Unterschied in der Apoptoserate nach EPZ-6438 Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gezeigt werden (siehe Abbildung 38). Die erfolgreiche Inhibition wurde erneut durch Rückgang der H3K27me3 Expression in *KATMC 1–3* bestätigt. Zudem konnte eine Zunahme der Expression von H3 nach STS-Behandlung gezeigt werden. Ebenso zeigte sich eine Zunahme von H3K27me3 nach STS-Behandlung, die vermutlich durch die Hochregulation von H3 entstand (siehe Abbildung 39). Somit konnte keine Zunahme der Apoptoserate nach EPZ-6438 Behandlung im Kontext der *Atm*-Defizienz beobachtet werden. Die spezifische Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 war somit nicht ausreichend, um den gleichen Effekt wie nach *Ezh2*-Knockdown, zu erreichen.

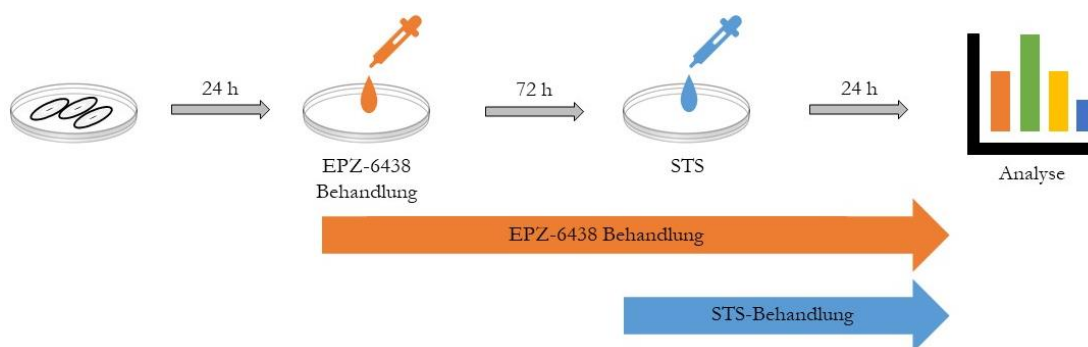


Abbildung 37: Behandlungsschema zur Apoptosemessung nach EPZ-6438 Behandlung Zellen wurden ausgesät. Nach 24 h erfolgte eine Behandlung mit EPZ-6438. Nach weiteren 72 h erfolgte zusätzlich die Behandlung mit 400 nM Staurosporin (STS). Nach erneuten 24 h erfolgte die Annexin-PI-Färbung und die Analyse im Durchflusszytometer.

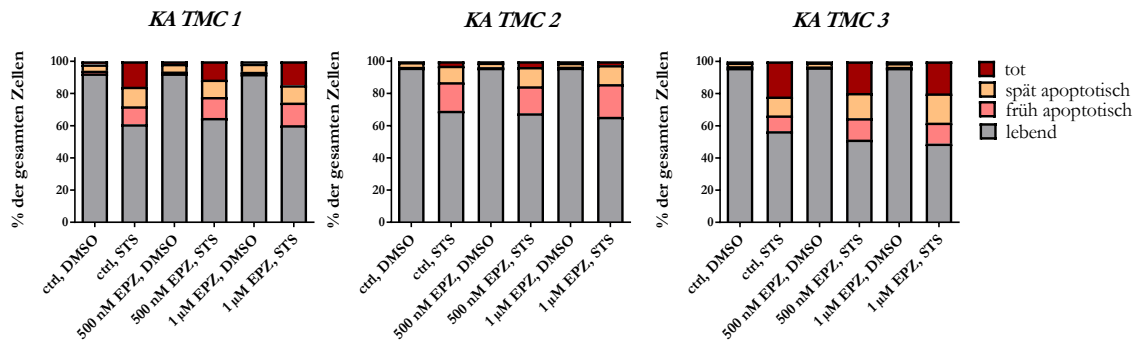


Abbildung 38: Bestimmung der Apoptoserate nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität im Kontext der *Atm*-Defizienz Repräsentative Analyse einer Annexin-PI-Färbung nach EPZ-6438 Behandlung für 72 h und paralleler EPZ-6438 Behandlung und 400 nM STS-Behandlung für weitere 24 h sowie darauffolgender Analyse im Durchflusszytometer. In allen drei verwendeten Zelllinien *KATMC 1–3* konnte kein Unterschied in der Apoptoserate nach Hemmung der EZH2-Methyltransferaseaktivität von EZH2 festgestellt werden. Behandlungskontrolle siehe Abbildung 39.

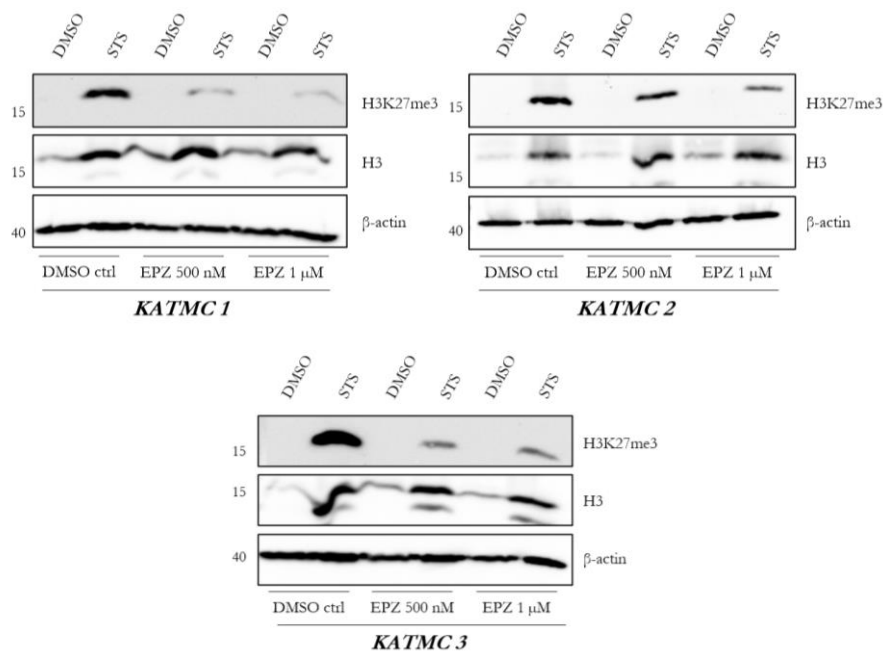


Abbildung 39: Kontrolle der Effektivität der EPZ-6438 Behandlung in *KATMC 1–3* nach Apoptosemessung Konzentrationsabhängiger Rückgang der H3K27me3 Konzentration nach EPZ-6438 Behandlung mit 500 nM und 1 µM in *KATMC 1–3*. Durch starke Induktion von H3K27me3 und H3 nach 400 nM STS-Behandlung wurde die Expression von H3K27me3 in den DMSO Kontrollen (= DMSO ctrl) weitestgehend überstrahlt. Zur Ladekontrolle diente β-actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

Weiterhin wurde der Einfluss des Verlusts der EZH2 Methyltransferaseaktivität auf die Zellviabilität im Kontext der *Atm*-Defizienz untersucht. Ein MTT-Test mit EPZ-6438 Behandlung wurde zweimal durchgeführt. Nach 500 nM und 1 µM EPZ-6438 Behandlung in *KATMC 1–3* konnte bei 3000 ausgesäten Zellen in der Fünffachbestimmung (siehe Methoden: Kapitel 3.5.8) keine signifikante Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur DMSO Kontrolle beobachtet werden (siehe Abbildung 40). Die Kontrolle der Behandlung erfolgte erneut über

Proteinlysate, aufgetragen im Western Blot, die einen Rückgang von H3K27me3 zeigten (siehe Abbildung 41).

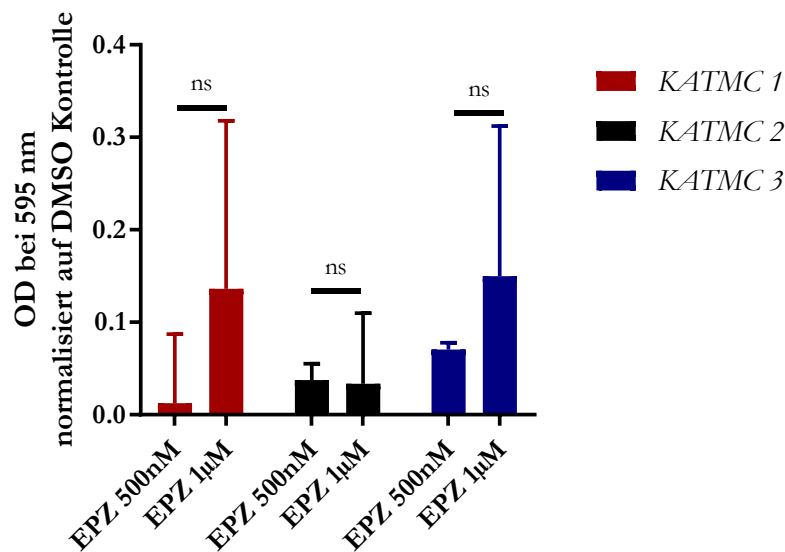


Abbildung 40: Untersuchung der Zellviabilität nach Hemmung der EZH2 Methyltransferaseaktivität Zusammenfassung von zwei MTT-Tests nach EPZ-6438 Behandlung für 72 h in *KATMC 1–3*. Ausgesät wurden 3000 Zellen in fünffacher Bestimmung. Danach wurde für 72 h mit 500 nM und 1 μM EPZ-6438 sowie DMSO als Kontrolle behandelt. Die Auswertung erfolgte über das Photometer PHOmo bei 595 nm Wellenlänge (OD = optische Dichte). Alle Werte wurden auf die jeweilige DMSO Kontrolle normalisiert. Zur Überprüfung der EPZ-6438 Behandlung erfolgte bei jeder Wiederholung des MTT-Tests eine Kontrolle mittels Western Blot siehe Abbildung 41.

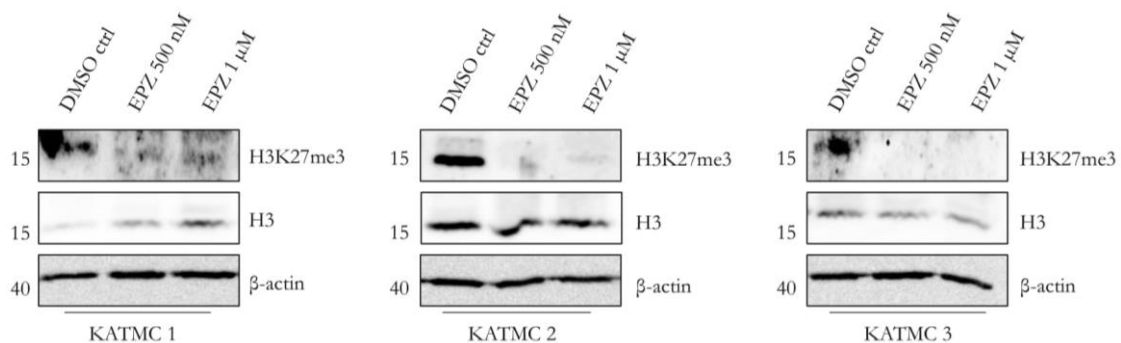


Abbildung 41: Kontrolle der Effektivität der EPZ-6438 Behandlung in *KATMC 1–3* für MTT-Test Zur Kontrolle der EPZ-6438 Behandlung (500 nM und 1 μM) (siehe Abbildung 40) erfolgte bei beiden MTT-Tests eine Kontrolle durch Proteinlysate im Western Blot (ctrl = Kontrolle). Ein Rückgang der H3K27me3 Konzentration konnte in allen drei Zelllinien gezeigt werden. Markerhöhe links in Kilodalton.

4.2.3 Etablierung primärer Pankreaskarzinomzelllinien mit *Ezh2*-Defizienz im Kontext der *Atm*-Defizienz

Zur Validierung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 wurden primäre murine Pankreaskarzinomzellen aus tumortragenden *KATMEC* Mäusen (charakterisiert in Kapitel 4.1) isoliert. Die Isolation (siehe Methoden: Kapitel 3.5.3) erfolgte aus drei Mäusen der *KATMEC* Tumor-

Survival-Kohorte, dargestellt in Abbildung 42. Die primären Pankreaskarzinomzelllinien wurden nummeriert und als *KATMEC 1*, *3* und *4* bezeichnet.

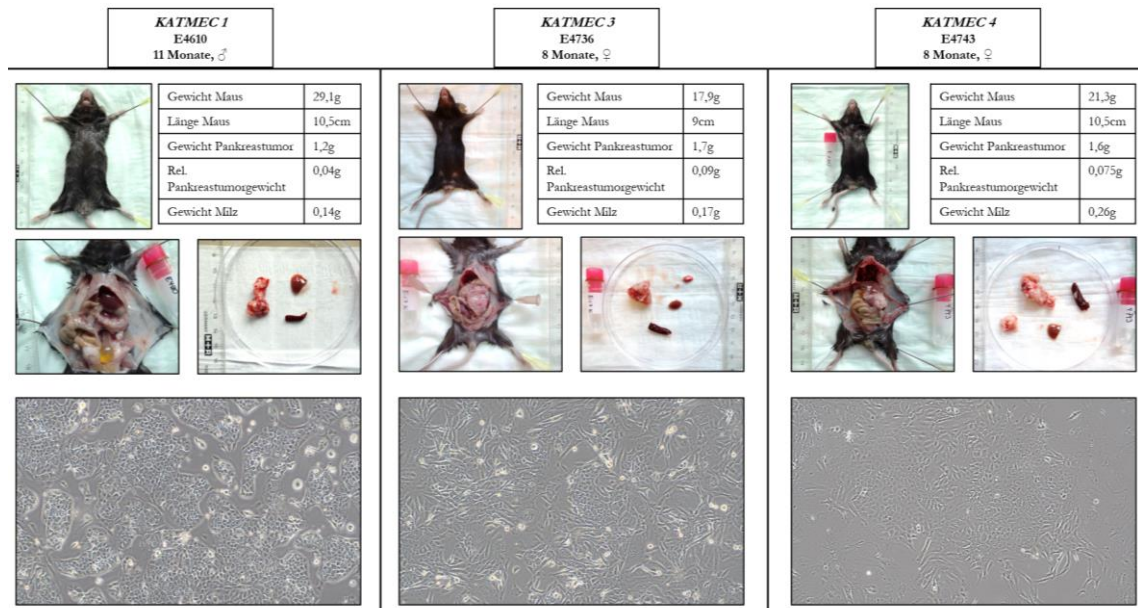


Abbildung 42: Isolation primärer Pankreaskarzinomzelllinien der *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorte
Übersicht der drei primär isolierten murinen Pankreaskarzinomzelllinien mit der Bezeichnung *KATMEC 1*, *3* und *4* in 40-facher Vergrößerung (Lichtmikroskop CKX-53). Zudem wurden die zugehörigen Mausnummern (E4610, E4736, E4743), das Alter, das Geschlecht und die erhobenen Gewichte in Form eines Steckbriefs aufgelistet. Pro Zelllinie werden je drei Fotos der Maus *in toto*, des Abdomens sowie der entnommenen Organe (Pankreas, Leber und Milz) gezeigt.

Die primären Pankreaskarzinomzelllinien wurden daraufhin auf das Vorliegen der konditional (*p48Cre*) aktivierten *Kras^{G12D}* Mutation mittels Isolation genomischer DNA und PCR überprüft. Bei Vorliegen einer Doppelbande in Höhe von 285 bp und 325 bp konnte *Kras^{G12D}* für *KATMC 1–3* und *KATMEC 1, 3* und *4* bestätigt werden (siehe Abbildung 43).

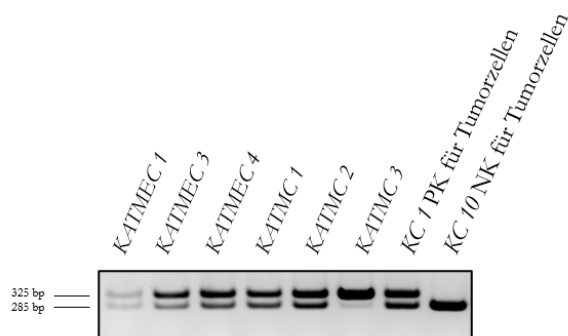


Abbildung 43: Genotypisierungs-PCR *Kras^{G12D}* Nachweis der konditional (*p48Cre*) aktivierten *Kras^{G12D}* Mutation in *KATMC 1–3* und *KATMEC 1, 3, 4* primären Pankreaskarzinomzelllinien über genomische DNA und PCR. Positivkontrolle (PK) für Tumorzellen ist die Pankreaskarzinomzelllinie *KC 1* (*Kras^{G12D}*). Negativkontrolle (NK) für Tumorzellen ist die Zelllinie *KC 10* bestehend aus Fibroblasten. Eine Bande in Höhe von 325 Basenpaaren (bp) steht für die aktivierte *Kras^{G12D}* Mutation. Eine Bande in Höhe von 285 bp steht für *Kras^{G12D}* Wildtyp.

Zudem wurde auf Protein-Ebene die Abwesenheit von Fibroblasten über α SMA, einem Bestandteil der Fibroblasten, in *KATMC 1–3* und *KATMEC 1, 3* und *4* bestätigt (siehe Abbildung 44). Als Positivkontrolle für vorhandene Fibroblasten diente die Zelllinie *KC 9* bestehend aus Fibroblasten. Außerdem konnte eine Restexpression von α SMA in *KATMEC 1* nachgewiesen werden, aufgrund vereinzelter, persistierender Fibroblasten in dieser primär isolierten Pankreaskarzinomzelllinie.

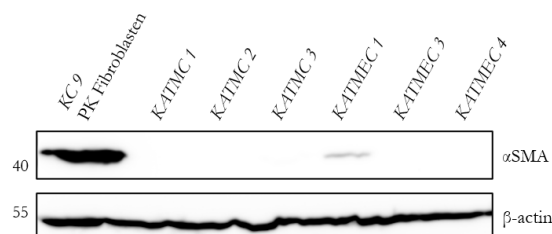


Abbildung 44: Untersuchung von Fibroblasten in *KATMC* und *KATMEC* Pankreaskarzinomzelllinien
Western Blot von Proteinlysaten aus *KC 9*, *KATMC 1–3* sowie *KATMEC 1, 3* und *4*. Die Fibroblastenkultur *KC 9* diente als Positivkontrolle (PK) mit positiver Bande für α SMA. Zur Ladekontrolle diente β -actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

Die Bestätigung der *Atm*- und *Ezh2*-Defizienz der Pankreaskarzinomzelllinien erfolgte auf RNA- und Protein-Ebene. Wie in Abbildung 45 dargestellt, konnte auf RNA-Ebene die *Atm*-Defizienz in allen verwendeten *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien bestätigt werden sowie die *Ezh2*-Defizienz in den verwendeten *KATMEC* Zelllinien. Als Positivkontrolle für *Atm* dienten die *KC 3* Zelllinie mit konditional (*p48Cre*) aktivierter *Kras^{G12D}* Mutation und die *KEC 1* Tumorzelllinie mit zusätzlicher *Ezh2*-Defizienz. Für die *Ezh2*-Defizienz dienten *KC 3* und *KATMC 1–3* Zelllinien als Positivkontrollen.

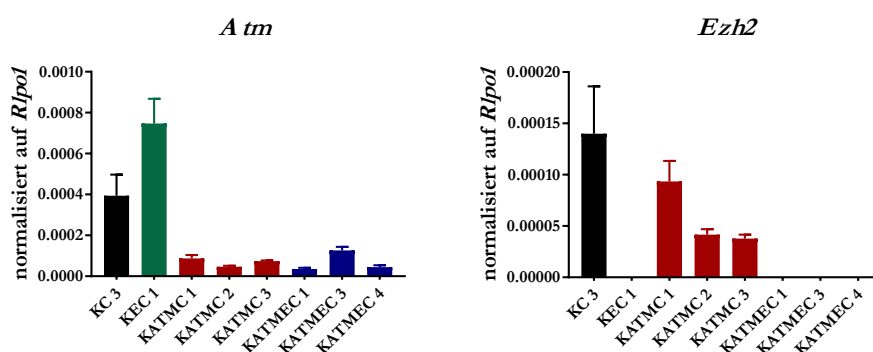


Abbildung 45: Bestätigung der *Atm*- und *Ezh2*-Defizienz in *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien auf RNA-Ebene
qRT-PCR für *Atm* und *Ezh2* für *KATMC 1–3* sowie *KATMEC 1, 3* und *4*. Die Ergebnisse wurden auf das House-Keeping-Gen *Rplp1* normalisiert.

Ebenso konnte die Abwesenheit von ATM und EZH2 in *KATMC 1–3* und *KATMEC 1, 3* und *4* auf Protein-Ebene bestätigt werden, wie in Abbildung 46 gezeigt. Hierbei diente die

Pankreaskarzinomzelllinie *KC 3* als Positivkontrolle für *ATM* und *EZH2* sowie *KATMC 1–3* als Positivkontrolle für *EZH2*.

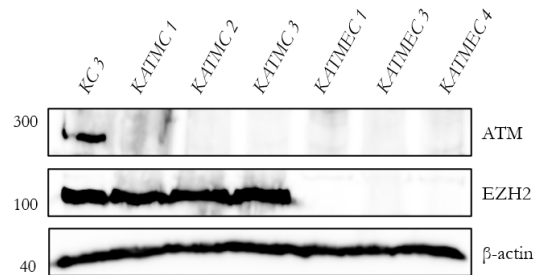


Abbildung 46: Bestätigung der Abwesenheit von *ATM* und *EZH2* in *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien auf Protein-Ebene Western Blot von Proteinlysaten aus *KC 3*, *KATMC 1–3* sowie *KATMEC 1, 3* und *4* für *ATM* und *EZH2*. Als Ladekontrolle diente β -actin. Markerhöhe links in Kilodalton.

Zur Validierung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 in Bezug auf die Zunahme der Apoptoserate nach *Ezh2*-Knockdown im Kontext der *Atm*-Defizienz wurden *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien für 72 h ausgesät und weitere 24 h mit STS behandelt. Es erfolgte nach insgesamt 96 h die Annexin PI Färbung und Analyse im Durchflusszytometer. Zwar war nach STS-Behandlung eine Zunahme der früh apoptotischen Zellen in allen *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien zu beobachten (siehe Abbildung 47), diese war allerdings durch die Heterogenität innerhalb der Zelllinien gleichen Genotyps sowie unterschiedlich starke Reaktionen auf STS nicht signifikant zwischen *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien. Somit konnten die Ergebnisse des *Ezh2*-Knockdown-Versuchs in diesem Modell nicht validiert werden.

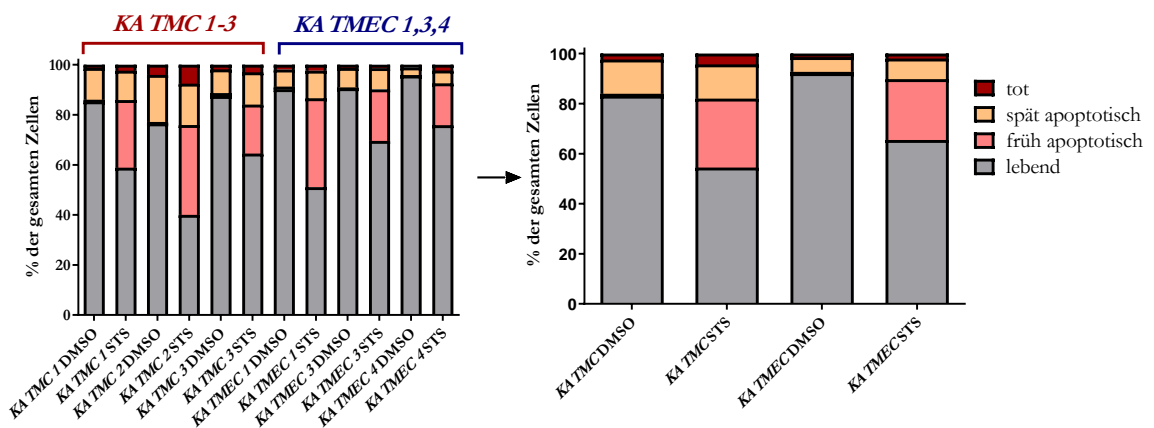


Abbildung 47: Apoptoserate nach *Ezh2*-Knockout im Kontext der *Atm*-Defizienz Aussäen der Zellen für 72 h mit anschließender 400 nM STS-Behandlung für 24 h. Annexin-PI-Färbung und Auswertung im Durchflusszytometer nach insgesamt 96 h. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse für *KATMC 1–3* und *KATMEC 1, 3* und *4*. Links: Darstellung der Ergebnisse einzeln für jede Zelllinie. Rechts: Zusammenfassung der Ergebnisse im Mittelwert für *KATMC* und *KATMEC* Zelllinien. Eine Zunahme der früh apoptotischen Zellen nach STS-Behandlung wurde in allen sechs Zelllinien verzeichnet.

Ebenso wurden zur Validierung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 die primären Pankreaskarzinomzelllinien *KATMC* und *KATMEC* im MTT-Test verglichen, um den Einfluss des

EZH2-Verlusts auf die Zellviabilität im Kontext der *Atm*-Defizienz zu untersuchen. Hierfür wurden 4000 Zellen in Fünffachbestimmung für 72 h ausgesät und daraufhin mittels MTT-Test ausgewertet (siehe Methoden: Kapitel 3.5.8) Hier konnte im Einklang mit den Ergebnissen nach *Ezh2*-Knockdown und EPZ-6438 Behandlung kein einheitliches Ergebnis nach *Ezh2*-Knock-out im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden (siehe Abbildung 48).

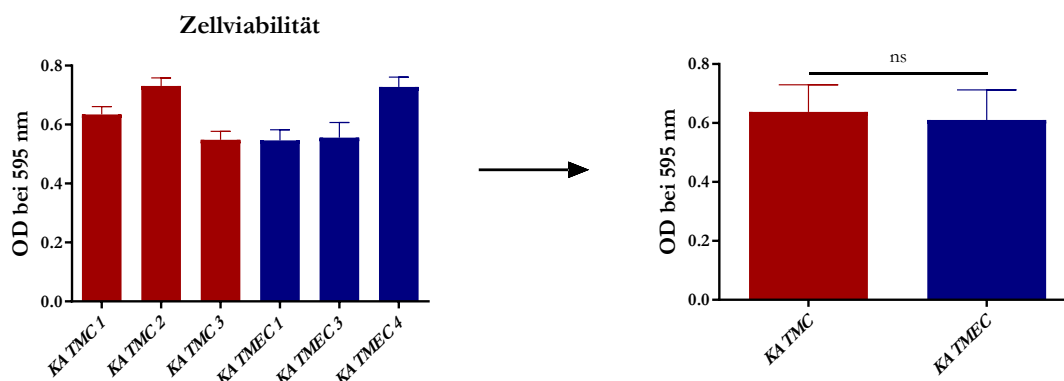


Abbildung 48: Zellviabilität nach *Ezh2*-Knockout im Kontext der *Atm*-Defizienz Bestimmung der Zellviabilität mit je 4000 Zellen in Fünffachbestimmung pro Tumorzelllinie für 72 h. Links: Darstellung der Ergebnisse pro Zelllinie. Rechts: Darstellung der Ergebnisse im Mittelwert pro Genotyp für *KATMC* und *KATMEC* Pankreaskarzinomzelllinien. Das Ergebnis war nicht signifikant (ns) ($p = 0,7436$).

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass der EZH2-Verlust im transgenen Mausmodell spezifisch im Kontext der *Atm*-Defizienz zu einem signifikant verlängerten Gesamt- und tumorassoziierten Überleben führt. Unterschiede in der Pankreaskarzinogenese *in vivo* zeigten sich in der Proliferationsrate und in der E-Cadherin-Regulation. Zudem konnte in den *In-vitro*-Untersuchungen eine verstärkte Apoptoseinduktion nach *Ezh2*-Knockdown im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden. Nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 durch EPZ-6438 war eine verstärkte Apoptoseinduktion allerdings nicht feststellbar. Es wurden primäre Pankreastumorzelllinien mit *Atm* und *Ezh2*-Defizienz etabliert. Unterschiede zwischen *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien im Hinblick auf die Apoptose-rate und Zellviabilität konnten jedoch nicht gezeigt werden.

5 Diskussion

5.1 Kontext-Abhängigkeit der EZH2-Funktion

In dieser Arbeit zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamt- und tumorassoziiertes Überleben nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz zwischen *KATMC* und *KATMEC* Mäusen. Interessanterweise konnte zwischen *KC* und *KEC* Mäusen im Kontext von *Atm*-Wildtyp kein EZH2-abhängiger Unterschied im Gesamt- und tumorassoziierten Überleben festgestellt werden, welches darauf hindeutet, dass der *Atm*-Status im PDAC eine besonders wichtige Rolle für die Aktivität und Funktionen von EZH2 hat. Kontextabhängige Funktionen von EZH2 konnten in den letzten Jahren bereits mehrfach gezeigt werden (Chen et al. 2017; Hessmann et al. 2017; Bremer et al. 2019). Beispielsweise wurde bei Patientinnen und Patienten mit invasivem kolorektalen Karzinom nachgewiesen, dass eine hohe EZH2 Expression mit einer reduzierten Tumorprogression und einer guten Prognose einhergeht (Bremer et al. 2019). In Kontrast dazu konnte die Hochregulation von EZH2 im PDAC mit einer beschleunigten Karzinogenese und Tumorprogression (Chen et al. 2017) sowie einem dedifferenzierten Phänotyp in Verbindung gebracht werden (Ougolkov et al. 2008; Patil et al. 2020). Dies unterstreicht die gewebespezifischen Funktionen von EZH2. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die aktivierende *KRAS* Mutation, der eine initiiierende Rolle in der Entwicklung des PDACs zugerechnet wird (Hingorani et al. 2003; Kanda et al. 2012; Murphy et al. 2013; Bailey et al. 2016; Ying et al. 2016), einen Einfluss auf die EZH2-abhängige Zielgenregulation nimmt und zu einem Wandel der EZH2 Funktionen führt (Chen et al. 2017). So trägt EZH2 im Kontext von *KRAS*-Wildtyp zur Aufrechterhaltung der Azinuszellstruktur und Integrität des Pankreas bei, wohingegen EZH2 im Kontext von onkogenem *KRAS* die Tumorprogression des PDACs fördert. Die inverse Genregulation von EZH2 ist demnach abhängig vom *KRAS* Status (Chen et al. 2017). Außerdem zeigte sich bei A-T in transgenen Mäusen, dass nach Funktionsverlust von *ATM* neben der Überexpression von EZH2 auch eine genomweite Zunahme sowie eine Verschiebung EZH2-abhängiger Trimethylierungen an H3K27 stattfand (Li et al. 2013). Daher wäre eine Untersuchung der *ATM*-Status abhängigen Regulation von EZH2 Gensignaturen ebenso im PDAC interessant. Dies könnte anhand von genomweiten DNA-Bindungsstudien von EZH2 (EZH2 Chromatin-Immünpräzipitation mit anschließender genomweiter Sequenzierung) erfolgen (He et al. 2012; Patil et al. 2020).

Im Jahr 2020 wurde außerdem erstmals der Inhibitor Tazemetostat zugelassen, welcher spezifisch die Methyltransferaseaktivität von EZH2 hemmt (siehe Einleitung: Kapitel 1.7) (Hoy 2020). Die Zulassung erfolgte für die Therapie von spezifischen Subtypen des epitheloiden Sarkoms sowie des follikulären Lymphoms (Hoy 2020; U.S. FDA 2020a; U.S. FDA 2020b). Ein Therapieansprechen wurde bei Patientinnen und Patienten mit Subtypen des epitheloiden Sarkoms erzielt, bei denen durch Deletion von *integrator interactor 1* eine Überexpression von EZH2 vorlag (Gulati et al. 2018; Hoy 2020; U.S. FDA 2020a; Simeone et al. 2021). Weiterhin sprachen Patientinnen und Patienten auf die Therapie mit Tazemetostat an, die an einem Subtyp des

follikulären Lymphoms mit einer EZH2-Mutation erkrankt waren (Knutson et al. 2014; Hoy 2020; U.S. FDA 2020b). Somit zeigte sich auch in der klinischen Anwendung des EZH2 Inhibitors Tazemetostat die Relevanz der Kontext-Abhängigkeit der EZH2-Funktion.

5.2 Mögliche Ursachen für das verlängerte Überleben der *KATMEC* Mäuse

Um den Einfluss von EZH2 auf die Karzinogenese in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen zu analysieren, wurden *KATMC* und *KATMEC*-Mauslinien drei verschiedener Altersgruppen makroskopisch und mikroskopisch miteinander verglichen. Beide Mauslinien wiesen bereits mit zwei Monaten niedrig- bis hochgradige PanIN-Läsionen auf sowie eine Zunahme der Läsionsareale hin zu drei und sechs Monaten. Mit zunehmendem Alter konnte jedoch mikroskopisch kein Unterschied in der Karzinogenese zwischen *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien durch HE-Färbungen festgestellt werden. Genauere Unterschiede zwischen der Häufigkeit und Verteilung von niedrig- und hochgradigen PanIN-Läsionen nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz könnten jedoch in Zukunft durch Quantifizierung der PanIN-Läsionen näher beleuchtet werden. So konnte durch Chen et al. eine signifikant reduzierte Häufigkeit von PanIN-3-Läsionen bei sechs Monate alten *KEC* Mäusen im Vergleich zu *KC* Mäusen, trotz unverändertem Survival, gezeigt werden, welches auf eine Verlangsamung der Karzinogenese nach EZH2-Verlust hindeutet (Chen et al. 2017). Ebenso konnte beim Vergleich von zehn Wochen alten *KC* und *KATMC* Mäusen eine Zunahme der PanIN-Läsionen 1–3 bei *Atm*-defizienten Mäusen beobachtet werden (Russell et al. 2015). Die signifikante Verlängerung des Gesamt- und tumorassoziierten Überlebens nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz trotz gleicher Tumorzinzidenz könnte also durch eine langsamere Karzinogenese bedingt sein. Um dies zu überprüfen, wäre eine Ermittlung der Tumorzinzidenz beider transgener Linien im Alter von 38 Wochen interessant. Dieser Zeitpunkt entspricht dem medianen tumorassoziierten Überleben der *KATMC* Tumor-Survival-Kohorte. Sollte das verlängerte Überleben der *KATMEC* Mäuse tatsächlich durch eine verlangsamte Karzinogenese bedingt sein, sollten zu diesem Zeitpunkt Unterschiede in der Tumorzinzidenz beider transgener Mauslinien erkennbar sein.

Trotz vergleichbarer Gewichtsentwicklung junger Tiere wiesen *KATMC* Mäuse im Vergleich zu *KATMEC* Mäusen der Survivalgruppen ein signifikant geringeres Mäusegewicht auf. Dies könnte für eine geringere Tumorkachexie nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz sprechen und ebenso einen Einflussfaktor im Hinblick auf das signifikant verlängerte Gesamt- und tumorassoziierte Überleben von *KATMEC* Mäusen darstellen. Die Tumorkachexie ist eine klinisch wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität beim PDAC. Es leiden zwischen 70 %–80 % der Patientinnen und Patienten an Kachexie, welche zudem mit einem erniedrigten Überleben assoziiert ist (Bachmann et al. 2009; Bachmann et al. 2013; Mueller et al. 2014). Zu einer genaueren Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus wären hierfür allerdings zusätzliche Kachexie-spezifische Analysen im transgenen Mausmodell z. B. anhand der Beurteilung des

Fettanteils und der muskulären Atrophie nötig (Michaelis et al. 2017). Zudem könnten Unterschiede in der Tumorbilogie zwischen *KATMC* und *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorten einen Einfluss auf die Tumorkachexie nehmen. Beispielsweise durch Unterschiede in der Entzündungsreaktion und Konzentrationen von Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6, Interleukin-1 oder Interferon- γ , die eine wichtige Rolle in der Entstehung der Kachexie spielen (Karayiannakis et al. 2001; Argilés et al. 2014; Onesti und Guttridge 2014; De Lerma Barbaro 2015).

5.3 Einfluss von EZH2 auf Differenzierungsprozesse in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen

Differenzierungsprozesse spielen sowohl in der Embryogenese als auch in der Metastasierung eine wichtige Rolle. Ein Mechanismus, der an diesen Prozessen beteiligt ist, ist die epithelial mesenchymale Transition (EMT) (Greenburg und Hay 1982; Boyer und Thiery 1993; Hay 1995; Thiery 2002). Hierbei können sich epitheliale Zellen zu mesenchymalen Zellen umwandeln und aus dem epithelialen Verband abwandern, indem sie sich morphologisch und funktionell durch molekulare Umstrukturierungen verändern (Boyer und Thiery 1993; Hay 1995; Yang und Weinberg 2008; Kalluri und Weinberg 2009). Dies geschieht unter anderem über die Hochregulation von Transkriptionsfaktoren wie SNAIL und SLUG, die transkriptionell E-Cadherin reprimieren können, welches zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten führt (Batlle et al. 2000; Cano et al. 2000; Bolós et al. 2003; Yang und Weinberg 2008). Durch Russell et al. konnte 2015 gezeigt werden, dass EMT-Prozesse bereits zum Zeitpunkt der Karzinogenese von *Atm*-defizienten Vorläuferzellen des PDACs eine wichtige Rolle spielen. Neben einer Hochregulation von EMT-spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie *zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1) wurden vermehrt mesenchymale Marker, wie Fibronectin und Vimentin in *KATMC* Mäusen im Gegensatz zu *KC* Mäusen nachgewiesen (Russell et al. 2015). In Kooperation mit Frau Dr. Elodie Roger der Arbeitsgruppe Kleger des UKU wurden im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung von E-Cadherin nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz durchgeführt. Hier zeigte sich nach EZH2-Verlust eine Hochregulation von E-Cadherin in PDAC-Vorläuferläsionen und Tumoren. Dies könnte für einen schwächeren EMT-Phänotyp nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz sprechen, da der funktionelle Verlust von E-Cadherin in epithelialen Zellen als eines der ersten Merkmale für EMT-Prozesse angesehen wird (Yang und Weinberg 2008).

Trotz der Annahme, dass EMT eine entscheidende Rolle in Metastasierungsprozessen von Tumoren spielt (Thiery 2002; Kalluri und Weinberg 2009), konnte nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz *in vivo* keine signifikante Abnahme der Makro- und Mikrometastasierung in die Leber festgestellt werden. Durch Zheng et al. konnte 2015 allerdings gezeigt werden, dass EMT für die Metastasierung des PDACs nicht unbedingt notwendig ist. Hier war zwar das Gesamtüberleben in Mäusen mit schwachem EMT-Phänotyp nach Knockout der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren *Twist* oder *Snail* in transgenen Mäusen mit konditionaler (*PDX-1*-

Cre) Expression von konstitutiv aktivem *Kras*^{G12D} und heterozygoter *p53*-Mutation (*p53*^{R172H/+}) (*KPC* Mäuse, *Twist*^{KO} oder *Snail*^{KO}) im Vergleich zu *KPC* Mäusen ohne Knockout von *Twist* oder *Snail* verlängert, jedoch ohne Reduktion der Metastasierungsrate. Dies wurde auf eine signifikant reduzierte Zellproliferation in *KPC* Mäusen mit starkem EMT-Phänotyp zurückgeführt (Zheng et al. 2015). Eine signifikant niedrigere Zellproliferation konnte auch in dieser Doktorarbeit in Vorläuferläsionen sechs Monate alter *KATMC* Mäuse gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass PDAC Vorläuferzellen, die Differenzierungsprozesse hochregulieren, mehr Kapazitäten für Wachstum und Hochregulation der Proliferation besitzen (Zheng et al. 2015). Zudem konnte 2015 durch Zheng et al. bei starkem EMT-Phänotyp eine gesteigerte Therapieresistenz gegen Zytostatika, insbesondere den Antimetaboliten Gemcitabin nachgewiesen werden. Dies war u. a. ebenso bedingt durch die reduzierte Zellproliferation (Zheng et al. 2015). Das Chemotherapeutikum Gemcitabin, welches weiterhin ein wichtiges Basisedikament in der Therapie des PDACs darstellt, entfaltet seine Wirksamkeit in der S-Phase und ist daher bei eingeschränkter Zellproliferation nur bedingt wirksam (Burris et al. 1997; Neoptolemos et al. 2003; Tada et al. 2008). Um den Einfluss von EZH2 auf den EMT-Phänotyp und die Zellproliferation im Kontext der *Atm*-Defizienz näher zu analysieren, wären weitere Untersuchungen nötig, beispielsweise immunhistochemische Färbungen weiterer EMT-Marker, wie Fibronectin und Vimentin, *In-vitro*-Migrationstests oder Genexpressionsanalysen von EMT spezifischen Transkriptionsfaktoren wie *Zeb1*, *Snail* oder *Twist* (Russell et al. 2015; Zheng et al. 2015).

Unabhängig von EMT Prozessen könnte die Hochregulation von E-Cadherin in *KATMEC* Mäusen Ausdruck der Zugehörigkeit der Tumoren dieser Linie zum klassischen Subtyp (siehe Einleitung: Kapitel 1.5) des PDACs darstellen (Collisson et al. 2011; Patil et al. 2020). Durch Patil et al. konnte im Jahr 2020 gezeigt werden, dass nach Inhibition von EZH2 in Zellen mit konstitutiv aktivem *nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1* (NFATc1) und *Kras*^{G12D} (*NKC*-Zellen) eine Hochregulation von GATA6 stattfindet, die zu einem Wechsel des Subtyps vom quasi-mesenchymalen zum weniger aggressiven, klassischen Subtyp des PDACs führt. Die *NKC*-Zelllinien stammten hierbei aus Pankreastumoren transgener Mäuse mit konditionaler (*p48-Cre*) Expression von konstitutiv aktivem NFATc1 und KRAS (Baumgart et al. 2014; Chen et al. 2017; Patil et al. 2020). Der Transkriptionsfaktor GATA6 wurde in den letzten Jahren als wichtiger Marker für den klassischen Subtyp des PDACs identifiziert (Collisson et al. 2011; Bailey et al. 2016; Aung et al. 2018). E-Cadherin stellt wiederum ein Zielgen von GATA6 dar und ist im klassischen Subtyp des PDACs ebenso hochreguliert (Martinelli et al. 2017; Patil et al. 2020). Interessant wäre daher in Zukunft eine weitergehende Untersuchung von Subtypisierungsmarkern wie beispielsweise *hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A* oder Keratin 14 zur Zuordnung des molekularen Subtyps im Kontext der *Atm*-Defizienz (Martinelli et al. 2017; Lomberk et al. 2018; Patil et al. 2020).

5.4 Auswirkungen von EZH2 auf die Apoptose im Kontext der *Atm*-Defizienz

Die Umgehung von Apoptosemechanismen wird als ein Hauptcharakteristikum von Krebszellen angesehen (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011). Physiologisch können Apoptosemechanismen durch intrinsische und extrinsische Signalwege aktiviert werden, infolgedessen die Aktivierung verschiedener Caspasen zur Selbstzerstörung der Zelle führt (Böhm und Schild 2003; Rassow et al. 2012; Galluzzi et al. 2016). In Krebszellen sind diese Mechanismen häufig gestört, beispielsweise durch Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53* (Hanahan und Weinberg 2000; Hanahan und Weinberg 2011). Zur Apoptoseinduktion *in vitro* wurde in dieser Arbeit der unselektive Proteinkinasehemmer STS verwendet (Rüegg und Burgess 1989; Meggio et al. 1995). Der genaue Wirkmechanismus von STS ist noch nicht vollständig geklärt. In Melanomzellen induziert STS Apoptose über Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen (Zhang et al. 2004). In den humanen PDAC Zelllinien *PaTu 8988t* und *Panc-1* konnte die Apoptoseinduktion über die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs *in vitro* gezeigt werden, was STS zu einem potenten Apoptoseinduktor für diese Tumorzelllinien macht (Malsy et al. 2019).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von EZH2 auf die Apoptoserate im Kontext der *Atm*-Defizienz *in vitro* untersucht. In *KATMC* Zelllinien konnte eine Caspase-3 unabhängige Apoptoseinduktion nach *Ezh2*-Knockdown gezeigt werden. Hier könnten andere Effektor-Caspasen, wie Caspase-6 oder Caspase-7 ausschlaggebend für die Einleitung der Apoptose sein (Böhm und Schild 2003; Rassow et al. 2012; Galluzzi et al. 2016). Jedoch war nach EPZ-6438 Behandlung im Kontext der *Atm*-Defizienz keine verstärkte Apoptoseinduktion nachweisbar. Somit war die Inhibition der EZH2-Methyltransferaseaktivität im Kontext der *Atm*-Defizienz nicht ausreichend, um die anti-apoptotische Funktion von EZH2 zu unterdrücken. Auch in unveröffentlichten Daten von Herrn Lennart Verseemann der Arbeitsgruppe Heßmann konnte dies in *KC* und *NKC* Zelllinien *in vitro* beobachtet werden. Hier zeigte sich *in vitro* eine Zunahme der Apoptoserate nach genetischem *Ezh2*-Knockdown mittels siRNA und STS-Behandlung. Jedoch konnte eine Zunahme der Apoptoserate nach EPZ-6438 und STS-Behandlung in *KC* und *NKC* Zellen nicht gezeigt werden. Somit war in diesen Zelllinien ebenso die pharmakologische Inhibition der Methyltransferaseaktivität von EZH2 mit EPZ-6438 nicht ausreichend und eine Zunahme der Apoptoserate konnte nur nach Depletion von EZH2 erzielt werden. Dies legt nahe, dass sich die anti-apoptotische Aktivität von EZH2 nicht vollständig durch spezifische Inhibition der EZH2-Methyltransferaseaktivität unterdrücken lässt, sondern die Depletion von EZH2 und/oder eine Dissoziation des PRC2-Komplexes nötig ist (Hessmann et al. 2017). Dies deutet darauf hin, dass EZH2 im Pankreaskarzinom auch durch Methyltransferase-unabhängige Mechanismen die Tumorprogression fördert. Übereinstimmend hiermit konnte 2015 in der präklinischen Studie von Kim et al. gezeigt werden, dass Tumorzelllinien mit Mutationen im SWI/SNF-Komplex nach genetischer Inhibition von *Ezh2* eine geringere Zellproliferation aufwiesen. Nach pharmakologischer

Inhibition der EZH2-Methyltransferaseaktivität mit dem Pharmakon GSK126 konnte jedoch keine Reduktion der Zellproliferation erzielt werden (McCabe et al. 2012; Kim et al. 2015; Völkel et al. 2015). Womöglich war also auch im Kontext von Mutationen im SWI/SNF-Komplex eine Destabilisierung des PRC2-Komplexes notwendig, um die onkogene, proliferationsfördernde Aktivität von EZH2 vollständig zu unterdrücken (Kim et al. 2015; Hessmann et al. 2017).

Ferner ist möglicherweise im Kontext der *Atm*-Defizienz die Reduktion der *Ezh2*-Expression und die Destabilisierung des PRC2-Komplexes nötig, um eine verstärkte Apoptoseinduktion zu erreichen. Interessant wäre daher eine Behandlung der *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien mit anderen pharmakologischen Inhibitoren von EZH2, wie beispielsweise 3-Deazaneplanocin A (DZNep). DZNep inhibiert S-Adenosylhomocystein-Hydrolase und führt zu einer Reduktion von EZH2 und H3K27me₃ in der Zelle (Tan et al. 2007; Völkel et al. 2015). Auch der Inhibitor *stabilized-alpha-belix*-EZH2, der durch Störung des PRC2-Komplexes zu einer Reduktion von EZH2 und H3K27me₃ führt, könnte in Zukunft in diesen Tumorzelllinien getestet werden, um eine Zunahme der Apoptoserate, wie nach genetischer Inhibition von EZH2 zu erreichen (Kim et al. 2013).

Die EZH2-Inhibition könnte somit eine effektive Methode zur Apoptoseinduktion in *Atm*-defizienten Subtypen des PDACs darstellen. Wahrscheinlich wäre jedoch die alleinige Inhibition der EZH2-Methyltransferaseaktivität durch den bereits in Studien zugelassenen Inhibitor EPZ-6438 (Tazemetostat) hierfür nicht ausreichend (Hoy 2020).

5.5 Intra- und intertumorale Heterogenität im transgenen Mausmodell und in murinen Tumorzelllinien

Die erste humane Tumorzelllinie wurde im Jahr 1951 von einer Patientin mit Gebärmutterhalskrebs in den Vereinigten Staaten von Amerika an der Johns Hopkins Universität isoliert und *in vitro* kultiviert (Scherer et al. 1953; Suri et al. 2020). Die erste humane Pankreastumorzelllinie folgte im Jahr 1963 (Dobrynin 1963). Seither mögliche Untersuchungen *in vitro* lieferten wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Tumorbilogie von Pankreastumoren (Suri et al. 2020).

In dieser Arbeit wurde mit primär isolierten Tumorzelllinien aus Pankreastumoren der Tumor-Survival-Kohorten transgener Mauslinien gearbeitet. Die *KATMC* Tumorzelllinien stammten von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger des UKU. Die *KATMEC* Tumorzelllinien wurden unter gleichen Bedingungen im Rahmen dieser Doktorarbeit isoliert. Die Tumorzellisolationen erfolgten nach Eintritt der Abbruchkriterien und Tötung der Mäuse durch Überdosierung von CO₂ und zervikaler Dislokation aus Mäusen unterschiedlichen Alters und Geschlechts (siehe Methoden und Ergebnisse: Kapitel 3.1, 3.5.3 und 4.1.7). Alle *In-vitro*-Untersuchungen erfolgten mit je drei Tumorzelllinien pro Genotyp. Dies sollte repräsentative Ergebnisse für beide Genotypen gewährleisten und interindividuelle Unterschiede zwischen den Tumorzelllinien aufzeigen, wie auch in anderen wissenschaftlichen Arbeiten zum PDAC aus der Arbeitsgruppe Heßmann (Patil et al. 2020). Die Zellkulturexperimente mit

primär isolierten *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien wurden durchgeführt, um Ergebnisse aus Untersuchungen nach *Ezh2*-Knockdown in *KATMC*-Zelllinien zu validieren. Allerdings war eine Bestätigung der Ergebnisse aufgrund der Heterogenität der Tumorzelllinien gleichen Genotyps nicht möglich. So konnte zwar eine stärkere Apoptoseinduktion nach *Ezh2*-Knockdown und STS-Behandlung in drei *KATMC*-Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden, jedoch wiesen alle sechs *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien nach STS-Behandlung eine unterschiedlich starke Apoptoserate auf.

Dies könnte u. a. in der intra- und intertumoralen Heterogenität der transgenen Mauslinien *KATMC* und *KATMEC* begründet sein, aus denen die Tumorzelllinien isoliert wurden. Die Heterogenität zwischen den Mauslinien zeigte sich bereits in histologisch orientierenden Untersuchungen mittels HE-Färbungen zur Pankreaskarzinogenese in festen Endpunkten. Hier konnten im Pankreas der gleichen Maus bereits im Alter von zwei Monaten gleichzeitig Bereiche mit Azinuszellen und Bereiche duktaler Läsionen mit niedrig- und hochgradigen PanIN-Läsionen ausgemacht werden, wodurch sich eine Zuordnung zum Zeitpunkt der Karzinogenese als schwierig gestaltete. Zudem waren innerhalb der Gruppen gleichen Alters und gleichen Genotyps starke interpankreatische Unterschiede der Anteile von Azinuszellen und dukталen Läsionen auffällig, was einen Vergleich der festen Endpunkte beider Mauslinien in Bezug auf die Karzinogenese schwierig machte (siehe Ergebnisse und Diskussion: Kapitel 4.1.3 und 5.2). Außerdem waren in den Tumoren der *KATMC* und *KATMEC* Tumor-Survival-Kohorten starke intra- und intertumorale Unterschiede in HE-Übersichtsfärbungen zu beobachten. Einerseits aufgrund von Bereichen mit stark dedifferenzierten tumorösen Läsionen sowie Bereichen mit dukталen Vorläuferläsionen und Azinuszellen innerhalb desselben histologischen Tumorpräparats. Andererseits durch intertumorale Heterogenität derselben Tumor-Survival-Kohorte mit sowohl mäßig differenzierten als auch stark dedifferenzierten Tumoren.

Die intertumorale Heterogenität könnte zum einen mit dem unterschiedlichen Alter der Mäuse beim Eintritt der Abbruchkriterien zusammenhängen. Zum anderen wurde erst kürzlich im Jahr 2019 die intra- und intertumorale Heterogenität genetisch modifizierter PDAC Mausmodelle in einer Studie von Niknafs et al. untersucht. Hier wurden sechs Pankreastumoren von transgenen *KPC* Mäusen sowie sechs Pankreastumoren von *KPC* Mäusen mit einer zusätzlichen heterozygoten Defizienz des Transforming-Growth-Factor-Beta-Rezeptor-2-Gens (*KPTC*-Mäuse) genetisch untersucht. *KPTC*-Mäuse wiesen im Gegensatz zu *KPC* Mäusen eine schnellere Pankreaskarzinogenese und eine geringere Fernmetastasierungsrate auf (Zhong et al. 2017; Niknafs et al. 2019). Durch Genomsequenzierung konnte unterdessen gezeigt werden, dass somatische Tumorzellen transgener *KPC* und *KPTC* Mäuse einer ständigen Entwicklung und Akkumulation somatischer Veränderungen unterliegen, wodurch Pankreastumoren des gleichen transgenen Mausmodells unterschiedliche somatische Alterationen aufwiesen (Niknafs et al. 2019). Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Apoptoserate nach STS-Behandlung primär isolierter *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien, da unterschiedliche somatische Alterationen Einfluss auf die STS Ansprechrate nehmen könnten.

Zudem wurde in der Arbeit von Niknafs et al. (2019) die räumliche Heterogenität muriner Pankreastumoren untersucht. Die Tumoren wurden hierfür in drei Regionen unterteilt und sequenziert. Dabei zeigten sich durch Analysen somatischer Mutationen von insgesamt zwölf transgenen Mäusen unterschiedliche Entwicklungswege der Pankreastumoren. So konnte in mehreren Mäusen gezeigt werden, dass innerhalb desselben makroskopischen Pankreastumors unterschiedliche Mutationscluster in den untersuchten Regionen vorlagen. Dies deutete darauf hin, dass sich in derselben transgenen Maus parallel unterschiedliche primäre Pankreastumoren aus den gleichen Vorläuferzellen entwickeln konnten. Unterschiede zwischen dem *KPC* und *KPTC* Modell zeigten sich in dieser Studie jedoch nicht (Niknafs et al. 2019).

Andere Ursachen für intra- und intertumorale Heterogenität in festen Endpunkten und Tumor-Survival-Kohorten der *KATMC* und *KATMEC* Mauslinien könnten außerdem mit der Heterogenität des Tumorstromas und der damit verbundenen Zusammensetzung des Tumormilieus in Zusammenhang stehen (Feig et al. 2012; Looi et al. 2019). Beispielsweise wären immunhistochemische α SMA Färbungen zur Untersuchung des Fibroblastenanteils oder Masson-Trichrom-Färbungen zur Untersuchung des Kollagenanteils interessant, um Unterschiede im Tumorstroma und der extrazellulären Matrix zu analysieren. In der Studie von Russell et al. (2015) konnte außerdem in α SMA und Masson-Trichrom-Färbungen gezeigt werden, dass *KATMC* Mäuse im Gegensatz zu *KC* Mäusen einen deutlich stärkeren Stroma-Anteil während der Pankreaskarzinogenese aufwiesen. Eine weiterführende Untersuchung des Tumorstromas wäre folglich einerseits im Hinblick auf die Heterogenität der Pankreastumoren untereinander interessant. Andererseits könnte der Einfluss von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz auf das Tumormilieu näher untersucht werden.

Die Limitationen beim Vergleich primär isolierter Tumorzelllinien aus transgenen Mauslinien resultierten demzufolge vermutlich aus der intra- und intertumoralen Heterogenität des PDACs. Dies schränkte die Validierung von Experimenten mit genetischer oder pharmakologischer Inhibition von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz stark ein und sollte in Zukunft bei der Interpretation von *In-vitro*-Ergebnissen zwischen unbehandelten primär isolierten Tumorzelllinien beachtet werden. Andererseits zeigt die intra- und intertumorale Heterogenität aber auch, dass die hier verwendeten transgenen Mausmodelle das humane PDAC mit all seinen Facetten der Heterogenität sehr gut repräsentieren und daher weiterhin eine gute Methode zur Untersuchung der Tumorbiologie und von Therapieansätzen des PDACs *in vivo* darstellen.

5.6 Schlussfolgerung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation der Histonmethyltransferase EZH2 einen aggressiven und dedifferenzierten Subtyp des PDACs bedingt (Ougolkov et al. 2008; Patil et al. 2020). Auch bei der genetischen Erkrankung A.-T. ist die Hochregulation von EZH2 durch Funktionsverlust des DNA-Reparaturproteins ATM am neuronalen Zelluntergang in entscheidendem Maße beteiligt (Li et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation von EZH2 auch in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen wesentlich an der Tumorprogression beteiligt ist, welches sich vor allem im signifikant verlängerten Gesamt- und tumorassoziierten Überleben nach EZH2-Verlust zeigte. Kein Unterschied im Überleben zeigte sich hingegen nach EZH2-Verlust im Kontext von *Atm*-Wildtyp, welches auf die besondere Bedeutung des *Atm*-Status für die Aktivität und Funktionen von EZH2 hindeutete.

Bei gleicher Tumorinzidenz und Metastasierungsrate nach EZH2-Verlust im Kontext der *Atm*-Defizienz könnte der Unterschied im Überleben durch verschiedene andere Faktoren bedingt sein. Beispielsweise eine verlangsamte Karzinogenese nach EZH2-Verlust (Chen et al. 2017) oder Unterschiede in der Tumorbilogie und damit einhergehende Kachexie (Karayiannakis et al. 2001; Argilés et al. 2014; Onesti und Guttridge 2014; De Lerma Barbaro 2015). Weiterhin könnten *Atm*-Status abhängige Unterschiede in EZH2 Gensignaturen eine Rolle spielen (Li et al. 2013).

In dieser Arbeit erfolgten außerdem erste Schritte in Bezug auf die Charakterisierung von EZH2 als EMT fördernden Effektor mit Ausbildung eines eher aggressiven, mesenchymalen Tumors in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen (Yang und Weinberg 2008; Russell et al. 2015; Perkhofier et al. 2017). Untersuchungen des Einflusses von EZH2 auf den molekularen Subtyp könnten sich weiterhin anschließen, um die Hochregulation von EZH2 im Kontext der *Atm*-Defizienz als Indikator für den aggressiven, quasi-mesenchymalen Subtyp des PDACs weitergehend zu untersuchen (Collisson et al. 2011; Patil et al. 2020). Die verstärkte Zellproliferations- und Apoptoserate nach EZH2-Verlust in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen könnten überdies auf ein möglicherweise verbessertes Ansprechen auf Zytostatikatherapien nach EZH2-Inhibition im Kontext der *Atm*-Defizienz hindeuten (Zheng et al. 2015).

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass eine *ATM*-Status abhängige Inhibition von EZH2 eine vielversprechende therapeutische Option in der Therapie des PDACs darstellen könnte. Die Bestätigung der EZH2 Überexpression in humanen *ATM*-defizienten PDAC-Subtypen wäre demnach ein wichtiger nächster Schritt zur Untersuchung des Einflusses von EZH2 in *ATM*-defizienten PDAC-Subtypen.

6 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) soll bis 2030 die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache nach dem Bronchialkarzinom darstellen. Eine wesentliche Ursache für die schlechte Prognose des PDACs ist die Resistenz gegenüber etablierten Chemotherapeutika. Das schlechte Therapieansprechen wird durch die intra- und intertumorale PDAC Heterogenität begünstigt. Aktuelle präklinische und klinische Ansätze fokussieren daher auf der Etablierung neuer individualisierter Therapieverfahren, die die molekularen Charakteristika des Tumors berücksichtigen. Eine molekulare Veränderung des PDACs mit therapie-prädiktiver Bedeutung ist der Verlust des Desoxyribonukleinsäure-Reparaturgens *ataxia teleangiectatica mutated* (*ATM*), welcher in ca. 12% aller PDACs festgestellt werden konnte. Im transgenen Mausmodell des PDACs führt der Verlust von *Atm* in Kombination mit konstitutiv aktivem *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*) zu einer schnelleren Tumorprogression und einer Verkürzung des Gesamtüberlebens. Zudem konnte in Untersuchungen muriner *Atm*-defizienter PDAC Subtypen eine Überexpression der Histonmethyltransferase *enhancer of zeste homolog 2* (*EZH2*) gezeigt werden, welche im PDAC mit einer hohen Therapieresistenz, fortgeschrittenen Tumorstadien und einer schlechten Prognose assoziiert ist.

Die Ziele dieser Arbeit fokussierten sich auf die funktionelle und mechanistische Charakterisierung von *EZH2* in *Atm*-defizienten PDAC-Subtypen.

Anhand von genetischer (siRNA) und pharmakologischer (EPZ-6438) Inhibition von *EZH2* in murinen PDAC-Zellen mit konditionaler Expression (*p48Cre*) von konstitutiv aktivem *KRAS* und homozygoter *Atm*-Defizienz (*KATMC*-Zelllinien) wurden die onkogenen Funktionen von *EZH2* untersucht. Annexin- und Propodiumiodid-Färbung mit anschließender Analyse im Durchflusszytometer erfolgten zur Untersuchung der Apoptoserate nach *EZH2*-Inhibition. Untersuchungen der Zellviabilität erfolgten anhand von MTT-Tests. Es erfolgte die Zucht und Charakterisierung von transgenen Mäusen mit konditionaler Expression (*p48Cre*) von konstitutiv aktivem *KRAS* und homozygoter *Atm*-Defizienz (*KATMC*), welche mit transgenen Mäusen mit zusätzlicher *Ezh2*-Defizienz (*KATMEC*) verglichen wurden. Beide Mauslinien wurden in Bezug auf phänotypische Unterschiede, das Gesamt- und tumorassoziierte Überleben, die Tumorzinzidenz und die Metastasierungsrate miteinander verglichen. Histologische Analysen erfolgten zur Untersuchung des Einflusses von *EZH2* auf die Karzinogenese und die Tumorprogression. Außerdem wurden drei primäre Tumorzelllinien von tumortragenden *KATMEC* Mäusen isoliert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *EZH2*-Verlust im transgenen Mausmodell spezifisch im Kontext der *Atm*-Defizienz zu einem signifikant verlängerten Gesamt- und tumorassoziierten Überleben führt. Trotz gleicher Gewichtsentwicklung während der ersten zwölf Wochen waren *KATMC* Mäuse zum Todeszeitpunkt signifikant leichter als *KATMEC* Mäuse. In *KATMEC* Mäusen zeigte sich außerdem eine stärkere Proliferationsrate sowie E-Cadherin Expression während der Karzinogenese im Gegensatz zu *KATMC* Mäusen. Zudem konnte eine stärkere E-Cadherin Expression auch in *KATMEC* Tumoren gezeigt werden. In

in vitro konnte eine verstärkte Apoptoseinduktion nach *Ezh2*-Knockdown im Kontext der *Atm*-Defizienz festgestellt werden. Nach Hemmung der Methyltransferaseaktivität von EZH2 durch EPZ-6438 war eine verstärkte Apoptoseinduktion jedoch nicht feststellbar. Es wurden drei primäre *KATMEC* Pankreastumorzelllinien etabliert. Unterschiede zwischen *KATMC* und *KATMEC* Tumorzelllinien im Hinblick auf die Apoptoserate und Zellviabilität konnten jedoch nicht gezeigt werden.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, dass EZH2 in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen zur Tumorprogression beiträgt. Die EZH2 Inhibition könnte somit eine vielversprechende therapeutische Option in *Atm*-defizienten PDAC Subtypen darstellen. Weiterhin sprechen die Daten dieser Arbeit für die Relevanz der molekularen Stratifizierung des *ATM*-Status vor Einleitung einer Therapie mit EZH2-Inhibitoren im PDAC.

7 Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is predicted to be the second cancer associated cause of death after lung cancer by 2030. The dismal prognosis of PDAC is mainly driven by its resistance towards common cancer therapies which is predominantly caused by the intra- and interindividual molecular PDAC heterogeneity. Consequently, novel, stratification-based therapeutic strategies are urgently required to improve therapeutic responses and PDAC prognosis. One genetic alteration with therapy-predictive implications is the loss of the deoxyribonucleic acid damage gene *ataxia teleangiectatica mutated* (*ATM*) which occurs in around 12% of all PDAC specimen. In a transgenic mouse model, *Atm* loss in combination with oncogenic kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) activation promoted tumor progression and shortened survival. Moreover, preliminary data links *ATM*-deficient PDAC subtypes with over-expression of the tumor promoting histone-methyltransferase enhancer of zeste homolog 2 (EZH2).

The aim was to characterize the functional implications of EZH2 expression in *ATM*-deficient PDAC subtypes.

In order to examine oncogenic EZH2-functions, genetic (siRNA) and pharmacological (EPZ-6438) approaches were used to interfere with EZH2 activity in murine PDAC cells with constitutively active KRAS and an *ATM* deficiency (*KATMC* cell lines). Annexin V-propidium iodide stainings and flow cytometry were used to compare apoptosis of *Atm*-deficient PDAC cells in the presence and absence of EZH2. Furthermore, MTT Assays were used to analyze cell viability. Moreover, a transgenic mouse model with conditional activation of KRAS and *Atm*- and *Ezh2*-deficiency was generated (*KATMEC* mice). Mice were evaluated for phenotypic differences, survival, tumor-incidence and metastasis in comparison to EZH2 expressing control littermates (*KATMC* mice). Histological analysis was utilized to characterize the impact of EZH2 expression on the formation of PDAC precursor lesions and PDAC development. Tumor bearing *KATMEC* animals were further subjected to primary PDAC cell isolation.

Characterization of the model showed that *KATMEC* mice have a significantly longer overall and tumor survival than *KATMC* control animals expressing EZH2. Despite similar growth during the first twelve weeks, *KATMC* mice showed a significantly reduced weight compared to *KATMEC* mice at time of death. During carcinogenesis higher proliferation rate and higher E-cadherin expression could be observed in *KATMEC* mice compared to *KATMC* mice. Furthermore, E-cadherin expression was higher in *KATMEC* pancreatic tumors. *In vitro* data showed increased apoptosis rates after *Ezh2*-knockdown in the context of *Atm*-deficiency. Nevertheless, after inhibiting EZH2 enzymatic activity by EPZ-6438 in the context of *Atm*-deficiency no induction of apoptosis was detectable. In addition, three stable tumor cell lines could be isolated out of the *KATMEC* transgenic mouse model to compare with *KATMC* cell lines in terms of functional parameters. When comparing primary isolated *KATMC* and *KATMEC* cell lines no differences in cell viability and apoptosis rate were perceived.

Overall, our findings support the hypothesis of tumor progression-promoting EZH2 functions in *ATM*-deficient PDAC. Therefore, the inhibition of EZH2 might represent a promising therapeutic option in *ATM*-deficient PDAC subtypes. Together, these data argue for the relevance of molecular stratification regarding the *ATM* status prior to pharmacologically interfering with EZH2 activity and expression in PDAC therapy.

8 Literaturverzeichnis

- Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ (2014): Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer* **14**, 754–762
- Aung KL, Fischer SE, Denroche RE, Jang GH, Dodd A, Creighton S, Southwood B, Liang SB, Chadwick D, Zhang A, et al. (2018): Genomics-driven precision medicine for advanced pancreatic cancer: early results from the COMPASS trial. *Clin Cancer Res* **24**, 1344–1354
- Avan A, Crea F, Paolicchi E, Funel N, Galvani E, Marquez VE, Honeywell RJ, Danesi R, Peters GJ, Giovannetti E (2012): Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNeP) with gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **11**, 1735–1746
- Bachmann J, Ketterer K, Marsch C, Fechtner K, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME (2009): Pancreatic cancer related cachexia: influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer* **9**, 255
- Bachmann J, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME (2013): Cachexia in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: impact on survival and outcome. *Nutr Cancer* **65**, 827–833
- Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras MC, Miller DK, Christ AN, Bruxner TJC, Quinn MC, et al. (2016): Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52
- Basturk O, Hong S-M, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Brosens LAA, Fukushima N, Goggins M, Hruban RH, et al. (2015): A revised classification system and recommendations from the baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol* **39**, 1730–1741
- Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A (2000): The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84–89
- Baumgart S, Chen NM, Siveke JT, König A, Zhang JS, Singh SK, Wolf E, Bartkuhn M, Esposito I, Heßmann E, et al. (2014): Inflammation induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. *Cancer Discov* **4**, 688–701
- Berger ND, Stanley FKT, Moore S, Goodarzi AA (2017): ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses. *Philos Trans R Soc B* **372**, 1–14
- Biton S, Barzilai A, Shiloh Y (2008): The neurological phenotype of ataxia-telangiectasia: solving a persistent puzzle. *DNA Repair (Amst)* **7**, 1028–1038
- Blasius M, Bartek J (2013): ATM targets hnRNPK to control p53. *Cell Cycle* **12**, 1162
- Böhm I, Schild H (2003): Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* **5**, 2–14
- Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2003): The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* **116**, 499–511
- Boyer B, Thiery JP (1993): Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* **101**, 257–268
- Bremer SCB, Conradi LC, Mechie NC, Amanzada A, Mavropoulou E, Kitz J, Ghadimi M, Ellenrieder V, Ströbel P, Hessmann E, et al. (2019): Enhancer of zeste homolog 2 in colorectal cancer development and progression. *Digestion* **102**, 227–235
- Brugge WR, Lauwers GY, Sahani D, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL (2004): Cystic neoplasms of the pancreas. *N Engl J Med* **351**, 1218–1226

- Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, et al. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* **15**, 2403–2413
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000): The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76–83
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002): Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039–1043
- Chang CJ, Hung MC (2012): The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer* **106**, 243–247
- Chen NM, Neesse A, Dyck ML, Steuber B, Koenig AO, Lubeseder-Martellato C, Winter T, Forster T, Bohnenberger H, Kitz J, et al. (2017): Context-dependent epigenetic regulation of nuclear factor of activated T cells 1 in pancreatic plasticity. *Gastroenterology* **152**, 1507–1520
- Choi M, Kipps T, Kurzrock R (2016): ATM mutations in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* **15**, 1781–1791
- Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G, Weg-Remers S: Bauchspeicheldrüsenkrebs. In: Zentrum für Krebsregistrierdaten, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Auflage; Robert Koch-Institut 2019, 52–55
- Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L, et al. (2011): Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500–503
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, De la Fouchardière C, et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* **364**, 1817–1825
- Cremona CA, Behrens A (2014): ATM signalling and cancer. *Oncogene* **33**, 3351–3360
- Curtin NJ (2012): DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* **12**, 801–817
- De Lerma Barbaro A (2015): The complex liaison between cachexia and tumor burden (Review). *Oncol Rep* **34**, 1635–1649
- Dobrynin YV (1963): Establishment and characteristics of cell strains from some epithelial tumors of human origin. *J Natl Cancer Inst* **31**, 1173–1195
- Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, Seufferlein T, Haustermans K, Laethem JLV, Conroy T, Arnold D (2015): Cancer of the pancreas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **26**, v56–v68
- Epizyme, Inc. (2021): An open-label, multicenter, phase 1/2 study of tazemetostat (EZH2 histone methyl transferase [hmt] inhibitor) as a single agent in subjects with advanced solid tumors or with b-cell lymphomas and tazemetostat in combination with prednisolone in subjects with diffuse large b cell lymphoma. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01897571>, abgerufen am 20.06.2021
- Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA (2012): The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* **18**, 4266–4276
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F (2019): Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* **144**, 1941–1953

- Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, Kroemer G (2016): Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity* 44, 221–231
- Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, Park JO, Hochhauser D, Arnold D, Oh DY, et al. (2019): Maintenance olaparib for germline BRCA-mutated metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 381, 317–327
- Gout J, Perkhofers L, Morawe M, Arnold F, Ihle M, Biber S, Lange S, Roger E, Kraus JM, Stifter K, et al. (2020): Synergistic targeting and resistance to PARP inhibition in DNA damage repair-deficient pancreatic cancer. *Gut* 70, 743–760
- Greenburg G, Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333–339
- Grzenda A, Ordog T, Urrutia R (2011): Polycomb and the emerging epigenetics of pancreatic cancer. *J Gastrointest Cancer* 42, 100–111
- Gulati N, Béguelin W, Giulino-Roth L (2018): Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. *Leuk Lymphoma* 59, 1574–1585
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674
- Hay ED (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154, 8–20
- He A, Shen X, Ma Q, Cao J, von Gise A, Zhou P, Wang G, Marquez VE, Orkin SH, Pu WT (2012): PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev* 26, 37–42
- Hessmann E, Johnsen SA, Siveke JT, Ellenrieder V (2017): Epigenetic treatment of pancreatic cancer: is there a therapeutic perspective on the horizon? *Gut* 66, 168–179
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA (2006): Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20, 1218–1249
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, et al. (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005): Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483
- Hoy SM (2020): Tazemetostat: first approval. *Drugs* 80, 513–521
- Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE (2000): Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 156, 1821–1825
- Kakarougkas A, Ismail A, Chambers AL, Riballo E, Herbert AD, Künzel J, Löbrich M, Jeggo PA, Downs JA (2014): Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Mol Cell* 55, 723–732
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420–1428
- Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M (2012): Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730–733
- Karayannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K (2001): Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 21, 1355–1358

- Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, Wang W, Haswell JR, Walensky LD, Hahn WC, et al. (2015): SWI/SNF mutant cancers depend upon catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med* 21, 1491–1496
- Kim W, Bird GH, Neff T, Guo G, Kerenyi MA, Walensky LD, Orkin SH (2013): Targeted disruption of the EZH2/EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat Chem Biol* 9, 643–650
- Kleger A, Perkhof L, Seufferlein T (2014): Smarter drugs emerging in pancreatic cancer therapy. *Ann Oncol* 25, 1260–1270
- Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholc NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, et al. (2014): Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-hodgkin lymphoma. *Mol Cancer Ther* 13, 842–854
- Kopp JL, Von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL, Morris JP, Pan FC, Akiyama H, Wright CVE, Jensen K, et al. (2012): Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22, 737–750
- Kwon SJ, Park JH, Park EJ, Lee SA, Lee HS, Kang SW, Kwon J (2015): ATM-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling enzyme BRG1 modulates DNA double-strand break repair. *Oncogene* 34, 303–313
- Lavin MF, Kozlov S (2007): ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 931–942
- Li J, Chen J, Ricupero CL, Hart RP, Schwartz MS, Kusnecov A, Herrup K (2012): Nuclear accumulation of HDAC4 in ATM deficiency promotes neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. *Nat Med* 18, 783–790
- Li J, Hart RP, Mallimo EM, Swerdel MR, Kusnecov AW, Herrup K (2013): EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. *Nat Neurosci* 16, 1745–1753
- Lomberk G, Mathison AJ, Grzenda A, Urrutia R (2008): The sunset of somatic genetics and the dawn of epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research. *Curr Opin Gastroenterol* 24, 597–602
- Lomberk G, Blum Y, Nicolle R, Nair A, Gaonkar KS, Marisa L, Mathison A, Sun Z, Yan H, Elarouci N, et al. (2018): Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes. *Nat Commun* 9, 1978
- Looi CK, Chung FFL, Leong CO, Wong SF, Rosli R, Mai CW (2019): Therapeutic challenges and current immunomodulatory strategies in targeting the immunosuppressive pancreatic tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res* 38, 162
- Luxembourg: Publications Office of the European Union (2013): Revision of the european standard population - report of eurostat's task force. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-manuals-and-guidelines/-/KS-RA-13-028> abgerufen am 08.05.2021
- Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH (2005): Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 12, 81–91
- Malsy M, Bitzinger D, Graf B, Bundscherer A (2019): Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. *Eur J Med Res* 24, 5
- Margueron R, Reinberg D (2011): The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349
- Martinelli P, Carrillo-de Santa Pau E, Cox T, Sainz B, Dusetti N, Greenhalf W, Rinaldi L, Costello E, Ghaneh P, Malats N, et al. (2017): GATA6 regulates EMT and tumour dissemination, and is a marker of response to adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Gut* 66, 1665–1676
- Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A (2011): Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 141–150

- McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, Diaz E, et al. (2012): EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112
- Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ, Wright CVE, Stoffers DA, Leach SD (2005): Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 132, 3767–3776
- Meggio F, Donella Deana A, Ruzzene M, Brunati AM, Cesaro L, Guerra B, Meyer T, Mett H, Fabbro D, Furet P (1995): Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur J Biochem* 234, 317–322
- Michaelis KA, Zhu X, Burfeind KG, Krasnow SM, Lvasseur PR, Morgan TK, Marks DL (2017): Establishment and characterization of a novel murine model of pancreatic cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 8, 824–838
- Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J (2010): Molecular mechanism of pancreatic cancer: understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Arch Surg* 395, 295–308
- Mueller S, Engleitner T, Maresch R, Zukowska M, Lange S, Kaltenbacher T, Konukiewitz B, Öllinger R, Zwiebel M, Strong A, et al. (2018): Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 554, 62–68
- Mueller TC, Burmeister MA, Bachmann J, Martignoni ME (2014): Cachexia and pancreatic cancer: Are there treatment options? *World J Gastroenterol* 20, 9361–9373
- Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, Kipp BR, Klebig M, Winters JL, Szabo C, Zhang L, Eckloff BW, Petersen GM, et al. (2013): Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology* 145, 1098–1109
- Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, et al. (2001): Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 358, 1576–1585
- Neoptolemos JP, Cunningham D, Friess H, Bassi C, Stocken DD, Tait DM, Dunn JA, Dervenis C, Lacaine F, Hickey H, et al. (2003): Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives. *Ann Oncol* 14, 675–692
- Niknafs N, Zhong Y, Moral JA, Zhang L, Shao MX, Lo A, Makohon-Moore A, Iacobuzio-Donahue CA, Karchin R (2019): Characterization of genetic subclonal evolution in pancreatic cancer mouse models. *Nat Commun* 10, 5435
- Onesti JK, Guttridge DC (2014): Inflammation based regulation of cancer cachexia. *Biomed Res Int* 2014, 168407
- Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD (2008): Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase EZH2. *Clin Cancer Res* 14, 6790–6796
- Patil S, Steuber B, Kopp W, Kari V, Urbach L, Wang X, Küffer S, Bohnenberger H, Spyropoulou D, Zhang Z, et al. (2020): EZH2 regulates pancreatic cancer subtype identity and tumor progression via transcriptional repression of GATA6. *Cancer Res* 80, 4620–4632
- Peretti U, Cavaliere A, Niger M, Tortora G, Di Marco MC, Rodriquenz MG, Centonze F, Rapposelli IG, Giordano G, De Vita F, et al. (2021): Germinal BRCA1-2 pathogenic variants (gBRCA1-2pv) and pancreatic cancer: epidemiology of an Italian patient cohort. *ESMO Open* 6, 100032
- Perkhofer L, Schmitt A, Romero Carrasco MC, Ihle M, Hampp S, Ruess DA, Hessmann E, Russell R, Lechel A, Azoitei N, et al. (2017): ATM deficiency generating genomic instability sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma cells to therapy-induced DNA damage. *Cancer Res* 77, 5576–5590

- Perkhofer L, Gout J, Roger E, Kude de Almeida F, Simões CB, Wiesmüller L, Seufferlein T, Kleger A (2020): DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives. *Gut* 70, 606–617
- Pihlak R, Valle JW, McNamara MG (2017): Germline mutations in pancreatic cancer and potential new therapeutic options. *Oncotarget* 8, 73240–73257
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913–2921
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Rebelatto TF, Falavigna M, Pozzari M, Spada F, Cella CA, Laffi A, Pellicori S, Fazio N (2019): Should platinum-based chemotherapy be preferred for germline BReast CAncer genes (BRCA) 1 and 2-mutated pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 80, 101895
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) (Hrsg.) (2020): GEKID-Atlas - Tabellenabfrage. RKI https://atlas.gekid.de/Tabellen/Tabellen_D.php, abgerufen am 17.11.2020
- Roger E, Gout J, Arnold F, Beutel AK, Müller M, Abaci A, Barth TFE, Rasche V, Seufferlein T, Perkhofer L, Kleger A (2020): Maintenance therapy for ATM-deficient pancreatic cancer by multiple DNA damage response interferences after platinum-based chemotherapy. *Cells* 9, 2110
- Roy DM, Walsh LA, Chan TA (2014): Driver mutations of cancer epigenomes. *Protein Cell* 5, 265–296
- Rüegg UT, Burgess GM (1989): Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10, 218–220
- Russell R, Perkhofer L, Liebau S, Lin Q, Lechel A, Feld FM, Hessmann E, Gaedcke J, Güthle M, Zenke M, et al. (2015): Loss of ATM accelerates pancreatic cancer formation and epithelial–mesenchymal transition. *Nat Commun* 6, 7677
- Sauvageau M, Sauvageau G (2010): Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7, 299–313
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97, 695–710
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K: *Innere Organe PROMETHEUS: LernAtlas der Anatomie*. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Sedgwick RP, Boder E (1960): Progressive ataxia in childhood with particular reference to ataxia-telangiectasia. *Neurology* 10, 705–715
- Shiloh Y, Ziv Y (2013): The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 197–210
- Simeone N, Frezza AM, Zaffaroni N, Stacchiotti S (2021): Tazemetostat for advanced epithelioid sarcoma: current status and future perspectives. *Future Oncol* 17, 1253–1263
- Suri R, Zimmerman JW, Burkhart RA (2020): Modeling human pancreatic ductal adenocarcinoma for translational research: current options, challenges, and prospective directions. *Ann Pancreat Cancer* 3, 17

- Tada M, Arizumi T, Arizumi M, Nakai Y, Sasaki T, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Tsujino T, Hirano K, et al. (2008): Efficacy of gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer: comparison with 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Chemotherapy* **54**, 302–308
- Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RKM, Tan PBO, Liu ET, Yu Q (2007): Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* **21**, 1050–1063
- Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442–454
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2020a): FDA approves first treatment option specifically for patients with epithelioid sarcoma, a rare soft tissue cancer. FDA <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-option-specifically-patients-epithelioid-sarcoma-rare-soft-tissue>, abgerufen am 16.07.2021
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2020b): FDA granted accelerated approval to tazemetostat for follicular lymphoma. FDA <https://www.fda.gov/drugs/fda-granted-accelerated-approval-tazemetostat-follicular-lymphoma>, abgerufen am 20.06.2021
- Vogelzang NJ, Benowitz SI, Adams S, Aghajanian C, Chang SM, Dreyer ZE, Janne PA, Ko AH, Masters GA, Odenike O, et al. (2012): Clinical cancer advances 2011: annual report on progress against cancer from the american society of clinical oncology. *J Clin Oncol* **30**, 88–109
- Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO (2015): Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am J Transl Res* **7**, 175–193
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjuland SA, Ma WW, Saleh MN, et al. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* **369**, 1691–1703
- Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, et al. (2015): Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501
- Wang L, Xie D, Wei D: Pancreatic acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer. In: Su GH (Hrsg.): *Pancreatic Cancer: Methods in Molecular Biology*. Band 1882; Humana Press, New York 2019, 299–308
- Yang J, Weinberg RA (2008): Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**, 818–829
- Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman AC, Draetta GF, Maitra A, DePinho RA (2016): Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **30**, 355–385
- Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P (2004): Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* **3**, 187–197
- Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R (2015): EMT program is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525–530
- Zhong Y, Macgregor-Das A, Saunders T, Whittle MC, Makohon-Moore A, Kohutek ZA, Poling J, Herbst BT, Javier BM, Cope L, et al. (2017): Mutant p53 together with TGF β signaling influence organ-specific hematogenous colonization patterns of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **23**, 1607–1620

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Rahmen meiner Doktorarbeit an der Universität Göttingen unterstützt haben.

Einen großen Dank möchte ich an erster Stelle meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Elisabeth Heßmann aussprechen, die meine Arbeit in den letzten zwei Jahren betreute und begutachtete. Ich bin sehr dankbar für die Themenauswahl sowie die exzellente Betreuung mit regelmäßigen Treffen, Feedbacks, Laborbesprechungen. Ihre Unterstützung hat meine persönliche Entwicklung nachhaltig befördert und mein Medizinstudium sehr bereichert.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Herrn Professor Dr. med. Philipp Ströbel für seine engagierte Betreuung und sein wichtiges Feedback im Rahmen meiner zwei Fortschrittsberichte bedanken.

Ich bedanke mich aufrichtig bei der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des DGVS Promotionsstipendiums.

Zudem möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Lennart Versemann für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft und Geduld beim Erlernen verschiedenster *In-vitro*-Techniken und einem hervorragenden Zeitmanagement bedanken.

Ich bedanke mich für das Erlernen der *In-vivo*-Techniken bei Frau Waltraut Kopp, die mich mit viel Zeit und Geduld bei der Arbeit mit genetisch modifizierten PDAC Mausmodellen und beim Erstellen von Färbungen unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Sercan Mercan bedanken, der mir ebenso bei der Arbeit mit genetisch modifizierten PDAC Mausmodellen zur Seite stand. Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. Shilpa Patil und Frau Dr. Zhang Zhe für ihre Hilfe beim Auswerten immunhistochemischer Färbungen.

Vielen Dank an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Heßmann, AG Ellenrieder und AG Neeße für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. rer. med. Alexander Kleger, Frau Dr. Elodie Roger und Herrn Dr. Johann Gout für die Bereitstellung von Survival-Daten, Tumorinzidenzdaten, histologischen Schnitten und die Durchführung und Auswertung immunhistochemischer E-Cadherin-Färbungen sowie für den regen wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Vielen Dank an Frau Dr. Shilpa Patil, Frau Waltraut Kopp und Herrn Benjamin Steuber für die Erhebung und Bereitstellung der Survivaldaten der transgenen Mauslinien *KC* und *KEC*.

Außerdem vielen Dank an Herrn Professor Dr. med. Matthias Dobbstein, Frau Dr. Geske Schmidt und Frau Dr. Shilpa Patil für die Bereitstellung histologischer Schnitte von Cisplatin

behandelten C56BL/6J-Wildtyp-Mäusen, die in einem syngenem Modell orthotop mit PDAC Zellen von *KPC*-Mäusen transplantiert wurden.

Abschließend möchte ich mich beim Deutschen Pankreasclub für die Möglichkeit der Posterpräsentation und den Posterpreis am 14.02.2020 in Halle (Saale) bedanken, wodurch ich wichtige Erfahrungen für spätere wissenschaftliche Arbeiten sammeln durfte.