Aus der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinale Onkologie

Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Charakterisierung des NF- κ B- Signalwegs in *ARID1A*-defizienten Pankreaskarzinomsubtypen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lena Aperdannier

aus

Dissen a.T.W.

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuerin: PD Dr. med E. Heßmann

Ko-Betreuer: PD Dr. med. M. Grade

Prüfungskommission

Referentin: PD Dr. med E. Heßmann

Ko-Referent: PD Dr. med. M. Grade

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 18.08.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung des NF- κ B-Signalwegs in *ARID1A*-defizienten Pankreaskarzinomsubtypen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Aperdannier L, Zhang Z, Spitalieri J, Hasselluhn MC, Sen M, Singh SK, Kellner C, Kopp W, Ellenrieder V, Johnsen SA, Hessmann E (2018): Characterizing inflammatory signaling pathways in ARID1a-deficient PDAC subtypes. *Pancreatology* 18, 149–50

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 10 -
1.1	Das Pankreaskarzinom.....	- 10 -
1.2	Histologische Veränderungen des Pankreas während der.....	- 11 -
1.3	Karzinogenese	- 11 -
1.4	Die Molekularbiologie des PDACs	- 12 -
1.5	Epigenetische Regulatoren im PDAC	- 14 -
1.6	<i>ARID1A</i> als Teil des SWI/SNF-Komplexes	- 15 -
1.7	Karzinogenese und Inflammation.....	- 17 -
1.8	Der NF- κ B-Signalweg	- 19 -
1.9	Zielsetzung der Arbeit.....	- 20 -
2.	Material und Methoden	- 21 -
2.1	Material	- 21 -
2.1.1	Das LoxP-System	- 33 -
2.1.2	Die Mauslinien.....	- 34 -
2.2	Methoden	- 35 -
2.2.1	Allgemeine Bemerkungen.....	- 35 -
2.2.2	Zellarbeit.....	- 35 -
2.2.3	Passagieren adhärenter Zellen.....	- 35 -
2.2.4	Zellzählung und Aussaat.....	- 36 -
2.2.5	Zellernte.....	- 37 -
2.2.6	Erstellung von Zellstocks	- 38 -
2.2.7	Gen-Silencing mithilfe von Lipofektion.....	- 38 -
2.2.8	Überexpression von Genen in Zellen.....	- 39 -
2.2.9	Behandlungen von Zellen mit Staurosporin.....	- 39 -
2.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford.....	- 39 -
2.2.11	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	- 40 -
2.2.12	Western Blot	- 42 -
2.2.13	Isolation von RNA aus Zellen	- 44 -
2.2.14	Messen der RNA.....	- 44 -
2.2.15	Umschreiben der RNA	- 45 -
2.2.16	Quantitative Echtzeit-PCR.....	- 45 -
2.2.17	Funktionelle Readouts.....	- 47 -
2.2.18	Reporter-Assay	- 47 -
2.2.19	FACS-Analyse der Annexin/ PI-Färbung	- 48 -
2.2.20	Die CRISPR/Cas9-Methode.....	- 49 -

2.2.21	Klonierung der Guide-RNA	49 -
2.2.22	Picken von Kolonien für Mini DNA-Preperation.....	50 -
2.2.23	DNA-Isolation	51 -
2.2.24	Mycoplasmentest und Mycoplasmenbehandlung.....	52 -
2.2.25	Transfektion der Guide-RNA.....	52 -
2.2.26	Polymerase-Kettenreaktion	53 -
2.2.27	Agarosegelelektrophorese.....	54 -
2.2.28	Färbemethoden	56 -
2.2.29	Gewinnung von Slides aus Histoblöcken.....	56 -
2.2.30	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	56 -
2.2.31	Immunhistochemie ABCMethode.....	57 -
2.2.32	Quantifizierung von CD45 in der IHC	58 -
2.2.33	Immunfluoreszenz in Zellen.....	59 -
2.2.34	Quantifizierung der Immunfluoreszenzen.....	60 -
2.2.35	Zytokin-ELISA	60 -
2.2.36	Supernatant-Assay.....	61 -
2.3	Statistik.....	62 -
3.	Ergebnisse	- 63 -
3.1	Der <i>ARID1A</i> -Verlust führt zu verstärkter Karzinogenese und Inflammation.....	63 -
3.2	<i>ARID1A</i> und der NF- κ B-Signalweg	73 -
3.3	Die <i>ARID1A</i> -Defizienz beeinflusst auch andere Signalwege.....	80 -
3.4	Die vermehrte Zytokinsekernierung ist Folge der vermehrten Signalwegaktivierung durch die <i>ARID1A</i> -Defizienz	81 -
3.5	Der Einfluss der <i>ARID1A</i> -Defizienz auf das Apoptoseverhalten	84 -
3.6	Der K.D. von p65 führt nicht zu einem Rescue der gesteigerten Expression von Zytokinen im Kontext der <i>ARID1A</i> -Defizienz.....	88 -
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	90 -
4.	Diskussion	- 91 -
4.1	Subtypen des Pankreaskarzinoms.....	91 -
4.2	Konsequenzen des <i>ARID1A</i> -Verlusts im PDAC	92 -
4.3	<i>ARID1A</i> und Inflammation	94 -
4.4	<i>ARID1A</i> und Apoptose	97 -
4.5	<i>ARID1A</i> und NF- κ B	99 -
4.6	Erweiterte Einflussfaktoren	103 -
4.7	Zusammenfassung	104 -
4.8	Ausblick	104 -

5.	Zusammenfassung.....	- 106 -
6.	Summary	- 107 -
7.	Literaturverzeichnis	- 108 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model der Karzinogenese des Pankreas angelehnt an	13 -
Abbildung 2: Der SWI/SNF-Komplex.....	15 -
Abbildung 3: <i>ARID1A</i> -Mutationshäufigkeit.....	16 -
Abbildung 4: Schema zum NF- κ B-Signalweg	19 -
Abbildung 5: Kreuzung der Mauslinien	34 -
Abbildung 6: In der IHC bestätigte sich der <i>Arid1a</i> K.O.....	64 -
Abbildung 7: <i>Arid1a</i> ^{fl/fl} ; <i>Kras</i> ^{G12D} Mäuse weisen im Vergleich zu <i>Kras</i> ^{G12D} Mäusen eine verstärkte Läsionenbildung auf.....	64 -
Abbildung 8: <i>Arid1a</i> defiziente Mäusen weisen mehr Immunzellinfiltration auf.	66 -
Abbildung 9: Ein CRISPR/Cas9 <i>ARID1A</i> K.O. wurde in zwei Zelllinien durchgeführt.	67 -
Abbildung 10: Der K.O. führt auf mRNA-Ebene zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Zytokine.	68 -
Abbildung 11: Die Sezernierung von IL6 und TNF α in den K.O. Zellen war erhöht.....	69 -
Abbildung 12: Eine erhöhte Sezernierung von Il6 in den KPC zeigte sich nicht.	70 -
Abbildung 13: Die Konzentration inflammatorischer Zytokine ist im <i>ARID1A</i> K.O. Klon erhöht.	71 -
Abbildung 14: Der Einfluss der <i>ARID1A</i> -Defizienz zeigt sich abgeschwächt in einem transienten Knock-Down.	72 -
Abbildung 15: Ein Verlust von <i>ARID1A</i> führt zur verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs.	74 -
Abbildung 16: Auf mRNA-Ebene ist die Expression von NF- κ B Zielgenen verstärkt.	75 -
Abbildung 17: Eine <i>ARID1A</i> -Defizienz führt zur erhöhten Transaktivierung eines NF- κ B responsiven Promoters.....	76 -
Abbildung 18: Nach Reexpression von <i>ARID1A</i> sinkt die Transaktivierung des NF- κ B responsiven Promoters dosisabhängig.....	77 -
Abbildung 19: In der IF zeigte sich ein erhöhter Anteil von p65 im Kern der <i>ARID1A</i> K.O. Zellen.	78 -

Abbildung 20: Die p65 Lokalisation zeigte sich in den KPC-Zellen vom Arid1a-Status unabhängig.	79 -
Abbildung 21: In den <i>ARID1A</i> K.O. Mäusen zeigt sich eine vermehrte pSTAT3-Färbung....	80 -
Abbildung 22: In den <i>ARID1A</i> K.O. Klonen zeigte sich die Phosphorylierung am Tyr 705 von STAT3 vermehrt.	81 -
Abbildung 23: Der Überstand der <i>ARID1A</i> K.O. Zellen führt zu einer verstärkten Transaktivierung eines NF- κ B responsiven Promoter.	83 -
Abbildung 24: Das Apoptoseverhalten wird nicht durch <i>ARID1A</i> beeinflusst.....	84 -
Abbildung 25: Staurosporin beeinflusst das Apoptoseverhalten stark.	85 -
Abbildung 26: Der <i>ARID1A</i> K.O. Klon reagiert vermindert auf Apoptoseinduktion.....	87 -
Abbildung 27: In der IF mit p65 K.D. zeigt sich keine Veränderung hinsichtlich IL6.	89 -
Abbildung 28: Mutierte Gene im PDAC angelehnt an.....	91 -
Abbildung 29: Mäuse mit einem Verlust von <i>Arid1a</i> versterben deutlich früher.	94 -
Abbildung 30: Die Gene des NF- κ B-Signalwegs zeigen eine verstärkte Aktivierung in den <i>ARID1A</i> K.O. Zellen.	100 -
Abbildung 31: Zwei mögliche Hypothesen zur Auswirkung des ARID1A-Verlusts.....	101 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	- 21 -
Tabelle 2: Geräte	- 23 -
Tabelle 3: Software.....	- 24 -
Tabelle 4: Chemikalien	- 25 -
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	- 26 -
Tabelle 6: Proteine	- 28 -
Tabelle 7: Proteinasen	- 29 -
Tabelle 8: Inhibitoren	- 29 -
Tabelle 9: Material Knock-Down.....	- 29 -
Tabelle 10: Material Reporter-Assay	- 29 -
Tabelle 11: Vektoren.....	- 29 -
Tabelle 12: Material CRISPR/Cas9-Kits.....	- 30 -
Tabelle 13: Primer und Guide-RNA CRISPR/Cas9.....	- 30 -
Tabelle 14: Klonierungsbakterien.....	- 31 -
Tabelle 15: Antikörper.....	- 31 -
Tabelle 16: Primer.....	- 32 -
Tabelle 17: Zelllinien	- 32 -
Tabelle 18: Zellmedium.....	- 33 -
Tabelle 19: Mauslinien.....	- 33 -
Tabelle 20: Volumenberechnung zur Zellaussaat	- 37 -
Tabelle 21: Berechnung zur Überexpression von Genen.....	- 39 -
Tabelle 22: Bradford-Assay Pipettierschema	- 40 -
Tabelle 23: Konzentrationsberechnung zur Probenherstellung	- 41 -
Tabelle 24: Herstellung eines Primer-Master-Mixes.....	- 46 -
Tabelle 25: PCR-Zyklus	- 46 -

Tabelle 26: Stocks Reporter-Assay	- 47 -
Tabelle 27: Mastermix zur Klonierung der Guide-RNA	- 49 -
Tabelle 28: Verdauansatz	- 50 -
Tabelle 29: Puffer der Ligase.....	- 50 -
Tabelle 30: Komponenten zur Transfektion der Guide-RNAs.....	- 53 -
Tabelle 31: Konditionen Kappa-Mix	- 54 -
Tabelle 32: CRISPR/Cas9-PCR-Programm für die PCR-Reaktion.....	- 54 -
Tabelle 33: Modellskizze zur Zellbehandlung im Überstandsexperiment	- 62 -

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>avidin-biotin-complex</i>
BAF	<i>BRG1-associated factor</i> , BRG1-assoziierter Faktor
BSA	<i>bovines serum albumin</i> , Serumalbumin des Rinds
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> , Schwellenwert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribunucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> , Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i> , Fehlerrate
FOLFIRINOX	5-Fluoruracil (5-FU), Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan
for	<i>forward</i> , vorwärts
FPKM	<i>fragments per kilobase million</i> , Fragmente pro Millionen Kilobasen
gDNA	genomische DNA
GSEA	<i>gene set enrichment analysis</i> , Genexpressionsanalyse
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
H3K27	Lysin 27 an Histon 3
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie
JAK-STAT	<i>Januskinase- Signal Transducers and Activators of Transcription</i> , Januskinase- Signal Transduktor und Aktivator der Transkription
K.D.	Knock-Down
KNS	<i>STAT3^{-/-}; NFATc1^{+/wt}; KRAS^{G12D}; p48-Cre</i>
K.O.	Knock-Out
KRAS	Kirsten rat sarcoma
loxP	<i>locus of x over P1 Bacteriophage</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCN	<i>mucinous cystic neoplasms</i> , muzinöse zystische Neoplasie

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
NES	<i>normalized enrichment scores</i> , normalisierten Anreicherungsweite
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> , Nukleärer Faktor Kappa Lichtkettenenhancer aktivierter B-Zellen
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NS-Membran	Nitrocellulosemembran
OD	optische Dichte
Oligo dT-Primer	Oligo-Deoxythymidin-Primer
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i> , intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PBAF	<i>Polybromo-associated BRG1-associated factor</i> , Polybrom-assoziierter BRG1 assoziierter Faktor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , duktales Adenokarzinom des Pankreas
PI	<i>propidium iodide solution</i> , Propidiumiodid-Lösung
qRT-PCR	<i>quantitative realtime polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
rev	<i>reverse</i> , gegenläufig
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Sp	<i>supernatant</i> , Überstand
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> , Signaltransduktor und Transkriptionsaktivierer 3
SWI/SNF	<i>SWItch/ Sucrose Non-Fermentable</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TMA	<i>tissue microarray</i> , Gewebemikroanalysen
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tyr 705	Tyrosin 705
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) gehört zu den aggressivsten soliden Tumoren mit einer in der Regel infausten Prognose. Aufgrund der steigenden Inzidenz der Erkrankung, fehlender diagnostischer Verfahren für die Detektion in frühen Tumorstadien und einer ausgeprägten Therapieresistenz, sagen aktuelle Studien voraus, dass das Pankreaskarzinom noch vor 2030 die zweithäufigste Krebs-bedingte Todesursache darstellen wird (Rahib et al. 2014). Die fünf Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit liegt bei unter 9 % (Siegel et al. 2019). Das Pankreas liegt im oberen Epigastrium und ist über die Ampulla Vaterii mit dem Duodenum verbunden (Slack 1995). Das Organ wird in den Kopf, den Hals, den Körper und den Schwanz unterteilt (Nagai 2003). Mit einem Anteil von 90 % stellt das PDAC den häufigsten histologischen Typ aller Pankreastumoren dar (Ormanns et al. 2014). 2019 wurden in den USA bei geschätzten 174.650 PDAC Neuerkrankungen 45.750 Todesfällen erwartet (Siegel et al. 2019). Bei 50,4 % der betroffenen Patienten handelte es sich um Männer (Wasif et al. 2010). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 66 Jahren (Wasif et al. 2010).

Die Ausbreitung, der Lymphknotenbefall und die Metastasierung spiegeln sich im TNM Stadium des PDAC wider, welches prognose- und therapieentscheidend ist. Dabei werden histologische Befunde hinsichtlich ihrer Differenzierung (vor allem der Drüsen), der Muzin-Produktion (Grad 1: intensiv, Grad 2: pathologisch, Grad 3: fast nicht vorhanden), der Anzahl der Mitosen und der Kernatypien beurteilt. Anhand der Einteilung lässt sich ein Aufschluss über die Prognose gewinnen (Hruban und Fukushima 2007).

Als Risikofaktoren für die Entstehung des PDACs gelten vor allem Nikotinabusus, starker Alkoholkonsum, sowie eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, einem gramnegativen Stäbchenbakterium (Bulajic et al. 2014). Eine vorangegangene oder chronische Pankreatitis lässt das Risiko für ein PDAC signifikant steigen. In 5 - 10 % aller Fälle kommt es zu einer familiären Häufung des PDACs, was eine genetische Prädisposition vermuten lässt (Spadi et al. 2016).

Aufgrund der fehlerhaften Funktionalität des insulinproduzierenden Pankreas gilt Diabetes mellitus als ein frühes Symptom. Gleichzeitig wird die Diabeteserkrankung auch als Risikofaktor gesehen, weshalb frühzeitig zu differenzieren ist, ob bereits ein Karzinom vorliegt oder die Diabeteserkrankung solitär auftritt (Yeo 2015). Die Symptome des Pankreaskarzinoms sind unspezifisch. Es können Müdigkeit, Oberbauchschmerzen und Gewichtsverlust auftreten. Da diese Probleme häu-

fig mit gastrointestinalen Infektionen verwechselt werden, haben viele Patienten bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium bei Diagnosestellung (DiMagno 1999). Häufige Warnsignale sind ein schmerzloser Ikterus und thrombotische Ereignisse (Wolfgang et al. 2013).

Einzig die Operation ist kurativ. Leider befinden sich nur 20 % aller Patienten bei Diagnosestellungen in einem operablen Stadium (Hruban und Fukushima 2007). Je nach Tumorlokalisation sind verschiedene Operationsverfahren möglich. Hierbei ist die Whipple-Operation mit Abstand die bekannteste (Cameron et al. 2006), bei der im Unterschied zur distalen oder totalen Pankreatektomie zusätzlich zum Pankreaskopf und den regionalen Lymphknoten die Gallenblase und das Duodenum entfernt werden (Brunner und Scott-Brown 2010). Chemotherapieschemata wie FOLFIRINOX (5-Fluoruracil, Folinsäure, Oxaliplatin und Irinotecan) (Faris et al. 2013), der Einsatz von Gemcitabine (Neesse et al. 2015) oder nab-Paclitaxel (Neesse et al. 2015) sind bereits seit langer Zeit etabliert, führen bei vielen Tumoren jedoch zu keinem Ansprechen. Die meisten Patienten sterben innerhalb kurzer Zeit nach Diagnosestellung trotz Therapie (Spadi et al. 2016).

Die Aggressivität des Pankreaskarzinoms kann mit den zurzeit vorherrschenden Therapieschemata nicht ausreichend angegangen werden. Aufgrund der hohen Letalität müssen neue Therapiemöglichkeiten untersucht werden, um der infausten Prognose in Zukunft besser entgegen wirken zu können.

1.2 Histologische Veränderungen des Pankreas während der Karzinogenese

Die Entstehung des PDACs ist ein schrittweiser Prozess. Die Ursprungszellen, aus denen das Adenokarzinom schlussendlich entsteht, lassen sich nicht klar eingrenzen. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass sich im Kontext einer *KRAS*-Mutation (Kirsten rat sarcoma, siehe 1.4) Azinär-Duktales-Metaplasien bilden (*acinar-to-ductal metaplasia*, ADM), welche weiter dedifferenzieren (Storz 2017; Kimura et al. 2018; Livshits et al. 2018; Wang L et al. 2019). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch duktales Zellen in einem bestimmten genetischen Umfeld zu PDACs entarten können (Kopp et al. 2018; Lee et al. 2018; Xu et al. 2019).

Histologisch wurden Vorläuferläsionen des PDAC identifiziert, die sich basierend auf ihren histologischen Charakteristika in verschiedene Gruppen einteilen lassen: die PanINs (*pancreatic intraepithelial neoplasia*, Intraepitheliale Neoplasien im Pankreas), die MCNs (*mucinous cystic neoplasm*, muzinöses zystische Neoplasien) und die IPMNs (*intraductal papillary mucinous neoplasm*, intraduktales papilläres muzinöses Neoplasien) (Distler et al. 2014).

Bei IPMNs handelt es sich um Entartungen des Drüsenepithels, getriggert durch eine erhöhte Muzinproduktion, sowie epitheliale Proliferation (Matthaei et al. 2011; Mino-Kenudson et al. 2011).

MCNs werden häufig als Zufallsbefunde entdeckt. Im Gegensatz zu den IPMNs haben sie keine Verbindung zu den Pankreasgängen oder Drüsen, fallen jedoch durch veränderte Zellen und eine gesteigerte Muzinproduktion auf (Matthaei et al. 2011). PanINs sind die häufigsten vom Epithel ausgehenden Vorläuferläsionen des PDACs und nehmen mit steigendem Alter des Patienten zu. Definiert durch den Grad der vorliegenden Atypien, lassen sie sich in PanIN I-III einteilen (Storz 2017). Deren weitere Dedifferenzierung wird durch ein heterogenes Muster an zugrundeliegenden Mutationen mitbestimmt (Morris et al. 2010).

1.4 Die Molekularbiologie des PDACs

Mit verschiedenen Untersuchungsmethoden basierend auf Technologien des *Next Generation Sequencing* (NGS) hat die molekulargenetische Charakterisierung von Tumoren eine neue Bedeutung bekommen. Das PDAC ist molekular ein sehr heterogener Tumor, dessen genetischer Hintergrund einer hohen Plastizität zugrunde liegt und sowohl die Bildung der Vorläuferläsionen, wie die PDAC Entstehung stark beeinflusst (Bardeesy und DePinho 2002). Unter diesen Mutationen ist die *KRAS*-Mutation die häufigste und früheste (Moskaluk et al. 1997). Das *RAS*-Gen liegt auf Kodon 12 auf Exon Eins. Es gehört zu der sogenannten *RAS*-Familie. Die drei zugehörigen Gene kodieren für Proteine mit Guanosine-5'-triphosphate (GTP)-Aktivität, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen (Hruban et al. 1993). Eine *KRAS*-Mutation führt zu einer dauerhaften GTPase-Aktivität und anhaltenden Signaltransduktion, wodurch tumorprogressionsfördernde zelluläre Funktionen wie z. B. Proliferation getriggert werden (Yin et al. 2017). Bisher konnte *KRAS* in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Vor allem im Kolorektalen- (Bos et al. 1987), im Bronchial- (Santos et al. 1984) und im Pankreaskarzinom (Hingorani et al. 2003) finden sich häufig *KRAS*-Mutationen, die neben einem starken Zellwachstum vermutlich auch lokale Entzündungsprozesse triggern.

Die *Kras*-Mutation wurde in genetisch modifizierten Mausmodellen des Pankreaskarzinoms untersucht, um deren Einfluss auf die Karzinogenese genauer zu bestimmen. Dazu wurde eine Mauslinie mit einer *Kras*-Punktmutation (*LSL-Kras^{G12D}*) mit einer p48-Cre exprimierenden Mauslinie (*p48+/Cre*) gekreuzt (Hingorani et al. 2003). Im Rahmen dieser *Kras*-Mutation zeigte sich eine gesteigerte Aktivität der GTPase (Hingorani et al. 2003).

Auch andere Mutationen, z. B. der Gene *CDKN2A*, *TP53* oder *SMAD4* findet man in fortgeschrittenen Stadien der Pankreaskarzinogenese (Waddell et al. 2015). Einer Mutation im *KRAS*-Gen folgt häufig eine Mutation im Gen *CDKN2A*. Dieses codiert für die Proteine p14Arf und p16 mit tumorsuppressiven Eigenschaften (Stott et al. 1998). In 50 - 75 % der PDAC lässt sich eine *TP53*-Mutation finden (Hingorani et al. 2005). Diese führt zu Veränderungen im Apoptoseverhalten und

in der Reparatur von DNA-Schäden (*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure). *TP53* ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen, dessen Mutation die Zellentartung weiter triggert (Hingorani et al. 2005; Hruban et al. 2008). Auch bei *SMAD4* handelt es sich um ein in 50 % aller PDACs mutiertes Tumorsuppressorgen (Wang Z et al. 2019).

Abbildung 1: Model der Karzinogenese des Pankreas angelehnt an (Hruban, Maitra und Goggins 2008, Fig. 2) Während der Karzinogenese akkumulieren Mutationen im Pankreas.

Die genannten Mutationen stellen nur Beispiele für das hohe Maß an genetischer Vielfalt des PDACs dar. Pro Karzinom finden sich mehr als 60 genetisch unterschiedliche Mutationen, die im PDAC vorkommen (Jones et al. 2008). Diese molekulare Heterogenität erschwert es, die Auswirkungen auf den Phänotyp und die Mechanismen in der Karzinogenese zu verstehen und die Effekte gezielt therapieren zu können. Ein genaues Verständnis dieser genetischen Heterogenität und ihrer Auswirkungen wäre für eine auf den Tumor zugeschnittenen Therapie entscheidend. Dies wird z. B. zur Therapie des Mammakarzinoms verwendet, bei der der Hormonrezeptorstatus des Tumors therapieentscheidend und damit für prognoseverändert ist (Harvey et al. 1999). Auch im Kolonkarzinom werden Therapieentscheidungen mit Hinblick auf den genetischen Hintergrund des Tumors getroffen. So erlaubt eine *KRAS*-Mutation keine Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Cetuximab (Lièvre et al. 2006).

Auch im PDAC ließen sich verschiedene Subtypen hinsichtlich ihres genetischen Status finden. Bailey und Kollegen zeigten 2016, dass verschiedene Mutationen im PDAC häufig im gleichen Muster auftreten und sich in vier Untergruppen einteilen lassen. Diese Subtypen sind von entscheidender prognostischer Relevanz. So konnte gezeigt werden, dass der sogenannte „*squamous*“ Subtyp ein deutlich schlechteres Überleben aufwies als die anderen Subtypen (Bailey et al. 2016). Darüber hinaus haben die Subtypen auch Therapie-prädiktive Auswirkungen. So gibt es beispielsweise Evidenz für ein *KRAS*-Status abhängiges Ansprechen auf unterschiedliche Therapien des PDACs (Collisson et al. 2011). Weitere Daten suggerieren, dass eine erhöhte Vulnerabilität *KDM6A*-defizienter PDAC Subtypen gegenüber BET-Inhibitoren besteht (Andricovich et al. 2018). Darüber hinaus sprechen PDACs mit einer *BRCA*-Mutation besonders gut auf eine Chemotherapie mit Platinderivaten und PARP-Inhibitoren an (Kowalewski et al. 2018). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Therapie des PDACs abhängig vom Mutationsstatus unterschiedlich effektiv sein kann und unterstreicht somit die Relevanz, die Subtypen des PDACs genauer zu erforschen (Jones et al.

2008; Iliopoulos et al. 2009; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016; Hessmann et al. 2017). Ein Ziel translationaler Tumorforschung im Pankreas ist es, die Therapie-prädiktiven Alterationen zu identifizieren, um Behandlungskonzepte Subtyp-stratifiziert anbieten zu können.

1.5 Epigenetische Regulatoren im PDAC

Neben Mutationen gibt es auch andere Mechanismen, die in der Tumorentstehung relevant sind. Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Beeinflussung von Genen in ihrer Aktivität, wobei deren Sequenz dabei unverändert bleibt. Dabei führen Histonmodifikationen, Chromatinumbau, *non-coding* Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) und die Methylierung von DNA zu Veränderungen der Transkription (Plass et al. 2013). Durch epigenetische Mechanismen können Zellen mit identischem Genotyp phänotypische Unterschiede aufweisen. So sind auch die Tumorzellen epigenetischen Dysregulationen unterworfen (Iliopoulos et al. 2009). Daher wird die Untersuchung epigenetischer Einflüsse in der Krebsforschung zunehmend wichtiger (Iliopoulos et al. 2009).

Neben der Methylierung von DNA-Basen spielt auch das Chromatinremodeling eine wichtige Rolle. Eine Öffnung des Chromatins ermöglicht das Ablesen von Genabschnitten, die so transkribiert werden können (Bártová et al. 2008). Das Chromatin wird je nach Kondensationsgrad in Eu- und Heterochromatin unterteilt. Das Euchromatin liegt aufgelockert vor und kann so leichter abgelesen werden. Heterochromatin bezeichnet verdichtetes Chromatin, welches enger um die Histonproteine gewickelt ist (Eberhart et al. 2013).

Als Histone bezeichnet man Proteine im Zellkern (Eberhart et al. 2013). Dabei liegen in jedem Kern vier Histone in doppelter Ausführung vor. Dieses Oktamer dient als Körper, um den die DNA gewickelt ist. Die Schwänze der Histone bestehen aus basischen Aminosäuren, die durch ihre positive Ladung die negativ geladene DNA anziehen (Wang et al. 2007a; Wang et al. 2007b). Das N-terminale Histonende kann durch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Azetylierung oder Methylierung beeinflusst werden und so den Kondensationszustand der DNA verändern. Dies kann mit einer Aktivierung oder Repression der Transkription einhergehen (Strahl und Allis 2000; Bártová et al. 2008). Diese Veränderungen an den Histonen werden durch Enzyme beeinflusst, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: lesende (*reader*), schreibende (*writer*), sowie revertierende Funktionen (*erasers*). Dabei geht man davon aus, dass spezifische Transkriptionsfaktoren (TF) diese Proteine rekrutieren können (Wang et al. 2007a). Eine Öffnung des Chromatins ermöglicht das Ablesen der zugänglichen Genabschnitte und damit deren Transkription. Adenosintriphosphat (ATP) abhängige Chromatinremodeller können die Transkription stark verändern (Wang et al. 2007b). Sie binden an bestimmte DNA-Abschnitten, können die DNA-Histon-Bin-

derung verändern, die DNA verlagern und durch diese Veränderung TF-Bindungsstellen zum Able-sen zugänglich machen oder schließen. Damit beeinflussen sie transkriptionell die Expression von Genen (Watanabe et al. 2014). Diese reversiblen Veränderungen der Genexpression könnten ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Tumortherapiestrategien werden (Hessmann et al. 2017).

1.6 *ARID1A* als Teil des SWI/SNF-Komplexes

Zu den Chromatinremodelling-Komplexen gehört der *SWItch/Sucrose Non-Fermentable* (SWI/SNF) Komplex. Er ist einer der wichtigsten Multiproteinkomplexe mit Chromatin-Remodelling-Funk-tion (Kim et al. 2016). Der Komplex besteht aus dem BRG1 assoziiertem Faktor(*BRG1-associated factor*, BAF)-Komplex, zu dem man unter anderem *ARID1A* zählt, sowie dem Polybrom-assozi-iertem-BAF(*Polybromo-associated BRG1-associated factor*, PBAF)-Komplex. Bei BRG1 handelt es sich um eine ATPase, die für die Funktion des Komplexes entscheidend ist (Reisman et al. 2003; Watanabe et al. 2014; Bossen et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder des SWI/SNF-Komplexes in vielen verschiedenen Tumoren mutiert sind. Das schließt Tumore im gastrointesti-nalen Bereich, aber auch im Mamma- oder Bronchialkarzinom ein (Wu et al. 2014).

Abbildung 2: Der SWI/SNF-Komplex angelehnt an (Kalimuthu und Chetty 2016) mit freundlicher Genehmigung von der BMJ PUBLISHING GROUP

Die DNA-bindende Untereinheit dieses Komplexes nennt sich *ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A*). *ARID1A* kodiert dabei für das Protein BAF250a und hat ATPase-Funktion (Guan et al. 2011). Man geht davon aus, dass es sich bei *ARID1A* um eine aus sechs α -Helices bestehende DNA-Bindungsstellen handelt. Es werden dem Gen wichtige Funktionen in der Kontrolle der Zellproliferation und Differenzierung von Epithelzellen zugeschrieben (Guan et al. 2011; Livshits et al. 2018; Wang L et al. 2019). Außerdem beeinflusst *ARID1A* die Bindung des SWI/SNF-Komplexes an Promotoren (Watanabe et al. 2014) - genregulatorische Bereiche, die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthalten, welche zum Transkriptionsstart führen (Tolstorukov et al. 2013).

Ebenfalls konnte eine positive Beeinflussung von Enhancern -transkriptionsverstärkenden DNA-Abschnitten- durch ARID1A nachgewiesen werden (Mathur et al. 2017; Sen et al. 2019). *ARID1A* wird als ein Tumorsuppressorgen klassifiziert. Der Verlust von ARID1A wurde bereits in verschiedensten Tumorentitäten wie im Magen-, Ösophagus-, Cholangiozellulärem-, Ovarial- und Hepatozelluläremkarzinom beobachtet (Wu et al. 2014; Fang et al. 2015; Kim et al. 2016; Mathur et al. 2017). Im PDAC findet sich bei 8 % aller Tumoren eine Mutation von *ARID1A*. Der SWI/SNF Komplex, insbesondere die Untereinheit ARID1A, zählen damit zu den am häufigsten mutierten Tumorsuppressoren im PDAC (Wang et al. 2012).

Abbildung 3: *ARID1A*-Mutationshäufigkeit nach (Wu et al. 2014) mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis

Auch im Pankreas zeigen Untersuchungen, dass eine ARID1A-Defizienz im Kontext einer *KRAS*-Mutation mit Zelldifferenzierung bis zur Formation von Tumorstufen einhergeht und damit zur Tumorentstehung beiträgt (Livshits et al. 2018). Man geht davon aus, dass eine Mutation von *ARID1A* zu einem Funktionsverlust des Remodelling-Komplexes und damit zu einem Stabilitätsverlust des Genoms führt. Durch eine Fehlfunktion der Remodelling-Funktion kommt es zu einer veränderten Öffnung verschiedener Chromatinabschnitte (Livshits et al. 2018). Livshits und Kollegen zeigten 2018, dass Bereiche des Genoms, die für TF der Zelldifferenzierung kodieren, bei Verlust von ARID1A nicht mehr transkribiert werden. Dies hatte einen erheblichen Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Bossen et al. 2015; Livshits et al. 2018). Auch im Kolonkarzinom führte ein Verlust von *ARID1A* zu einer verringerten Enhancerbindung und dem damit einhergehenden verminderten Ablesen von TF (Mathur et al. 2017; Sen et al. 2019). Außerdem wurde eine verstärkte Anreicherung von TF in verschiedenen Genabschnitten detektiert, die zu einer gesteigerten

Expression verschiedener Zytokine wie Interleukin 6 (IL6) und IL8 führen (Fang et al. 2015; Kim et al. 2016; Livshits et al. 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *ARID1A* zu einer gesteigerten Promoteraktivierung durch eine verstärkte Azetylierung des Lysins 27 an Histone 3 (H3K27) führt (Wang et al. 2018). Dieser Azetylierung wird ein aktivierender Einfluss auf die Transkription zugeschrieben (Strahl und Allis 2000; Wang et al. 2018).

Die hohe Mutationshäufigkeit von *ARID1A* in verschiedensten Tumorarten zeigt, wie wichtig es ist, seine Funktion besser zu verstehen. Sowohl der Einfluss auf die Zelldedifferenzierung wie auf die Zytokinproduktion kann einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Progression eines PDACs haben. Die genauen Wirkmechanismen von ARID1A zu verstehen, ist somit auch für zukünftige Therapieschemata relevant.

1.7 Karzinogenese und Inflammation

Es ist bekannt, dass die Entstehung und Progression des PDACs von Inflammation begleitet wird. Bei einer Entzündung handelt es sich um die physiologische Antwort des Körpers auf einen Gewebeschaden, eine Noxe oder ein bestimmtes Antigen (Coussens und Werb 2002). Durch verschiedene Abläufe kommt es zur Rekrutierung von körpereigenen Abwehrzellen, die mithilfe von Botenstoffen zum Ort der Entzündung gelangen. Ein Beispiel hierfür sind die Interleukine wie IL6 und der Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Cheng et al. 2003; Lin und Karin 2007). Beispiele aus verschiedenen Bereichen der Medizin belegen einen Zusammenhang der Ausschüttung inflammatorischer Substanzen und Karzinogenese. Hepatitis gilt als ein Risikofaktor für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC), ebenso wie die Refluxösophagitis für das Ösophaguskarzinom. Auch gastrointestinale Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa steigern das Risiko der Krebsentstehung (Lin und Karin 2007). Auch eine chronische Pankreatitis stellt einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms da. So steigt die Anzahl an Vorläuferläsionen mit der Dauer der Entzündung (Guerra et al. 2007; Hruban et al. 2008). Dabei wird angenommen, dass die Tumorentstehung durch das inflammatorische Umfeld über Zytokine getriggert wird. Durch die Entzündung kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Dies kann antiapoptotische und/oder proliferative Einflüsse haben (Balkwill und Mantovani 2001). Des Weiteren kann es durch die Entzündung zur Bildung von DNA-schädigenden Radikalen kommen, da vermehrt Zellen an den Ort der Entzündung gelangen, die Sauerstoff verbrauchen (Balkwill und Mantovani 2001; Lin und Karin 2007). Die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer Aktivierung verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden wie dem *Januskinase-Signal Transducers and Activators of Transcription* (JAK-STAT) - Weg (Au-Yeung et al. 2013) mit der Produktion inflammatorischer Botenstoffe oder dem *Nuclear factor*

'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nukleärer Faktor Kappa Lichtkettenenhancer aktivierter B-Zellen, NF- κ B)-Signalweg mit selbiger Funktion, sowie der Produktion antiapoptotischer Botenstoffe (Libermann und Baltimore 1990).

Der Einfluss von ARID1A auf die Inflammation wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen. Beispielsweise konnten Fang und Kollegen 2015 in der Leber zeigen, dass eine ARID1A Defizienz mit einer erhöhten Expression von IL6 und TNF α einhergeht (Fang u. a. 2015). Diese proinflammatorischen Faktoren aktivieren zahlreiche entzündliche Signalwege, was wiederum Inflammation und Apoptose beeinflusst. Im Falle der Leber bewirkt dies die Progression von Hepatitis (Fang u. a. 2015), einem Risikofaktor für das HCC. Neben dem HCC konnte in 50 % aller Ovarialkarzinome eine *ARID1A* Mutation nachgewiesen werden (Bitler, Aird, und Zhang 2015). Auch hier fanden sich Hinweise darauf, dass *ARID1A* als ein Tumorsuppressorgen fungiert und es nach seinem Verlust zu einem Anstieg der Zytokinexpression kommt (Kim, Lu, und Zhang 2016). Gleiches gilt für verschiedene andere Tumorentitäten wie dem Kolon- oder Magenkarzinom. Verschiedene Studien zeigten, dass auch im PDAC eine direkte Korrelation zwischen Pankreatitis, der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und der Karzinomentstehung vorliegt (Lowenfels et al. 1997; Coussens und Werb 2002; Luo et al. 2004; Lin und Karin 2007). Durch das Sezernieren von Zytokinen wie IL6 und der damit einhergehenden Aktivierung verschiedener Signalwege, kommt es zur Inflammation und bei längerer Dauer zur Zellschädigung (Coussens und Werb 2002; Lin und Karin 2007; Luo u. a. 2004; Lowenfels u. a. 1997; Öhlund u. a. 2017).

Der genaue Mechanismus, über den es durch den Verlust von ARID1A zur Entzündung kommt, ist Gegenstand der Forschung. Diskutiert wird unter anderem die veränderte Bindung an das Genom. Weiterhin könnte ein Funktionsverlust des SWI/SNF-Komplexes mit Translokierung der DNA und damit einhergehender veränderter Expression von TF, die inflammatorische Signalwege regulieren (Kelso et al. 2017; Mathur et al. 2017; Wang et al. 2018).

1.8 Der NF- κ B-Signalweg

Abbildung 4: Schema zum NF- κ B-Signalweg

Ein wichtiger Signalweg, der an der Entstehung von Inflammation beteiligt ist, ist der NF- κ B-Signalweg. Dieser wurde bereits 1986 von Sen und Baltimore in B- und Plasmazellen entdeckt (Sen und Baltimore 1986; Arlt et al. 2012).

Der NF- κ B-Signalweg besteht aus fünf Untereinheiten, die im Zytoplasma liegen. Sie gehören der Rel-Familie an (Sen und Baltimore 1986). Die inhibitorische Einheit I κ B α ist an den Komplex aus p50 und p65/ RelA gekoppelt und hält diese Faktoren im Zytoplasma fest. Durch die Aktivierung des Signalwegs beispielsweise durch Rezeptorbindung von TNF α , Fas-Ligand oder IL1 kommt es zur Phosphorylierung der I κ B Kinase (IKK) α/β (Abbildung 4, Nr. 1, 2). Diese Kinasen phosphorylieren die inhibitorische I κ B-Einheit und triggern somit deren Ubiquitinierung (Abbildung 4, Nr. 3). Damit kommt es zu deren Abbau im 26 S Proteasom (Abbildung 4, Nr. 4). Durch den Wegfall der Inhibition werden p65 und p50 in den Nukleus freigesetzt (Abbildung 4, Nr. 5) und binden als TF an die DNA (Abbildung 4, Nr. 6). Es kommt zum Ablesen verschiedener Faktoren, die antiapoptotisch und proinflammatorisch wirken (Karin und Ben-Neriah 2000; Iliopoulos et al. 2009; Tilborghs et al. 2017). Dabei dauert diese Aktivierung des Signalwegs nur wenige Minuten (Baldwin 2001). Eine posttranslationale Phosphorylierung von p65 wurde mehrfach beschrieben und trägt zu einem modifizierten Bindungsverhalten und Protein-Protein-Interaktionen bei (King et al. 2011; Milanovic et al. 2014).

Es ist bekannt, dass eine Entzündung den NF- κ B-Signalweg durch freiwerdende Zytokine aktivieren kann. Beispiele hierfür sind die chronische Pankreatitis (Arlt et al. 2012), Asthma bronchiale und rheumatoide Arthritis (Coussens und Werb 2002). Auch IL6 als inflammatorisches Zytokin

kann den NF- κ B-Signalweg aktivieren. Man findet in verschiedenen Tumoren wie Mamma- oder Prostatakarzinom ein erhöhtes Vorkommen von IL6 in den Epithelzellen. Weiterhin geht man davon aus, dass es zu Kreuzreaktionen zwischen dem NF- κ B-Signalweg und anderen inflammatorischen Signalkaskaden kommen kann (Tilborghs et al. 2017). 70 % aller Pankreaskarzinome zeigen eine stärkere Aktivierung des Signalwegs (Ling et al. 2012). Ebenso findet man in Vorläuferläsionen wie den PanINs ein erhöhtes Vorkommen von aktiviertem p65. Außerdem finden sich höhere Level von IL1, welches den NF- κ B-Weg aktiviert. Die erhöhte IL1-Konzentration korreliert dabei mit einer schlechteren Prognose des PDACs (Ling et al. 2012). Man geht davon aus, dass der Signalweg zu einem längeren Überleben von Tumorzellen führt und das Tumorumfeld durch die Rekrutierung von Makrophagen prokarzinogen verändern könnte (Meylan et al. 2009).

Neue Entdeckungen zeigen, dass ein Feedback-Mechanismus eine mögliche Erklärung sein kann. In frühen Stadien würde der NF- κ B-Signalweg die Tumorentstehung hemmen, bei fehlenden Tumorsuppressoren jedoch eine onkogene Funktion gewinnen (Tilborghs et al. 2017).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die hohe Frequenz inaktivierender Mutationen von Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes in verschiedenen Tumorentitäten unterstreicht die Bedeutung des Chromatinremodellingkomplexes in der Tumorsuppression. So führt der Verlust der SWI/SNF-Komplex-Untereinheit ARID1A im transgenen Mausmodell zu einer Beschleunigung der Karzinogenese des Pankreas und zu einer Progression des PDACs. Der Mechanismus, der für die tumorprogressionsfördernden Konsequenzen der ARID1A-Defizienz im PDAC verantwortlich ist, ist allerdings noch nicht hinreichend verstanden. Aus anderen Tumorentitäten gibt es jedoch Hinweise, dass eine Inaktivierung von ARID1A inflammatorische Prozesse aktiviert, die die Tumorentstehung und –progression fördern. Wir vermuten daher, dass der Verlust von ARID1A im Pankreas transkriptionelle, inflammatorische Programme aktiviert, die konsekutiv zu einer beschleunigten Karzinogenese und Tumorprogression im Pankreas beitragen. Basierend auf dieser Hypothese verfolgt diese Dissertation folgende Ziele:

- 1) Charakterisierung der Relevanz der ARID1A-Defizienz für inflammatorische Prozesse in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms
- 2) Identifikation und Charakterisierung der Bedeutung von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren und Signalwegen, die ARID1A-Status abhängige inflammatorische Prozesse regulieren

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Größe	Firma	Firmensitz
Abdeckfolie für 96-Well-Platten		Applied Biosystems	Carlsbad (Kanada)
Alkoholisches Flächendesinfektionsmittel		DesoMed	Freiburg
Cadenza-System		Ted Pella Inc.	Redding (Kalifornien, USA)
Casting Frame		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Combitips für die Multipipette	2,5 ml	Eppendorf	Hamburg
Combitips für die Multipipette	5 ml	Eppendorf	Hamburg
Combitips für die Multipipette	10 ml	Eppendorf	Hamburg
Deckgläschen	32 x 24 mm	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
Desco Wipes		DesoMed	Freiburg
Einweghandschuhe, Latex	S	Semperguard	Northamptonshire (UK)
Einweghandschuhe, Nitril	S	LLG Labware GmbH	Meckenheim
Eppendorfcylinder		Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
FACS Tubes	5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Falkons	15 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Falkons	50 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Western blot Glasscheiben groß und klein		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Homogenisierstab		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Immo-Mount-Kleber		Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
Kamm für Western Blot		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Kryoröhrchen	5 ml	Corning, Amsterdam (Niederlande)	Amsterdam (Niederlande)
Labortücher		Kimberly-Clark	Surrey (UK)
Leukosilk		Braun	Melsungen
Liquid blocker super paper		Dako	Jena
Mikroplatte Cell Star 96 Well		Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Mikrotomklinge		Feather	Japan
Intransparente 96-Wellplatten		Sarstedt	Nümbrecht
Multiwellplatten	6-Well	Sarstedt	Nümbrecht

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Größe	Firma	Firmensitz
	24-Well	Applied Biosystems	Carlsbad (Kanada)
	96-Well	Applied Biosystems	Carlsbad (Kanada)
Nitrocellulosemembran		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Objektträger Superfrost Plus		Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
Parafilm M		Pechiney Plastic Packaging	Chicago, (USA)
Petrischalen	6 cm	Sarstedt	Nümbrecht
	10 cm	Sarstedt	Nümbrecht
Pipetten (serologische)	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
	5 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
	10 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
	25 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
	50 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster (Österreich)
Pipettenspitzen mit Filter	1000 µl	StarLab	Hamburg
	200 µl	StarLab	Hamburg
	10 µl	StarLab	Hamburg
Pipettenspitzen	1000 µl	StarLab	Hamburg
	200 µl	StarLab	Hamburg
	10 µl	StarLab	Hamburg
Reagiergefäße	1 ml	Sarstedt	Nümbrecht
	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reinigungstücher - Kim-tech Science		Kimberly-Clark- Professional	
Roti-Mount-Kleber		Roth	Karlsruhe
Skalpell		Dahlhausen	Köln
Slide-Halter		Ted Pella Inc.	Redding (Kalifornien, USA)
Spritzen	1 ml	BD Plastipak	Madrid (Spanien)
	5 ml	BD Plastipak	Madrid (Spanien)
	10 ml	BD Plastipak	Madrid (Spanien)
Transferfilterpapier		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Trockeneis		Linde Gas	München
Western Blot Membran-roller		Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
Zellkulturflasche	T25	Sarstedt	Nümbrecht
Zellkulturflasche	T75	Sarstedt	Nümbrecht
Zellscharber 25 cm		Sarstedt	Nümbrecht

Tabelle 2: Geräte

Gerätebezeichnung	Firma	Firmensitz
Abzug "Airflow Kontrolle EN 14175"	Weidner Laboreinrichtungs GmbH	Hardeggen
Analysewaage "PCB M Memory"	Kern & Sohn GmbH	Balingen
Autoklav "Laboclav LGAK0061"	SHP Steriltechnik AG	Detzel Schloss, Haldensleben
Chemidoc	Biorad	Hercules Kalifornien
ChemoCam	Intas Science Imaging	Göttingen
CO ₂ Inkubator CB E6.1	BINDER	Tuttlingen
Cryo Cooler "Mr Frosty"	Nalgene	Rochester (New York, USA)
Drucker "Ecosys P3125dn"	Kyocera	Kyoto, Kyoto (Japan)
Durchflusszytometer „FACSCanto II“	BD Biosciences	San José (Kalifornien, USA)
Eingießmaschine "EG 1150H"	Leica	Wetzlar
Eismaschine "AF 80"	Scotsman	Vernon Hills, Illinois (USA)
Elektrophoresegerät (Power Pac HC)	Biorad	Hercules Kalifornien
Facs Sorting BD Canto II	BD Bioscience	San Jose
Gelelektrophorese "PowerPac Basic"	BioRad	Hercules, Kalifornien (USA)
Heizblock "Dri Block, DB 2A"	Techne	Staffordshire (UK)
Heizplatte "OTS 40"	Meditate GmbH	Burgdorf
Lumineszenz Messgerät "LoMo"	Autobio	Zhengzhou City, China
Magnetrühre	Ika-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Mikrotom "RM2265"	Leica	Wetzlar
Mikrowelle "NN-E209W"	Panasonic	Kadoma, Osaka (Japan)
Multipette plus	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Nano-Photometer	Intas Science Imaging	Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim
PCR-Cycler "Step one plus"	Applied BioSystems, Thermo Fisher	Foster City, Kalifornien (USA)
pH-Meter "Five Easy-Plus"	Mettler Toledo	Columbus, Ohio (USA)
Photometer "PhoMo"	Autobio	Zhengzhou City, China
Pipettboy	Integra Biosciences	Biebertal
Pipetten "Reference" 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 50-200 µl, 10-100 µl, 2-20 µl, 100-1000 µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf
Präzisionswaage "MC1 Analytic AC 210 P"	Sartorius	Göttingen
Schüttelinkubator MaxQ 4450	Thermo Scientific	Massachusetts
Sterilwerkbank "Heracell 240i CO ₂ Inkubator"	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Thermocycler T100	BioRad	Hercules Kalifornien
Tischabsauger "Aspirator with trap flask, FTA-1"	Grant-bio, Fisher Science	Schwerte
Tischzentrifuge "Sprout"	Heathrow Scientific	Vernon Hills, Illinois (USA)
Trockenschrank "UN55 pa"	Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop "CTR advanced"	Leica	Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop „IX81“	Olympus	Hamburg
Lichtmikroskop CKX 53 mit Kamera	Olympus	Shinjuku, Tokio (Japan)
Lichtmikroskop "ID03"	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Göttingen
Lichtmikroskop "BX43"	Olympus	Shinjuku, Tokio (Japan)

Zentrifugen

Große Kühl-Zentrifuge "Heraeus Multifuge X1R Centrifuge"	Thermo Fischer Scientific	Osterode am Harz
Kleine Zentrifuge "Perfect Spin 24Plus"	Peqlab, Fisher Scientific	Scherte
Kleine Kühl-Zentrifuge "Perfect Spin 24R Refrigerated Microcentrifuge"	Peqlab, Fisher Scientific	Scherte

Gefriergeräte

Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Bulle (Schweiz)
Gefrierschrank -80°C	Arctiko	Esbjerg (Dänemark)
Kühlschrank 4°C	Liebherr	Bulle (Schweiz)

Tabelle 3: Software

Bezeichnung	Benutzung	Firma	Firmensitz
Adobe Photoshop CS6	Bildbearbeitung	Adobe Systems	San José, Californien (USA)
BD FACSDiva	FACS-Messung	BD Bioscience	Franklin Lakes (New Jersey, USA)
CellSence	Lichtmikroskopie	Olympus	Shinjuku, Tokio (Japan)
ChemoStar Imager 3.2	Chemielumineszenz	Intas Science Imaging	Göttingen
FlowJo	FACS-Auswertung	Milteny Biotec	Gladbach
GraphPad Prism® 5.03 für Windows	Datenverarbeitung	GraphPad Software	San Diego, Californien (USA)
Fiji 1.0 (ImageJ)	Auswertung/Quantifizierung der Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz	Open Source nach Wayne Rasband	
LAS X	Fluoreszenzmikroskopie	Leica	Wetzlar
Microsoft Office 2016 für Windows	Textverarbeitung, Datenverarbeitung, Bildverarbeitung	Microsoft	Redmond (USA)
NanoPhotometer PVC-Viewer	RNA-Konzentrations-Messung	Intas Science Imaging	Göttingen
PhoMo AutoSoft	Protein-Konz.Messung, Reporter Assay	Autobio	Zhengzhou City, China
Step One Plus Software v2.3	PCR	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts (USA)

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Acrylamid-Lsg., 30 %	Applichem	Darmstadt
Accutase	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Adenosintriphosphat #pv3227	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Agarose AG02	Nippon Genetics Europe GmBh	Düren
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck	Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Ampicillin sodium salt A9518-256	Sigma-Aldrich	St. Louis
Annexin V Binding Buffer B23220	Biolegend	San Diego, (Kalifornien, USA)
Borsäure 99,8 % - 69431	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Buffer 0 #B05	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck	Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Citronensäure-Monohydrat	Carl-Roth	Karlsruhe
Complete 25x	Roche	Grenzach-Wyhlen
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; Dihydrat)	Carl-Roth	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Eosin	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Ethanol, 99 %, unvergällt	TH. Geyer	Renningen
Ethanol, 99 %, vergällt	Otto Fischar GmbH & Co.KG	Saarbrücken
Fast Digest Bbs1 (Bpi1) #FD1014	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Glycerin	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Hämotoxylin	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	LifeTechnologies	Carlsbad (Kalifornien, USA)
Impact DAB	Vector	Burlingame (Kalifornien, USA)
Isopropanol	Carl-Roth	Karlsruhe

Kaliumchlorid (K ₂ Cl)	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Applchem	Darmstadt
Lipofectamin 2000	Life technologies	Carlsbad (Kalifornien, USA)
Midori Green advance MG03	Nippon Genetics Europe GmBh	Düren
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Natronlauge (NaOH)	Merck	Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Paraformaldehyd	Merck	Darmstadt
PenStrep	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Propidium iodide solution MKBR1007V	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (nach Bradford)	Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
RNAse-freies Wasser	Braun	Melsungen
Roticlear	Carl-Roth	Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Applchem	Darmstadt
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Carl-Roth	Karlsruhe
SYBR Green	Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)
T4 Ligase #EL0014	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts
Tango Buffer #BY5	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Hinweis	Lagerung
Agarosegel (2 %ig)	1 g Agarose + 50 ml TBE 1x + 2 µl MIDORI-Green		4°C
Bradford Assay	50 ml Bio Rad Protein Assay + 200 ml Aqua dest.		lichtgeschützt bei 4°C
Citrat	2,1 g Citronensäure-Monohydrat ad 1 l Aqua.dest.	Citratpulver mit 900 ml Wasser auffüllen, pH-Wert mithilfe von NaOH auf 7,4 adjustiert, auf 1 l aufgefüllt	4°C
EDTA 0,5 M	46,53 g EDTA + 250 ml Aqua.dest.; pH 8		Raumtemperatur (RT)

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Hinweis	Lagerung
Laemmli 5x	225 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% Glycerol, 5% Natriumdodecylsulfat (SDS), 100mM Dithiotreitol (DTT) + 0,02% Bromphenolblau + 0,2% 2-Mercaptoethanol		RT
Laufpuffer 10x	20 g Natriumdodecylsulfat (SDS) + 288 g Glycin + 60,6 g Tris-Base ad 2 l Aqua.dest.		RT
Laufpuffer 1x	100 ml Laufpuffer 10 x + 900 ml Aqua.dest.	10x auf 1:10 seiner Ausgangskonzentration mit Aqua dest. verdünnt	RT
Loading Dye	3 ml Glycerol + 2 µl 0,1mM EDTA + 25 µl Bromphenolblau + 7 ml Aqua dest.		RT
Lysepuffer	50 mM HEPES + 150 mM Natriumchlorid (NaCl) +1 mM EGTA + 10 % Glycerin + 1 % Triton X100 + 100 mM Natriumfluorid (NaF) + 10 mM Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇); pH 7,5 - 7,9	pH-Wert Einstellung von 7,5-7,9 Vor Benutzung wird der Puffer mit weiteren Chemikalien versetzt (siehe WCL-Lysepuffer)	-20°C
Milchpulver, 5%	10 g Milchpulver, 200 ml TBST		4°C für maximal 48 h
PB	2,4 g Natriumphosphat (monobasisch, NaH ₂ OP ₄) + 11,31g Natriumphosphat (dibasisch, Na ₂ HPO ₄) ad 1L Aqua.dest		4°C
PBS	40 g Natriumchlorid (NaCl)+ 1g Kaliumchlorid (KCl)+ 1 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) + 3,8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O) ad 5 l Aqua. dest.		4°C
PBST	999 ml PBS + 1 ml Tween/ 1 ml Triton		4°C
Sammelgelpuffer "ready to use"	25ml Sammelgelpuffer "Stock", 59 ml Aqua dest., 16 ml Acrylamit (30 %/0,8 %)		4°C
Sammelgelpuffer "Stock"	0,5 M Tris Base (12,11 g Tris-Base in 200 ml Aqua. dest.) + 0,4 % SDS	Der pH-Wert muss anschließend 6,8 betragen	°C
Solubilization Lösung	10 % Triton 100-X mit 0,1 M HCL in Isopropanol		RT
Strippingbuffer	2 ml NaOH + 18 ml Aqua dest.	keine Wiedernutzung möglich	

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Hinweis	Lagerung
TBE 5x	54 g Tris-Base + 27,5 g Borsäure + 20 ml EDTA 0,5 M ad 1 l Aqua. dest.		4°C
TBS	121,4 g Tris-Base + 400,31 g Natriumchlorid ad 5 l Aqua. dest.; pH 7,4 - 7,6		RT
TBST	999 ml TBS + 1 ml Tween		RT
TE-Puffer 10x	12,1 g Tris-Base + 3,7 g EDTA ad 1 l Aqua dest.	Der pH-Wert wird auf 9 adjustiert.	4°C
TE-Puffer 1x	100 ml TE 10x + 900 ml Aqua. dest.		4°C
Trenngelpuffer "ready to use" 10 %	25 ml Trenngelpuffer "Stock" + 36,7 ml Aqua. dest. + 33,3 ml Acrylamid (30 % / 0,8 %) + 5 ml Glycerin		4°C
Trenngelpuffer "ready to use" 15 %	25 ml Trenngelpuffer "Stock" + 20 ml Aqua. dest. + 50 ml Acrylamid (30 % / 0,8 %) + 5 ml Glycerin		4°C
Trenngelpuffer "Stock"	1,5 M Tris Base (36,31 g Tris-Base in 200 ml Aqua. dest.) + 0,4 % SDS	pH-Wert auf 8,8 adjustiert.	4°C
Turbo-Blot-Puffer	200 ml 5x Turbo Blot Puffer (BioRad), 200 ml Ethanol, 600 ml Aqua dest.		RT
WCL-Lysepuffer	500 µl Lysepuffer + 20 µl Complete 25x + 5 µl Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) + 5 µl Natriumfluorid (NaF) + 5 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		4°C

Tabelle 6: Proteine

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
ABC-Rat	Biolegend	San Diego (Kalifornien, USA)
BSA	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
FCS	BioWest	Düsseldorf
MEM Amino Acids	LifeTechnologies	Carlsbad (Kalifornien, USA)
MEM NEAA	LifeTechnologies	Carlsbad (Kalifornien, USA)
NGS	Abcam	Cambridge (UK)
Page Ruler	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)

Tabelle 7: Proteinasen

Bezeichnung	Firma	Firmensitz
Trypsin	Thermo Fisher Scientific	Waltham (Massachusetts, USA)

Tabelle 8: Inhibitoren

Inhibitoren	Firma	Bestellnummer	Firmensitz	Lösungsmittel
Staurosporin	CellSignaling	9953	Cambridge (UK)	DMSO

Tabelle 9: Material Knock-Down

Bezeichnung	Firma	Firmensitz	Sequenz
iScript cDNA Synthesis Kit (5x iScript Reaction Mix iScript Reverse Transcriptase)	Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)	
siLentFect Lipid	Bio-Rad	Hercules (Kalifornien, USA)	
Human Arid1a On Target plus Smart pool	Dharmacon	Lafayette (Colorado, USA)	
Human RelA1 On Target #2	Dharmacon	Lafayette (Colorado, USA)	GGAUUGAG-GAGAAACGUAA

Tabelle 10: Material Reporter-Assay

Reporter-Assay	Firma	Firmensitz	Bestellnummer
Passive Lysis Buffer 5x 30 ml	Promega	Madison WI USA	0000153436
Stop & Glo ® 50x	Promega	Madison WI USA	0000147354
Cell Titer - Glo Luminescent 10 ml	Promega	Madison WI USA	305928
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega	Madison WI USA	0000157231

Tabelle 11: Vektoren

Bezeichnung	Nummer	Firma	Firmensitz	Funktion
Arid1a	86	Zur Verfügung gestellt von Steven Johnsen, UMG		Überexpressionsplamid
pNF- κ B-Luc	25	Stratagene	San Diego, Californien (USA)	Bindungsstellen für NF- κ B
Px-458 Plasmid		Zur Verfügung gestellt von Steven Johnsen, UMG	CRISPR/Cas9 Klonierung	

Tabelle 12: Material CRISPR/Cas9-Kits

Kit	Firma	Firmensitz
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen	Venlo (Niederlande)
MynoxGold Mycoplasma Elimination Kit	Minerva Biolabs	Berlin
Fast Gene Xpress Plasmid Kit #FG-90302 (high-copy number Plasmids)	Nippon Genetics Europe GmbH	Düren
KAPA2G Fast hot start Genotyping Mix with Dye	Nippon Genetics Europe GmbH	Düren
NucleoSping Plasmid DNA, RNA and Protein purification Kit	Macherey-Nagel	Düren

Tabelle 13: Primer und Guide-RNA CRISPR/Cas9

	Firmensitz	Firma	Sequenz for	Sequenz rev
Guide-RNA				
Arid1a E8_1, murin	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)	(Phos) 5'-P-GACCGGT-CTGGGACTT-GCTAACCA-3'	(Phos) 5'-P-AAACTGGTTAG-CAAGTCCCAGAACC-3'
Arid1a E8_2, murin	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)	(Phos) 5'-P-GACCGG-TAGGCTACT-TAG-GAGTCTG-3'	(Phos) 5'-P-AAACCA-GACTCCTAAG-TAGCCTACC-3'
Genotypisierungsprimer				
P1	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)	CTTGCACCTT-TCACTGTGCC	CCTGTCCATAGG-GAGGTCCA
P2	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)	CACCCAC-CCCAATCTAC-CAC	CTGGCTGCCATCCCTG-TAAA
Validierungsprimer				
mArid1a_vali#2	Sigma-Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)	CACCCAC-CCCAATCTAC-CAC	CTGGCTGCCATCCCTG-TAAA

Tabelle 14: Klonierungsbakterien

Bezeichnung	Firma	Firmensitz	Funktion
E. coli Bakterien (NEB 10-beta competent E. coli, Art.Nr. C3019I)	New England Biolabs	Frankfurt am Main	CRISPR/Cas9-Methode

Tabelle 15: Antikörper

Name	Artikel-nummer	Spezies	Verdünnung	Firma	Firmensitz
Primärantikörper WB					
Arid1a	12354	rabbit	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
IKK β	2678	rabbit	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
I κ B α	4814	mouse	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
NF- κ B p65	4764	rabbit	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
p-IKK α / β	2697	rabbit	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
p-I κ B α	2859	rabbit	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
p-NF- κ B p65	3033	rabbit	1:500	CellSignaling	Cambridge (UK)
p-STAT3 (Tyr.705)	9145	rabbit	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
STAT3	9139	Mouse	1:1000	CellSignaling	Cambridge (UK)
β -actin HRP	A3854		1:40000	Sigma	St. Luis (Missouri, USA)
Primärantikörper – Immunhistochemie					
CD45	550539	rat	1:50	Bioscience	Franklin Lakes (USA)
Sekundärantikörper WB					
Mouse (HRP-linked)			1:5000	CellSignaling	Cambridge (UK)
Rabbit (HRP-linked)			1:5000	CellSignaling	Cambridge (UK)
Sekundärantikörper - Immunhistochemie					
Rat			1:200	Biozol	Eching
Immunfluoreszenz-Primärantikörper					
NF- κ B p65 (F-6)	1:500	mouse	sc 8008	Santa Cruz	Santa Cruz (USA)
IL6	1:50	rabbit		Abcam	Cambridge (UK)
TNF α	1:500	rabbit	Ab1793	Abcam	Cambridge (UK)
Cleaved Caspase 3 (D175)	1:100	rabbit	9661S	CellSignaling	Cambridge (UK)

Immunfluoreszenz- Sekundärantikörper

Spezies	Wellenlänge	Farbe	Firma	Firmensitz
Mouse	568nm	rot	Abcam	Cambridge (UK)
Rabbit	488nm	grün	Abcam	Cambridge (UK)

Tabelle 16: Primer

Bezeichnung	Spezies	For-Sequenz	Rev-Sequenz	Firma	Firmensitz
XS13	human/ mouse	GTC GGA GGA GTC GGA CGA G	GCC TTT ATT TCC TTG TTT TGC AAA	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
NF- κ BiA	human	GCC TTC CTC AAC TTC CAG AAC	GGG TAT TTC CTC GAA AGT CTC G	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
GAPDH	human	ACA TCG CTC AGA CAC CAT G	TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
CCL20	human	ACC ATG TGC TGT ACC AAG AG	CGG TCT GTG TAT CCA AGA CAG	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
IL6	human	GGT ACA TCC TCG ACG GCA TCT	GTG CCT CTT TGC TGC TTT CAC	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
STAT3	human	TGC TTC CCC TGA TTG TGA CTG	CTG ACA GAT GTT GGA GAT CAC C	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
NF- κ BiA	mouse	CCA GTG TAG CAG TCT TGA CG	AGC ACC CAA AGT CAC CAA G	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
IL6	mouse	CAA AGC CAG AGT CCT TCA GAG	TCT TTC CCA CAC TGC ATG AG	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
CCL20	mouse	TTT GGC ATC GCT ACT GCT G	AGG AGG TTC ACA GCC CTT TT	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)
GAPDH	mouse	CCT CGT CCC GTA GAC AAA ATG	TGT AGT TGA GGT CAA TGA AGG G	Sigma- Aldrich	St. Luis (Missouri, USA)

Tabelle 17: Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Spezies	Medium
Pdx1-Cre, lox-stop-lox-Kras ^{G12D} /+, lox-stop-lox-tp53R172H/+ (KPC black 6)	Tumorzellen aus dem Pankreas	Isoliert von AG Neeße, UMG, Göttingen	murin	DMEM + 1 % NEAA + 10 % FCS
L3.6	Tumorzellen aus dem Pankreas	Isoliert von Daniel Billadeau, Mayo Clinic, Rochester	human	MEM + 10 % FCS

Tabelle 18: Zellmedium

	Marke	Firmensitz
DMEM-Medium	Thermofisher	Waltham (Massachusetts, USA)
MEM-Medium	Thermofisher	Waltham (Massachusetts, USA)

Tabelle 19: Mauslinien

	<i>Arid1a</i>	<i>Kras^{G12D}</i>	<i>Cre</i>
AKC	flox/flox	T/+	positiv
KC	+/+	T/+	positiv

T=transgen, +=Wildtyp, Die genutzten Gewebe wurden von Zhe Zhang aus meiner Arbeitsgruppe entnommen.

2.1.1 Das LoxP-System

Das LoxP-System ist ein biochemisches Tool, mit dem wir in unseren Mausmodellen stabile Mutationen verschiedener Gene erzeugen konnten. Hierbei war es je nach Anordnung des Systems möglich, Deletion, Inversionen oder Translokationen zu erzeugen. Wir nutzten diese Methode für unser Mausmodell, um die Auswirkungen von verschiedenen Mutationen testen zu können. Bei loxP (*locus of $\times$ over P1 Bacteriophage*) handelte es sich um die Markierung zu beiden Seiten eines Stoppkodons, welches sich vor dem auszuschneidenden Gens befand. Man sprach davon, dass die Stoppkassette „gelox“ war. Des Weiteren wurde die Rekombinase Cre benötigt (*creates recombination*).

„Cre“ wird am achten Tag der Embryonalentwicklung exprimiert und besitzt die Fähigkeit, DNA zu schneiden. An sich gibt es zwei verschiedene Wege, wie Cre in den Organismus gelangen kann: Methode eins bedient sich eines Virus, der die Rekombinase in die DNA einbringen kann. Bei Methode zwei nutzt man eine Cre-Rekombinase, der ein Promoter nachfolgt. Letztere Methode wurde bei uns benutzt. Um die Mutation speziell in das Pankreas einzufügen, wurde der p48 Promoter genutzt, welcher spezifisch für das Pankreas war. Somit wurde die Mutation konditional nur ins Pankreas eingebracht (Abremski und Hoess 1984).

Es wurden anschließend zwei verschiedene Mausstämme miteinander gekreuzt. Die einen, deren DNA durch zwei loxP um das Stoppkodon markiert war, die anderen, die eine aktive Cre-Rekombinase besaß. Nach der Kreuzung dieser Spezies setzte das Cre an dem LSL-Bereich an (lox stopp lox) und schnitt das Stoppkodon heraus. Das Gen wurde so aus dem Genpool entfernt.

In dem Kreuzungspartner wurde das auszuschneidende Gen durch eine loxP Mutation vor dem Stoppkodon markiert. Wurden die „Cre“ Maus und die „loxP-Maus“ miteinander gekreuzt, so

fürte dies dazu, dass die Rekombinase die beiden Stoppkodone ausschnitt. Damit wurde das Gen aus dem Genpool entfernt.

2.1.2 Die Mauslinien

Um zwei vergleichbare Mauspopulationen zu haben, wurde die Gruppe der AKC Mäuse und der KC Mäuse generiert. Dabei standen die ersten Buchstaben jeweils für das mutierte Gen, das „C“ am Ende für das oben beschriebene Cre. Die *Kras*^{G12D}Cre-p48 (KC) Mauskohorte enthielt eine Mutation des Onkogens *Kras*. Es erfolgte eine Punktmutation auf Kodon 12, bei der es zum Austausch der Base Guanin gegen Adenin kam. Das so mutierte *Kras*-Gen sollte aufgrund seiner karzinogenen Wirkung für die Tumorentstehung innerhalb der Mauskohorte sorgen.

Um einen Knock-Out des Tumorsuppressorgens *ARID1A* zu erzeugen, wurde dieses Gen geloxt und durch das Einbringen der p48 Rekombinase herausgeschnitten. Diese *Arid1a*^{fl/fl}; Cre-p48 (AC) Maus wurde anschließend mit einer KC Maus gekreuzt, sodass eine sogenannte *Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D}Cre-p48 (AKC) Maus entstand. Diese wurde im Folgenden mit der KC Maus verglichen, da sich beide in ihrer *KRAS*-Mutation gleichen, die AKC Maus aber zusätzlich noch eine Knock-Out des *ARID1A* Gens trug.

Abbildung 5: Kreuzung der Mauslinien

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Arbeit mit den Zellen geschah unter aseptischen Bedingungen. Hierfür wurden durchgehend Schutzhandschuhe getragen und innerhalb der Zellkultur unter einer Sterilarbeitsbank (Heracell 240i CO₂ Inkubator von Thermo Fischer) gearbeitet. Vor Gebrauch wurde diese mit den DesoMed Tüchern gründlich gesäubert und sämtliche Utensilien zur Keimzahlreduzierung abgewischt. Auch bei Arbeiten außerhalb der Zellkultur wurden Handschuhe getragen und sämtliche Flächen vor der Benutzung desinfiziert. Kontaminierte oder bereits benutzte Arbeitsmaterialien wurden in dem Autoklaven ("Laboclav LGAK0061" von SHP Steriltechnik) vernichtet. Dies geschah sowohl mit Feststoffen, wie auch mit Flüssigkeiten. Weiterhin war es mit Hilfe des Autoklaven möglich, wiederverwertbare Stoffe und Einmalartikel wie Reagiergefäße oder Pipettenspitzen zu sterilisieren.

2.2.2 Zellarbeit

Die Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen in einem speziellen Medium kultiviert. Dieses enthielt je nach Zellart verschiedene Zusätze. Für die L3.6-Zellen wurde MEM (Minimum Essential Medium, Thermofischer) genutzt. Für alle anderen Zellen wurde DMEM verwendet (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Thermofischer). Zur „Ernährung“ der Zellen wurde jeweils 10 % FCS (*fetal calf serum*, Fetales Kälberserum) hinzugegeben. Bei den murinen Zellen (hier KPC black 6) wurden zusätzlich nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA, Life Technologies) substituiert.

Das frische Medium hatte eine rote Färbung, an derer sich das Alter des Mediums abschätzen ließ. Bei einer Gelbfärbung sollte ein Mediumswechsel stattfinden. Ansonsten erfolgte dieser bei jedem Splittvorgang (siehe 2.2.3), spätestens alle vier Tage.

Die Zellen wurden im Wärmeschrank (CO₂ Inkubator CB E6.1, Firma BINDER) bei 37°C unter 10 % CO₂ kultiviert und ihr Wachstumsprozess unter dem Lichtmikroskop täglich beobachtet.

2.2.3 Passagieren adhärenter Zellen

Bei allen aufgeführten Zellen handelte es sich um adhärente Formen, die als Monolayer auf dem Boden der T-75-Zellkulturflasche hafteten. Um ein Überwachsen zu verhindern, musste die Zelldichte stetig kontrolliert werden. Je nach Schnelligkeit des Zellwachstums empfiehlt sich unterschiedlich hohes Splitten.

Als erstes wurde hierzu das Medium abgesaugt. Da die adhärenenten Zellen am Boden der T-75-Zellkulturflasche haften blieben, konnten diese mit fünf Milliliter PBS gewaschen werden, ohne sich

dabei zu lösen. Anschließend wurde der Waschpuffer entsorgt und zwei Milliliter der Proteinase Trypsin (Thermo Fisher Scientific) auf die Zellen gegeben. Diese Serinprotease löst Adhäsionsmoleküle der Zellen, indem sie Lysin- und Argininbindungen spaltet und so die Zellablösung katalysiert. Da Trypsin sein Reaktionsoptimum bei 37°C hat, wurden die Zellkulturflaschen für wenige Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Zum vollständigen Lösen der Zellen empfahl sich leichtes Klopfen gegen die Flaschenwand. Anschließend galt es, unter dem Mikroskop die abgekugelten, schwimmenden Zellen zu begutachten. Das Trypsin sollte aufgrund seiner Proteinasewirkung nicht zu lange auf den Zellen verbleiben. Daher musste die Reaktion nach erfolgter Ablösung möglichst schnell gestoppt werden. Dies geschieht durch die Zugabe von sechs Milliliter Medium in die Zellkulturflasche. Die Menge an abstoppendem Medium musste dabei die Menge des Trypsins um ein doppeltes übersteigen, um die Reaktion stoppen zu können.

Um Dubletten oder Konglomerate zu vereinzeln, wurde die Suspension einige Male mit einer Pipette resuspendiert. Anschließend gab man die Zellen je nach Splittzahl in eine neue T-75-Zellkulturflasche, die vorher mit neun Milliliter Medium gefüllt wurde. Die Zellen wurden wieder im Wärmeschrank inkubiert.

2.2.4 Zellzählung und Aussaat

Zum Aussähen der Zellen empfahl sich, diese vorher zu zählen, um die geeignete Zelldichte abschätzen zu können. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und die Reaktion mit dem Medium abgestoppt. Anschließend wurden drei Milliliter dieser Suspension in ein kleines 15 ml Falcon überführt. Aus diesem wurden 12 µl entnommen und unter eine vorher gesäuberte Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH & Co. KG) pipettiert. Eine Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Feldern, die wiederum in 16 kleinen Quadrate eingeteilt sind. Am Mikroskop wurde die Zellzahl pro Feld bestimmt. Die Einteilung in Quadrate half dabei, die Übersicht über die gezählten Zellen nicht zu verlieren. Dabei waren die Ränder der vier großen Felder jeweils doppelt dargestellt. Um eine mehrfache Zählung zu verhindern, wurden Zellen auf dem Rand mitgezählt, darüber hinaus jedoch nicht. Anschließend wurde der Mittelwert aus der Zellzahl der vier Felder errechnet und dieser mit dem Faktor 10^4 multipliziert. So erhielt man die ungefähre Zellanzahl.

Je nach geplantem Experiment wurden die Zellen in verschieden große Well-Platten (6-Well, 24-Well, 96-Well usw.) ausgesät. Vorherige Überlegungen sollten beinhalten, wie lange die Zellen wachsen und welche Konfluenz sie am Ende erreichen sollten. In Abhängigkeit von der Wellgröße wurden unterschiedliche Endvolumina (2 ml für eine 6-Well Platte, 1 ml für 24-Well, 400 µl für 96-Well) als sinnvoll erachtet. Somit ergab sich folgende Überlegung:

Tabelle 20: Volumenberechnung zur Zellaussaat

1. Gewünschte Aussaatmenge x Menge an Wells = benötigte Gesamtzellemenge
2. Gesamtzellmenge / Zellzahl x 10^4 = Menge an benötigter Zellsuspension
3. gewünschtes Volumen pro Well x Wellanzahl = Menge Gesamtmenge Medium + Zellen
4. Gesamtmenge Medium + Zellen = Volumen Medium
5. Zugabe des Volumens aus 2.) zu 4.)

Das Volumen aus 5.) wurde in jedes Well gegeben und die Zellen täglich beobachtet. Bei längeren Inkubationszeiten empfahl sich ein Mediumwechsel nach spätestens vier Tagen.

2.2.5 Zellernte

Zur Gewinnung der Zellen aus den Wellplatten war ein mehrschrittiger Lysevorgang nötig. Vor der Ernte mussten die Zellen unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop CKX 53 mit Kamera, Olympus) beobachtet und hinsichtlich ihrer Morphologie und Konfluenz beurteilt werden. Bei gewünschtem Ergebnis konnten die Zellen den Ernteprozess durchlaufen. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen, um eventuelle Kontaminationen durch tote Zellbestandteile zu verhindern.

Zur Vorbereitung der Ernte wurde der Arbeitsplatz desinfiziert und die benötigte Anzahl an sterilen Zellskrapern bereitgestellt. Sämtliche aufgeführte Arbeitsschritte fanden in einem Eisbad statt, um die Proteinstabilität nicht zu gefährden.

Als erstes wurde der WCL-Lysepuffer mit verschiedenen Detergenzien versehen. So wurden PMSF als Serinprotease, Na_3VO_4 und NaF zur Schonung phosphorylierter Proteine und Complete 25x hinzugegeben. Der Puffer verblieb ebenfalls auf Eis. Je nach Zellfülle wurde eine unterschiedliche Menge des Lysepuffer zugegeben (volle 6-Wells 60 µl, bis 60 % bewachsen 30 µl). Nach zwei Minuten Inkubation wurden die Zellen mit einem Schaber abgeschabt und in die vorher beschrifteten Reagiergefäße (1,5 ml) gefüllt.

Anschließend wurden die Lysate eine halbe Stunde auf Eis inkubiert, damit der Lysepuffer vollständig wirken und damit möglichst alle Proteine aus den Zellen herauslösen konnte. Zum Schluss wur-

den die Lysate für 20 min. bei 135.000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert (Perfect Spin 24R Refrigerated Microcentrifuge, Peqlab) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen. Die Lysate sollten bis zum nächsten Versuch bei -20°C verbleiben.

2.2.6 Erstellung von Zellstocks

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen konnten diese in einzelnen Zellstocks weggefroren werden. Hierzu galt es, die Zellen in ein Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) zu überführen.

Das Erstellen von Stocks empfahl sich bei einer Konfluenz von ca. 90 %, um genügend Zellen einfrieren zu können. Die Zellen sollten nicht überwachsen sein, um ihre physiologische Form wahren zu können. Je nach Menge konnten unterschiedlich viele Stocks erstellt werden (schätzungsweise bei einer hohen Konfluenz um die fünf Stocks).

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gesplittet und der zu passagierende Anteil in normalem Medium in ein Kryoröhrchen überführt. Der restliche Anteil wurde in der Zentrifuge bei 1200 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und das Einfriermedium hinzugegeben. Je Stock wurde ein Milliliter genutzt, um eine neue Zellsuspension zu erstellen. Die Kryoröhrchen wurden in den „Mr Frosty“ gestellt. Dieser mit Isopropanol gefüllte Behälter konnte bei -80°C aufbewahrt werden, bevor die Zellstocks in den Stickstofftanks überführt wurden und hier dauerhaft gelagert werden konnten.

2.2.7 Gen-Silencing mithilfe von Lipofektion

Bei einem Knock-Down handelt es sich um das temporäre Silencing eines Genes mithilfe von siRNA (*short interfering RNA*). Diese wurde durch Lipofectamin lipidvermittelt in die Zelle gebracht. Dabei kam es zur Fusion des Liposomens mit der Membran. Die ausgeschüttete siRNA konnte von Helikasen und Ribonukleasen zu RNA-Fragmenten prozessiert werden. Diese konnten an die zugehörige Boten-Ribonukleinsäure(*messenger ribonucleic acid*, mRNA)-Sequenz binden und zu deren Silencing führen.

Die Aussaat der Zellen erfolgt am Vortag, sodass eine Konfluenz von 60 % erreicht wurde. Am nächsten Tag wurden 200 µl serumfreies Medium mit 6 µl silentfect und 6 µl siRNA (z. B. ARID1A) zusammen in ein low-binding-Gefäß gegeben. Als Kontrolle werden 200 µl serumfreies Medium mit 6 µl silentfect beimpft. Das Gemisch wurde bei RT für zehn Minuten inkubiert.

Das verbrauchte Medium in den Wells wurde abgesaugt und ein Milliliter neues hinzugegeben. Der Lipofektionsmix wurde hinzugegeben und für 48 h auf den Zellen belassen. Da man davon ausging, dass der Fusionsprozess nach acht Stunden abgeschlossen war, empfahl es sich, nach 24 h das Medium zu wechseln, um tote Zellen zu entfernen. Weitere 24 h später konnten die Zellen für RNA-

Versuche mit Trizol oder für Proteinuntersuchungen mit WCL geerntet werden. Jedes Mal musste der Knock-Down auf RNA- oder Proteinebene validiert werden. Dann konnte mit den Zellen weitergearbeitet werden. Es war zu beachten, dass ein Knock-Down kein Effekt von ewiger Dauer ist, sondern nach einiger Zeit seine Wirkung verliert.

2.2.8 Überexpression von Genen in Zellen

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät, sodass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 - 60 % erreichten.

Am Folgetag wurden die Ansätze pipettiert. Es wurden immer 5 µl Lipofectamin pro µg DNA genutzt. Die Zugabe des Konstrukts erfolgte je nach Konzentration. Als Kontrolle wurde ein Well ausschließlich mit Lipofectamin beimpft. Um eine Aussage je nach Menge von *ARID1A* zu erhalten, war es sinnvoll, verschiedene Mengen an DNA zu transfizieren:

Tabelle 21: Berechnung zur Überexpression von Genen

serumfreien Medium	Lipofectamin	<i>ARID1A</i> -Konstrukt (c=0,95 µg/µl)	DNA-Menge
200 µl	20 µl	0 µl (Kontrolle)	0 µg
200 µl	5 µl	1,05 µl	1 µg
200 µl	10 µl	2,1 µl	2 µg
200 µl	20 µl	4,2 µl	4 µg

Das Gemisch wurde für 15 min. bei RT belassen. Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und 800 µl neues Medium hinzugegeben. Nach 24 h konnten die Zellen für RNA- oder Proteinisolierung geerntet oder in einen Reporter eingegeben werden.

2.2.9 Behandlungen von Zellen mit Staurosporin

Staurosporin zählt zu den Proteinkinasehemmern und dient dem Zellzyklusarrest. Damit wird es zur Induzierung von Apoptose genutzt.

Wie bei den vorher beschriebenen Versuchen wurden die Zellen 24 h vorher ausgesät, um am Folgetag behandelt zu werden. Dann wurden 0,6 µM Staurosporin auf die Wells gegeben und für eine verschieden lange Zeitdauer inkubiert. Als Kontrolle diente DMSO, in dem das Staurosporin gelöst war. Die Zellen wurden je nach Methode mit WCL oder Trizol geerntet.

2.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Schon 1996 konnten Zor und Selinger zeigen, dass eine Konzentrationsbestimmung von Proteinen mithilfe von Absorptionsmessungen einer bestimmten Reagenz möglich war (Zor und Selinger

1996). Das Bradford-Reagenz (Bio-Rad) enthielt Coomassie brilliant blue, dessen Absorptionsmaximum ohne gebundene Proteine bei 465 nm lag. Mit gebundenen Proteinen verschob sich dieser Wert zu 595 nm.

Je nach Stoffmenge der gebundenen Proteine konnten somit mit dem „PhoMO“ (Autobio) unterschiedliche Absorptionswerte gemessen und damit die Konzentration bestimmen werden. Um sämtliche Experimente hinsichtlich ihrer Störvariablen wie z. B. der RT vergleichbar zu machen, pipettierte man weiterhin eine BSA-Standardreihe (*bovines serum Albumin*, Serumalbumin des Rinds), die in die Konzentrationsberechnung mit einfluss.

Die Bradford-Reagenz wurde 1:5 verdünnt und mit jeweils 200 µl auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftragung der Standardreihe mit BSA wie angegeben:

Tabelle 22: Bradford-Assay Pipettierschema

0 µl BSA	0 µl BSA	1 µl Probe	1 µl Probe	...	...
1 µl BSA	1 µl BSA	1 µl Probe	1 µl Probe		
2 µl BSA	2 µl BSA	1 µl Probe	1 µl Probe		
4 µl BSA	4 µl BSA	1 µl Probe	1 µl Probe		
6 µl BSA	6 µl BSA	1 µl Probe	1 µl Probe		
		...	...		

In die nebenliegenden Wells erfolgte die Auftragung der Proben ebenfalls in Doppelbestimmung. Danach wurde die Platte bei 595 nm im Photometer gemessen. Je höher die Konzentration der Probe, desto trüber die Lösung und damit höher die Absorption. Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden tabellarisch aufgetragen. Mithilfe der BSA-Werte entstand eine Standardreihe, deren Steigung in die Konzentrationsberechnung mit einfluss.

Konzentration = Mittelwert * Steigung der Standardkurve + y-Achsenabschnitt (im Falle der BSA-Standardkurve immer 0)

2.2.11 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page ist ein Verfahren zur Auftrennung einzelner Proteine. Da verschiedene Proteine eine unterschiedliche Größe haben, konnten diese anhand ihrer Größe separiert werden und in ihrer Konzentrationsmenge im Lysat verglichen werden. Als anionisches Mittel führte das Sodiumdodecylsulfat dazu, dass die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proben nicht länger zusammenhielt und die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine sich auflöste.

Die gemessene Lysatkonzentration sollte so verdünnt werden, dass alle Proben die gleiche Konzentration aufwiesen. Als Verdünnungspuffer wurde der WCL-Lysepuffer genutzt. Zusätzlich wurden

die Proben mit dem sogenannten Lämmli-Puffer (Glycin-Tris-Puffer) versetzt. Dieser enthielt Mercaptoethanol und DTT, welche Protein-Protein-Wechselwirkungen verhinderten und SDS, welches die Proteine zu negativ geladenen Komplexen band. Die Proben wurde wie folgt in ihrer Konzentration einander angeglichen:

Tabelle 23: Konzentrationsberechnung zur Probenherstellung

Gewünschte Konzentration = aktuelle Konzentration / Volumen (1 µl)
Menge an Lysat = (Gewünschtes Probenvolumen x Konzentration des Probenvolumens) / gemessene Konzentration
Menge Lämmli = Gesamtvolumen / 5
Menge an Lysepuffer = Menge an gewünschten Volumen - Menge Lysat - Menge Lämmli

Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 5 min. auf 95°C erhitzt, damit die Proteine denaturierten. Um eventuelle Kondensate wiederzugewinnen, wurden die Proben danach zentrifugiert und kurz gevortext.

Die SDS-Gelelektrophorese beruht auf dem physikalischen Verfahren der Ladungswanderung im elektrischen Feld. Hierfür legte man Strom an die SDS-Page Apparatur an und erzeugte somit einen Pluspol, zu dem die negativ geladenen Komplexe hinwanderten. Darunter lag wie ein Sieb eine Polyacrylamidmatrix, die die Komplexe nach Radius und Molekulargewicht auftrennen konnte. Zur Herstellung dieser Polyacrylamidmatrix wurde ein Stoppgel von einem Trenn- und einem Sammelgel überschichtet. Alle Gele enthielten Acrylamid, welches durch die Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat quervernetzt wurde. Das Trenngel konnte je nach Größe der Proteine mit verschiedenen Acrylamidprozentgehalten gegossen werden (für ein Gel von 50 - 200 kd 7,5 %, für 30 - 120 kd 10 %, für 10 - 60 kd 15 %). Durch das Sammelgel wurden alle Proben zu einer Bande zusammengefasst, um einen gleichmäßigen Lauf zu erreichen. In das Sammelgel wurde zum Formen einzelner Taschen nach Bedarf ein Zehn- oder Fünfzehn-zinken Kamm gesteckt. Nach einer ¾ Stunde war das Gel getrocknet und konnte in die SDS-Page-Apparatur gestellt werden. Hierbei wurden immer zwei Gele einander gegenübergestellt, um ein Spannungsfeld zu erzeugen. Lag nur ein Gel vor, benutzte man hierfür einen Dummi. Die Kämmen wurden vor Einfüllung der Proben entfernt und das Gerüst von allen Seiten mit dem Laufpuffer umspült. In die entstandenen Taschen konnten die Proben aufgetragen werden (bei einem 10er Kamm 20 µl, bei einem 15er 18 µl). In die vorderste Tasche wurde ein Markerprotein gegeben (5 µl), um nach dem Durchlaufen der SDS-Page die jeweilige Bandenhöhe detektieren zu können.

Bis zum Auftrennen des Markers legte man einen Strom von 120 V an. Anschließend wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Je nach Protein wurde die Gelelektrophorese auf Höhe des kleinsten,

zu detektierenden Proteins gestoppt und das Gel zwischen den Glasscheiben entnommen. Die restliche Arbeit erfolgte unter dem Abzug mit dem sogenannten Western Blot.

2.2.12 Western Blot

Ein Western Blot (WB) dient dem Nachweis von Proteinen mithilfe der Übertragung dieser auf eine Membran. Die genutzten Antikörper binden die Proteine, werden im Rahmen einer Immunreaktion markiert und durch Chemilumineszenz in ihrer Leuchtstärke gemessen.

Der Prozess des Blottens beruht ebenfalls auf einem biochemischen Prozess, wobei durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen mit der Nitrocellulosemembran (NS-Membran) die Proteine darauf übertragen werden.

Am ersten Tag wurden zwei Plastikwannen mit dem Turbo-Blot-Puffer gefüllt, in dem die NS-Membranen stets feucht gehalten wurden. Zusätzlich wurden pro Membran zwei Blotting-Filterpapiere benötigt, die ebenfalls im Puffer befeuchtet wurden. Die Filterpapiere wirkten wie eine Art Nasszelle, um die Membran feucht zu halten.

Folgende Schichtung von unten nach oben wurde in die Blottkammer ("Trans-Blot ® Turbo TM Transfer Systems", Biorad) überführt:

Filterpapier, NC-Membran, Gel, Filterpapier

Dieses „Sandwich“ wurde mit einer kleinen Rolle glattgestrichen, um eventuelle Luftblasen darin zu zerstören. Die überstehende Flüssigkeit des Puffers wurde vorsichtig abgesaugt. Die Blot-Kassette wurde anschließend in das Blotting-Gerät geschoben. Je nach Gel wurde ein verschiedenes Programm ausgewählt. Für kleine Proteine (15 % Gel) empfahl sich eine Blottzeit von zehn Minuten. Da größere Proteine (10 % Gel) schwerer übertragen wurden, wurde hier für 20min. geblottet. Nach Verstreichen dieser Zeit sollten sich die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen haben, so dass die Kassette entnommen werden konnte. Mit Ponceau-Red konnten auf der NC-Membran unspezifisch alle Proteine angefärbt werden. Dazu legte man die Membran für 30 sek. in das Ponceau und lässt die Wanne kurz schütteln. Diese Färbung war vor allem sinnvoll, wenn man die Membran in mehrere Teile zerschneiden wollte, um auf verschiedenen Höhen verschiedene Antikörper zu verwenden.

Um das Ponceau wieder zu entfernen, wurde die Membran in TBST gelegt und ein bis zwei Minuten auf dem Schüttler geschüttelt. Die rote Farbe sollte sich wieder ablösen. Anschließend wurde das TBST abgegossen und Milchpuffer auf die Membran gegeben.

Um alle unspezifischen Bindungen zu blockieren, verblieb die Membran für eine Stunde in der Milch. Während dieser Zeit sollten die Primärantikörper angesetzt werden. Diese sorgten für eine indirekte Markierung der Proteine, die am zweiten Tag mithilfe eines zweiten Antikörpers sichtbar gemacht

werden konnten. Die Konzentration der Antikörper war vom Antikörper selbst und der Höhe der Proteinkonzentration abhängig. Die Antikörper wurden ebenfalls im Milchpuffer angesetzt und konnten bei -20°C nach Gebrauch gelagert werden. Je nach Antikörper waren diese circa dreimal wiederzuverwenden. Außerdem war es erforderlich, einen Kontrollantikörper zu benutzen, um die Proteinkonzentration vergleichen zu können. Der Kontrollantikörper sollte in allen Proben in gleicher Konzentration vorliegen und damit auch in seiner Bandenstärke identisch sein. Für Zellproteine wurde β -Aktin (Sigma-Aldrich, 42 kDa) verwendet. Nach Abschluss des Blockvorgangs wurde der Milchpuffer abgegossen und der Primärantikörper auf die Membran gegeben. Dieser wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und band die entsprechenden Proteine.

Am zweiten Tag wurde der Primärantikörper abgegossen und konnte wie oben beschrieben weggefroren werden, um erneut benutzt zu werden. Durchgehend auf dem Schüttler verbleibend, wurden die Membranen drei Mal für je zehn Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Anti-Antigen-Antikörper wegzuwaschen. Anschließend wurde ein Sekundärantikörper für eine Stunde hinzugegeben, der das Antigen-Antikörper-Konstrukt band. Er wurde vorher im Milchpuffer mit einer Konzentration von 1:10.000 angesetzt. Der Sekundärantikörper richtete sich nach der Spezies des Primärantikörpers und enthielt Peroxidase, welches die Oxidation von Luminol katalysierte. Die hierbei entstehende Chemilumineszenz konnte am Ende detektiert werden.

Nach Ende der Inkubationszeit des Sekundärantikörpers wurde erneut drei Mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend konnten die Membranen entwickelt werden. Dazu wurde den Membranen ECL zugesetzt, welches das oben beschriebene Luminol enthielt.

Das ECL verblieb für eine Minute auf der Membran, um eine vollständige Reaktion zu bewirken. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und mithilfe der ChemoCan (Intas Science Imaging) die Chemilumineszenz gemessen. Das entstandene Bild zeigte Banden an den Stellen, an denen der Primärantikörper gebunden hatte. Kam es aufgrund von unspezifischen Antikörpern zu mehreren Banden, konnte mithilfe des Markerproteins die richtige Bandenhöhe detektiert werden. Bei schwachen Signalen empfahl sich die Entwicklung mithilfe des ECL Ultra. Sollte noch ein weiteres Protein auf einer Membran nachgewiesen werden, gab es die Möglichkeit, durch das Stripping die gebundenen Antikörper wieder zu lösen. Hierbei wurde die Membran für vier Minuten mit Aqua dest. gewaschen und schließlich für drei Minuten mit dem Strippingbuffer die Bindungen wieder gelöst. Nach einem erneuten Waschgang von vier Minuten mit Aqua dest. konnte der neue Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht inkubiert werden. Die Entwicklung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.13 Isolation von RNA aus Zellen

Da sich nicht nur die Proteinkonzentration verschiedener Zellen als wegweisend für funktionelle Zusammenhänge darstellte, war es ebenso von Bedeutung, die Gene auf Grundlage ihrer mRNA zu untersuchen. Dies geschah mithilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative realtime polymerase chain reaction*, qRT-PCR), zu deren Betrieb komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) benötigt wurde (siehe 2.2.16). Diese wurde zuvor aus dem Umschreiben von Ribonukleinsäure gewonnen.

Zur Isolation der RNA aus Zellen wurde diesen das Medium abgesaugt und anschließend mit PBS gewaschen. Zu jedem Well wurde zur Zelllösung eine Menge von 800 µl Trizol gegeben. Nach zwei bis drei Minuten Inkubationszeit konnten die Zellen mit einem Schaber aus dem Well gelöst werden. Sie wurden in ein Reagiergefäß überführt und nach Zugabe von Chloroform zentrifugiert. Hier erfolgte eine Auftrennung in drei verschiedene Phasen:

Unten: Trizol, Mitte: Interphase mit verschiedenen Proteinen, Oben: die gelöste RNA

Die oberste Phase wurde unter Verwerfen der übrigen in ein anderes Reagiergefäß überführt. Nach der Zugabe von Isopropanol wurde erneut gefügt. Hierbei fiel die RNA als kleines Pellet am Unter- rand des Reagiergefäßes aus. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde durch die Zentrifugation in einem Milliliter Ethanol gewaschen. Dieser Waschvorgang lief zur Reinheitssicherung zwei Mal ab.

Das übrige Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknungsvorgang wurde 30 µl RNA-freies Wasser dazugegeben. Nach Lösen des Pellets konnte die fertige RNA bei -80°C weggefroren werden.

2.2.14 Messen der RNA

Zum Umschreiben in cDNA wurde die RNA aufgetaut und gevortext. Anschließend wurde mithilfe des NanoDrops die Konzentration gemessen. Das NanoDrop kann die optische Dichte (OD) mit einer Wellenlänge von 260 nm messen. Um den gleichen Standard zwischen den einzelnen RNAs zu erreichen, wurde dem NanoDrop zuerst Wasser als eine Blanklösung präsentiert und das Gerät hierauf genullt. Anschließend wurden die Proben gevortext und pro Messung je 1 µl RNA aufgetragen. Dabei musste das Gerät nach jeder Messung vorsichtig gesäubert werden. Je nach Einstellung des Verdünnungsfaktors (Lid-Faktors) konnten unterschiedlich hohe Konzentrationen gemessen werden. Dabei erfolgten einige Voreinstellungen zur richtigen Berechnung der Konzentration. Es war ebenfalls möglich, DNA mit dem Gerät zu messen, welche allerdings einen anderen Vorfaktor erhielt.

Es wurde die optische Dichte der RNA gemessen und damit auf die Konzentration geschlossen. Zusätzlich maß das Gerät auch die Reinheit der RNA. Der 260/280 Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen und gab den Anteil proteinfreier RNA am Gesamtwert an. Der 230/260 Wert sollte ebenfalls in diesem Bereich liegen. Bei beiden Werten wurde die Absorption der Probe bei 230 nm Wellenlänge zu der von 260 nm bzw. 260 nm zu 280 nm untersucht. Sollte die Reinheit außerhalb dieses Bereichs liegen, wurde diese verworfen, da bei anschließenden Messungen eine Kontamination nicht ausgeschlossen werden konnte. Mithilfe des PVC-Viewers (Intas Science Imaging, Göttingen) konnten die gemessenen Werte übertragen und exportiert werden.

2.2.15 Umschreiben der RNA

Standardmäßig wurde ein Mykrogramm RNA umgeschrieben. Um diese Konzentration zu erreichen, fügte man so viel H₂O hinzu, dass sich eine Lösung von 15 µl Lösung ergab (15 µl H₂O - Kehrwert der RNA Konzentration). Weiterhin wurde die Taq-Polymerase (1 µl) hinzugegeben. Dieses Enzym war in der Lage, die RNA umzuschreiben. Die hierfür benötigten Oligo-Deoxythymidin-Primer (Oligo dT-Primer) und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden ebenfalls hinzugegeben (4 µl). Die Aktivierung des Enzyms erfolgte durch das Durchlaufen mehrerer Erhitzungsschritte (5 min. bei RT, 20 min. bei 46°C, 1min. bei 96°C). Anschließend wurden die 20 µl Probe mit 80 µl Wasser aufgefüllt, sodass eine cDNA Lösung von 100 µl entstand. Diese konnte bei -20°C gelagert werden.

2.2.16 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der Reproduktion von Gensequenzen mithilfe von Denaturierung, Annealing und Elongation. Durch eine erhöhte Temperatur wurden die DNA-Stränge denaturiert und somit voneinander getrennt. Anschließend wurde die Temperatur wieder gesenkt. Bei 55°C konnten sich die Primer an die DNA anlagern. Die anschließende Temperaturerhöhung bis zum Optimum der Taq-Polymerase sorgte dafür, dass das Enzym die Primer verlängerte, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag. Diese Amplifikation fand allerdings nur statt, wenn genug Primer und Nukleotide vorlagen.

Bei der sogenannten quantitativen Echtzeit-PCR wurde zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff eingebracht, der in der DNA interkaliert und mithilfe einer Kamera messbar war. SYBR-Green (Bio-Rad) war ein Farbstoff, der ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis aufwies.

Nach einiger Zeit kam es aus verschiedenen Gründen zu einer Selbstlimitation des Annealing-Prozesses (Primer oder Nukleotide nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden, Polymerase nicht mehr im Temperaturoptimum usw.). Der gemessene Schwellenwert (*cycle threshold*, Ct-Wert) war der

letzte Wert, an dem die DNA sich noch exponentiell vermehrt hatte. Aus dem Ct-Wert ließen sich Rückschlüsse auf die Expressionsdichte verschiedener Gene ziehen. Je nach zu untersuchendem Zielgen (*target gene*) wurde ein Master-Mix pipettiert. Pro Well wurde dabei folgende Menge benötigt:

Tabelle 24: Herstellung eines Primer-Master-Mixes

Menge	Name
5 µl	SYBR Green
0,05 µl	Primer for
0,05 µl	Primer rev
3,5 µl	Wasser

Die Primer müssen sich jeweils in beide Richtungen der DNA anlagern können. Daher wurde ein Primer für die vorwärtslaufende (*forward*, for) und einer für die gegenläufige (*reverse*, rev) Richtung benötigt.

Dieser Master-Mix wurde in Dreifachbestimmung (je 9 µl pro Well) aufgetragen. Hierbei war der Einsatz eines Housekeeping Genes (hier GAP-DH/XS13) erforderlich, da die Ergebnisse hinterher auf dieses normiert wurden. Mit stetigem Wechsel der Spitze wurde 1 µl der zu bestimmenden cDNA Probe hinzugegeben. Des Weiteren wurde jeder Primer einmal mit H₂O als Probe eingesetzt, um eine Kontamination des Master-Mixes auszuschließen. Die Platte wurde mit einer Folie zugeklebt. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde sie anschließend zentrifugiert. Es war darauf zu achten, dass das lichtempfindliche SYBR Green dunkel stand und die Platte kühl gehalten wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde die Platte in die Vorrichtung eingebaut. Mithilfe der Step One Plus Software v2.3 wurde die virtuelle 96-Well Platte beschriftet, sowie eine Länge von 40 Zyklen ausgewählt. Durch das Auswählen dieses Programmes begann die quantitative Echtzeit-PCR.

Tabelle 25: PCR-Zyklus

Temperatur	Zeitdauer	Funktion
94°C	5 min.	Denaturierung
94°C	30x 30 sek.	Denaturierung
55°C	30 sek.	Hybridisierung
72°C	90 sek.	Temperaturoptimum der Taq-Polymerase
72°C	5 min.	Temperaturoptimum der Taq-Polymerase
4°C		Abkühlvorgang

Nach gut zwei Stunden waren alle Erhitzungs- und Abkühlungsschritte durchlaufen. Aufgrund der Messungen des SYBR Greens ließen sich Rückschlüsse auf die Expressionsmenge der untersuchten

Gene ziehen. Um die Vergleichbarkeit aller Proben zu gewährleisten wurden diese auf die Werte des Housekeeping Gen normiert. Aus dem Kehrwert der zweiten Potenz wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung berechnet. Diese Angabe zeigte die Expression der Zielgene.

2.2.17 Funktionelle Readouts

2.2.18 Reporter-Assay

Das Reporter-Assay diente dazu, durch die Nutzung eines -in diesem Falle NF- κ -B- spezifischen Promoters die Transaktivierung eines Gens bestimmen zu können. Dafür nutzte man ein Gen, dem dieser Promoter vorgeschaltet war. An den Promoter konnten die Transkriptionsfaktoren binden und damit zum Ablesen des Gens führen. Dadurch kam es zur Aktivierung eines fluoreszierenden Enzyms, der Renilla-Luciferase. Deren Aktivität konnte gemessen werden und damit Rückschlüsse auf die Aktivität der Zelle gezogen werden.

An Tag eins des Reporters wurden zwei verschiedene Stocks an Lösung angesetzt. Pro Well wurden benötigt:

Tabelle 26: Stocks Reporter-Assay

Stock A	Stock B
100 μ l serumfreies Medium	100 μ l serumfreies Medium
15 ng Renilla	3 μ g Lipofectamin je μ g DNA (Renilla + Promoter)
200 ng Konstrukt (hier pNF- kB)	

Beide Stocks wurden kombiniert und nach zehn Minuten Inkubation auf die 24-Well Platte gegeben. Auf dieser wurden vorher 800 μ l des Mediums vorgelegt, sodass sich eine Endmenge von einem Milliliter Medium pro Well ergab. Die Platte wurde für 24 h in den Inkubator gestellt.

Am zweiten Tag wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l des Lysepuffers (1:5 in H₂O verdünnt) für 15 min. lysiert. Danach wurden 30 μ l jeder Kondition auf eine 96-Well Platte pipettiert. Die Aktivität dieser Proben wurde im Weiteren mit Zugabe von 30 μ l des Firefly-Luciferase Enzyms im Lumineszenz Messgerät „LoMo“ gemessen.

Eine Luciferase enthält Luciferin, ATP und Mg²⁺. Luciferol wird durch Sauerstoff oxidiert und zerfällt dabei, wodurch es zu einer Biolumineszenz-Reaktion kommt. Diese konnte mit dem LoMo gemessen werden. Anschließend wurden 30 μ l des Renilla-Stop-and-Glo® dazu gegeben. Damit wurde die erste Luciferasereaktion gestoppt und eine zweite, die der Renilla-Luciferase, in Gang gesetzt.

Deren Lumineszenz konnte erneut gemessen werden. Die gemessenen Werte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst, wobei die Werte der Firefly-Luciferase auf die der Renilla normiert wurden. Die Mittelwerte wurden graphisch aufgetragen und konnten dann analysiert werden.

2.2.19 FACS-Analyse der Annexin/ PI-Färbung

Die Annexin-PI-Färbung diente der Quantifizierung und Untersuchung einzelner Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie. Ein durch Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer (*fluorescence activated cell sorter*, FACS-Gerät) enthielt mindestens einen Laser, der markierte Zellen einzeln zur Strahlung anregen konnte. Das abgestrahlte Licht konnte durch verschiedene Spiegel und Filter aufgespalten oder gebündelt werden. Damit ergab sich ein spezifisches Erkennungsmuster. Die Besonderheit dieses Verfahrens war, dass jede Zelle einzeln erkannt werden konnte. Je nach Markierung der Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe, streuten diese Licht unterschiedlicher Wellenlänge und konnten so detektiert werden.

Eine Möglichkeit der Zellmarkierung war das Annex-PI-Staining. Bei Annexin handelte es sich um ein Ca^{2+} abhängiges Protein, welches an Phosphatidylserin binden konnte, sobald dieses durch den Tod der Zelle an die Außenseite der Membran gelangt war. Damit konnte Annexin ein frühes Apoptosestadium nachweisen. Die Propidiumiodid-Lösung (*propidium iodide solution*, PI) hatte die Fähigkeit, eine Zellmembran bei niedriger Permeabilität zu durchwandern. Dies wurde erst in einer späten Apoptosephase erreicht, sodass PI innerhalb der DNA interkalieren konnte und so die späte Apoptose bei einer Wellenlänge von 488 nm nachwies. Ein Nachweis keiner der Beiden bedeutete, dass es sich um eine tote Zelle handelte (Vermes et al. 1995; Rieger et al. 2011).

Die Zellen wurden wie gewohnt 24 h vor der Ernte ausgesät, sodass sie eine Konfluenz von 70 - 80 % erreichten. Am Tag der Ernte wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 500 μl Trypsin abgelöst und schließlich mit 1,5 ml Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde drei Minuten gefügt (4°C , 135000 bpm), sodass sich ein schmales Zellpellet bildete. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet in 300 μl des Annexin-Puffers als Trägersubstanz resuspendiert. Anschließend wurde erneut für drei Minuten gefügt und der Überstand abgekippt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μl des Annexin-Antikörpers, sowie von 5 μl des PI-Antikörpers. Da diese Lösung lichtempfindlich war, wurden die Zellen für 15 min. an einem dunklen Ort aufbewahrt.

In der Zwischenzeit konnte das FACS-Gerät hochgefahren und durchgespült werden (2x Cell Flow Cell Lösung, 2x PBS). Vor dem Einschieben der Röhrchen in das FACS-Gerät wurden je nach Pelletgröße 200 - 300 μl des Annexin-Puffers hinzugegeben und das Gemisch gut gevortext. Das FACS-Gerät saugte die Flüssigkeit auf und separierte die Zellen nach ihrer Reaktion mit Annexin und PI. Das Fenster sollte so ausgewählt werden, dass nur einzelne Zellen betrachtet werden und Dubletten

von der Beobachtung ausgeschlossen sind. Außerdem musste mithilfe der „Voltage“-Regulationsmöglichkeiten die Messung je nach betrachteter Zellgröße eingestellt werden. Die Ergebnisse wurden mit der „Flowjow“-Software ausgewertet und in einem quantitativen Diagramm auf den Wert 100 in die Kategorien „tot“, „lebend“, „frühe Apoptose“ und „späte Apoptose“ eingeteilt. So konnten die verschiedenen Klone miteinander verglichen werden.

2.2.20 Die CRISPR/Cas9-Methode

Zusammen mit Jessica Spitaliri, AG Heßmann, wurde ein CRISPR/Cas9 Knock-Out (K.O.) in den KPC-Zellen durchgeführt, mit denen in den folgenden Experimenten weitergearbeitet wurde. Hierbei wurde folgendes Protokoll verwendet:

2.2.21 Klonierung der Guide-RNA

Für den CRISPR/Cas9 K.O. von *Arid1a* wurde über ein Plasmid die entsprechende Gensequenz aus einem Vektor in die KPC-Zellen gebracht. Zuerst erfolgte das Annealing der Primer für die Guide-RNA. Die Guide-RNA ist ein künstliches Konstrukt, welches wichtige genetische Informationen für die Klonierung enthält. Hierfür wurde ein Mastermix in einem 1 ml Reagiergefäß angesetzt:

Tabelle 27: Mastermix zur Klonierung der Guide-RNA

10 µl 10x Buffer 0 (Thermo Scientific)
50 µl H ₂ O
20 µl Primer rev und for (unverdünnt)

Ein Becherglas wurde mit 600 ml Wasser gefüllt und in der Mikrowelle aufgekocht. Der Mastermix wurde in einen Schwimmer gestellt und in diesem in das kochende Wasser überführt. Hier verblieb er für 10 min. Im Anschluss wurde das Becherglas mit dem Schwimmer und dem darin enthaltenen Mastermix für zwei Stunden im Kühlschrank auf einer weichen Matte gelagert. Es erfolgte die langsame Abkühlung. Damit im Anschluss eine Ligation stattfinden konnte, musste der Vektor enzymatisch verdaut und damit die Guide-RNA in das Px-458 Plasmid eingebracht werden. Der Verdau und die Ligation verliefen dabei in einem Schritt.

Für den Ligationsansatz wurde jeder Mastermix 1:400 (2 µl Mastermix + 798 µl H₂O) in einem 2 ml Reagiergefäß verdünnt. Je Primer für die Guide-RNA wurde ein Ansatz erstellt: px-458 + E8_1 und px458 + E8_2 (E8 steht dabei für den verdünnten Mastermix). Für den enzymatischen Verdau wurden Oligonukleotide, das Plasmid, die Ligase, deren Puffer der zugehörige Tango Puffer und ein Beschleuniger zusammengegeben.

Tabelle 28: Verdauansatz

2,2 µl 100 ng Px-458 Plasmid low copy (c = 46,85 ng/µl)
2 µl Annealed Oligonukleotide
2 µl Tango Buffer
1 µl Fast Digest Bbs1 (Bpi1)

Tabelle 29: Puffer der Ligase

1 µl DTT (10 mM)
1 µl ATP (10 mM)
0,5 µl T4 Ligase
10,3 µl H ₂ O

Anschließend erfolgte die Ligation in einem Thermocycler T100 (Biorad). Sechs Zyklen wurden nacheinander durchlaufen: 5 min. bei 37°C, 5 min. bei 21°C und schließlich die Abkühlung bei 8°C. Die Lagerung konnte bei -20°C erfolgen.

Das Plasmid, welches die entsprechende Guide-RNA enthielt, wurde in ein Bakterium eingebracht. Hierzu wurden E. coli Bakterien benutzt. Diese waren hitzekompetent, weshalb die Reaktion bei Hitze erfolgte. Die Wells wurden mit den E. coli Bakterien beimpft. Da zwei verschiedene Primer genutzt wurden, wurde ein zusätzliches Well zur Kontrolle benutzt. Es wurden 2 µl des Ligationsmixes auf ein Well gegeben. Das Kontrollwell blieb frei. Um das sensible Konstrukt nicht zu zerstören, durfte der Mix nicht gevortext werden. Das Gemisch inkubierte 30 min. auf Eis. Anschließend wurde es 35 sek. bei 42°C erhitzt, damit in diesem Hitzeschock die Transformation erfolgen konnte. Danach erfolgt eine Abkühlung für 5 min. auf Eis. Pro Well wurden 400 µl Soc-Medium dazu gegeben. Die Platte wurde für eine Stunde bei 37°C in dem Schüttler horizontal inkubiert. 150 µl des Mixes wurden auf eine Ampicillin Agarplatte ausgestrichen. Über Nacht inkubiert diese bei 37°C. Durch die Ampicillinresistenz im Vektor konnten nur jene Stämme wachsen, die den Vektor auch wirklich eingebaut hatten. So erfolgte eine Selektion der erfolgreichen Transformation.

2.2.22 Picken von Kolonien für Mini DNA-Preperation

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden die Kolonien von der Agarplatte gepickt. Dann erfolgte eine Mini Preperation zur Isolierung kleinerer Mengen der DNA. So sollte der Einbau getestet werden, bevor die Maxi-Preperation erfolgte. Von jedem Primer wurden fünf Kolonien gepickt und 5 ml LB Medium mit 100 µg Ampicillin (50 ml H₂O mit 50 µl Ampicillin) in ein 15 ml Falcon gegeben. Über Nacht wurden die Kulturen im Schüttelinkubator (37°C, 200 rpm) gelagert. Für die spätere Maxi-Preperation mit erhöhter Menge an DNA-Gewinn wurden 1 ml abgenommen und bei 4°C gelagert.

Die übrigen 4 ml wurden für die Mini-Preperation benutzt. Zur Aufreinigung der DNA wurde das Nucleo spin DNA, RNA and Protein Kit von Machery Nagel genutzt. Das Protokoll wurde wie vorgegeben für ein Plasmid mit niedriger Replikationsrate (*low copy plasmide*) durchgeführt. Die Proben wurden dabei in eine DNeasy Spin Column mit einem Filter gegeben. Dort wurden sie in Wasser eluiert und zwei Mal 20 µl des Puffers auf die Membranen gegeben. Zusätzlich wurde ein weiterer Waschschrift bei 50°C mit einem AW Puffer durchgeführt, um die Probe weiter zu bereinigen. Dieser Waschschrift diente dem Lösen der DNA aus dem Filter. Nach einer Inkubationszeit von 3 min. wurden die Proben bei 11000 rpm für 1 min. gefügt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die DNA löste sich aus dem Filter und gelangte in den flüssigkeitsgefüllten Bereich des Reagiergefäßes. Die DNA konnte abschließend bei -20°C gelagert werden.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte am Nano-Drop. Voraussetzung hierfür war die entsprechende Reinheit der DNA, die mit dem 230/260 und 260/280 Werten ermittelt wurde. Zur Sequenzierung wurden die Klone zu SeqLab/ Microsynth (Microsynth Maschmühlenweg 36, 37081 Göttingen) verschickt. So konnte bestimmt werden, ob die Sequenz erfolgreich eingebaut wurde.

Ein Ansatz pro Klon enthielt: 500 ng DNA in maximal 12 µl H₂O (steril) + 3 µl Sequenzierungsprimer (10 mM). Diese Probenansätze wurden in 1,5 ml Cups gefüllt und mit Barcodes versehen.

Stämme, bei denen die Guide-RNA Sequenz erfolgreich nachgewiesen wurde, wurden nun mittels Maxi-Preperation expandiert. Hierfür wurde die Maxi-Prep mit 1 ml der Lösung angeimpft, die auch zur Sequenzierung geschickt wurde bzw. dem dafür zurückbehaltenen Rest.

200 ml 1x LB Medium wurden in einen Erlmeyerkolben (500 ml) gefüllt. Es folgt die Zugabe von 200 µl Ampicillin (100 µg), sowie von 400 µl aus der Vorkultur (Bakterienkultur). Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht bei 200 rpm Schüttelinkubation.

2.2.23 DNA-Isolation

Die genomische DNA (gDNA)- Isolation erfolgt mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen. Mithilfe von Trypsin wurden die Zellen gelöst. Die Zellsuspension wurde mithilfe der Neubauerzählkammer gezählt und eine Menge von die 2×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Reagiergefäß überfüllt. Dieses wurde für 3 min. bei 1350 rpm zentrifugiert und das Pellet in 200µl PBS resuspendiert. Zur Zelllyse wurden 20 µl Proteinase K aus dem Kit hinzugegeben. Anschließend wurden 200 µl AL-Puffer hinzupipettiert. Die Suspension wurde gevortext und für 10 min. bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde Ethanol dazugegeben. Dieses diente zur Deaktivierung der Lyse und Denaturierung der DNA. Das Lysat wurde in ein besonderes Gefäß, das DNeasy Spin Column, übertragen und zentrifugiert (1 min. bei 8000 rpm). Dieses Gefäß enthielt eine kleine Silikat-Membran, in der sich die DNA sammelte. Die Flüssigkeit konnte so abgetrennt werden und unterhalb der Membran

aufgefangen werden. Dieser Rest wurde entsorgt und ein neues Sammelgefäß zugefügt. Es wurden 500 µl AW-Puffer (Bestandteil Kit) zum Auswaschen hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 1 min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Schritt wurde wiederholt. Im zweiten Waschschrift erfolgte die Zentrifugation für 3 min. bei 14000 rpm. Die DNA konnte durch Zugabe von 200 µl Elutionslösung AE-Puffer aus der Silikat-Membran gelöst werden. Dazu wurde das 1,5 ml Reagiergefäß für 1 min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA im Nanodrop gemessen.

Die Zelllinie, in der der K.O. durchgeführt werden sollte, in unserem Fall KPC black 6 Zellen (TB32047), wurden in Kultur genommen. Um die Reinheit der Zellen zu gewährleisten, wurde ein Mycoplasmentest durchgeführt.

2.2.24 Mycoplasmentest und Mycoplasmenbehandlung

Mycoplasmen sind Mikroorganismen, die intra- und extrazellulär leben können. Sie können Zellen in Kultur kontaminieren und u. a. Störungen im Zellmetabolismus bewirken. Um derartige Probleme zu verhindern, wurden Zellen vor Inkulturnahme auf Mycoplasmen getestet. Dies erfolgte mithilfe des „MycoAlert“ Mycoplasmen Detection Kits von Lonza. Mit diesem Kit konnten spezifische Enzyme der Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Zwei Tage nach der letzten Passage wurden 500 µl des Zellüberstandes entnommen und zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl einer lysierenden Reagenz aus dem Kit. Die An- oder Abwesenheit von Mycoplasmen wurde luminometrisch bestimmt. Bei vorhandenen Mycoplasmen wurden die Zellen verworfen.

2.2.25 Transfektion der Guide-RNA

Die Transfektion der Guide-RNAs (gelöst in Wasser 1,49 µg/µl) in die KPC Empfängerzellen erfolgte mit Lipofectamin 2000. Hierfür wurde serumfreies 1x DMEM/10 % FCS/ 1 % NEAA Medium in 12 ml Tubes mit blauem Deckel gegeben. Es erfolgte die Zugabe von Lipofectamin in das Kontroll Tube und das Konstrukt Tubes (2,5 µl pro 1 µg Konstrukt). Es wurde die jeweiligen Menge der Konstrukt-DNA zugegeben, gevortext und für 5 - 10 min. bei RT inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurde das Zell Dish aus dem Inkubator geholt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 1,5 ml 1x DMEM/ 10 % FCS/ 1 % NEAA beschichtet.

Tabelle 30: Komponenten zur Transfektion der Guide-RNAs

Komponenten	Kontrollgefäß	Konstruktgefäß: E8_1 xPX-458 #1 + E8_2 x PX-458 #2)
1x DMEM/ 1% NEAA (serumfrei)	500 µl	500 µl
Lipofectmain 2000	25 µl	25 µl
DNA (5 µg): E8_1		3,5 µl
DNA (5 µg): E8_2		3,5 µl
Gefäß	6-Well-Dish	10-Well-Dish
1x DMEM/10% FCS/ 1%NEAA	1,5 ml	1,5 ml

Es wurden 500 µl Kontroll- bzw. DNA-Suspension zu den 1,5 ml Medium auf die vorgesehenen 6-Well Platten pipettiert. Es erfolgt ein Inkubationsschritt für 48 h im Inkubator. Ob ein erfolgreicher Einbau des Vektors erfolgt war, ließ sich in der Immunfluoreszenz (IF) bestätigen. Der Vektor enthielt bereits den grün fluoreszierenden Farbstoff GFP. Bei eingebautem Vektor konnte ein grünes Signal detektiert werden und somit die erfolgreiche Durchführung des Experiment überprüft werden.

Die DNA-Isolation erfolgt erneut mit dem DNeasy blood and tissue Kit #69506 von Qiagen. Dafür wurden die Zellen lysiert und abgescharbt. Anschließend wurde eine Validierungs-PCR durchgeführt, um die gDNA-Transfektion zu überprüfen.

2.2.26 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur DNA-Amplifizierung. Hierfür wurden zugegebene Oligonukleotide an einer durch Primerpaare (3'-5' und 5'-3') bestimmte Region angelagert. So wurden kurze DNA-Sequenzen verlängert, was eine genauere genetische Untersuchung dieses DNA-Abschnitts erlaubt.

Für die PCR wurde gDNA benötigt. Diese wurde wie oben beschrieben gewonnen. Zusätzlich wurden dNTPs, eine hitzestabile DNA-Polymerase, die forward- (5'-3') und reverse- (3'-5') RNA-Oligonucleotid-Primer und ein Puffer zugegeben.

Zuerst erfolgt die Erstellung eines Mastermixes, der in einem 1,5 ml Reagiergefäß bereitgestellt wurde. Ein Ansatz dieses Mastermixes reichte dabei für die Amplifikation von 1 µl DNA.

Tabelle 31: Konditionen Kappa-Mix

Kondition	Kappa-Mix mit Lipokontrolle	Kappa-Mix mit E8_1 #1 + E8_2 #2 in PX-458
Probenzahl	1x	1x
Mastermix	12,5 µl	12,5 µl
Primer for	1 µl	1 µl
Primer rev	1 µl	1 µl
Wasser	7,6 µl	7,7 µl
DNA (100 ng)	1,9 µl	2,3 µl
gesamt	25 µl	25 µl

Der Kappa-Mix war der Mastermix für die PCR. Die Amplifikation fand im Thermocycler T100 von Biorad statt. Zuerst wurde die DNA hitzeabhängig denaturiert, sodass sich die DNA-Doppelstranghelix auflöste. Die im Mastermix enthaltenen Primer lagerten sich dann an der DNA im entsprechenden Bereich an. Diese flankierte Zielsequenz konnte von einem Enzym, der DNA-Polymerase, amplifiziert werden. Diese Schritte wurden 40-mal wiederholt. Anschließend wurde die DNA auf 4°C heruntergekühlt und mit 2 µl 10x Loading Dye versetzt.

Tabelle 32: CRISPR/Cas9-PCR-Programm für die PCR-Reaktion

Stufe	Temperatur	Zeit	
1	94°C	3 min.	
2	94°C 68°C	30 sek. 1,5 min.	40 Wiederholungen
3	68°C	3 min.	

2.2.27 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese konnten Nukleinsäure nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Agarosegel bildete dabei ein Gitternetz, in dem die DNA-Fragmente in den Poren haften blieben. Je höher die Agarosekonzentration war, desto kleiner wurden die Poren. So konnte ein 2 %iges Gel Fragmente zwischen 0,1 - 2 Kilobasen (kb) auftrennen (entspricht 10 - 1000 Basenpaaren (bp)).

Für die Detektion von ARID1A (ca. 2000 bp) wurde deshalb ein 0,75 % Agarosegel benutzt.

0,75 % Agarosegel: 75 ml 1x TBE + 3 µl Midoori Green + 0,525 mg Agarose

Die Agarose wurde in einem Tris-Borat-EDTA-Elektrophoresepuffer (TBE) aufgelöst. In der Mikrowelle wurde diese gekocht, bis sich die Lösung zu einem Gel verfestigt hatte. Nach Abkühlung

wurde MIDORI-Green hinzugegeben, welches mit der DNA interkaliert. Aufgrund seiner Toxizität war die Inhalation von MIDORI-Green zu vermeiden. Das flüssige Gel wurde in einen Schlitten gegossen und mit einem Kamm Taschen in das Gel gezogen. Dieser Kamm konnte nach Härtung des Gels entfernt werden. Pro Tasche wurde ein Marker (Gene Ruler) eingefüllt. Dieser gab Aufschluss über die Größe des DNA-Fragmentes. In die weiteren Taschen wurden 10,5 µl der Probe, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 100 V auf dem Elektrophoresegerät (Power Pac HC, biorad) angelegt und diese für 45 min. beibehalten. Durch die Spannung kam es zu einer Auftrennung der Probe entsprechend ihrer verschiedenen Ladung. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe wurde das Wanderungsverhalten unterschiedlich durch das Netz beeinflusst und die Probe aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel belichtet. Im Chemidoc (Biorad) wurde mit der Image Lab Software ein Filter für Chemilumineszenz ausgewählt. Die Expositionszeit lag zwischen 0,2 und 1 sek. Im Agarosegel ließ sich dann die Bandenhöhe der Proben mithilfe des Markers feststellen.

Zum Separieren der einzelnen Klone erfolgte eine FACS Sortierung. Hierfür wurden die Wells entsprechend vorbereiten. Im ersten Schritt wurde das Medium abgesaugt und ein Mal mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 2 ml Accutase auf das 10 cm Dish (1 ml auf das 6 cm Dish). Die Accutase löste enzymatisch die Zellen vom Grund. Die Inkubationszeit hierfür betrug ungefähr 15 min. Die Reaktion wurde mit Medium abgestoppt. Anschließend wurde die Suspension für 3 min. bei RT und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die gesammelten festen Anteile wurden in 1 ml PBS resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Durch einen 50 µl Filter wurde die Flüssigkeit in ein FACS Tube übertragen. Zusätzlich wurden drei 96 Well Platten vorbereitet, in denen die Zellen nach Separation im FACS einsortiert wurden. Pro Well wurden 100 µl DMEM, 1 % NEAA, 10 % FCS und 1 % Pen Strep gegeben. Das FACS sortierte eine Zelle pro Well. Pen Strep ist ein Antibiotikum und soll die Kontamination der Zellen verhindern. Nach circa zwei Wochen konnten die Zellen bei 70 % Konfluenz abtrypsiniert und auf das nächstgrößere 24-Well Dish übertragen werden. Zwischendrin erfolgte eine Mediumerneuerung. Die Zellen wurden entsprechend ihres Wachstums bei angemessener Fülle auf das nächsthöhere Wellformat bis zur T75-Flasche übertragen. Ab der T75-Flasche wurde kein Pen Strep mehr hinzugegeben.

Zur K.O.-Validierung wurden Zellen in WCL gewonnen und in einem Western Blot hinsichtlich ihrer Expression von ARID1A untersucht. Anhand des WBs konnte so eine erste Einschätzung erfolgen, ob es sich um einen vollständigen K.O., einen heterozygoten oder einen Wildtyp-Klon handelte.

Anschließend erfolgte wie oben beschriebene eine DNA-Isolierung und eine Agarose-Gel-Elektrophorese zur Validierung des Knockouts (homozygoter K.O. Klon: 2036 bp; Kontrollklon: 2640 bp).

Mit Trizol konnte wie in 2.2.13 beschrieben RNA gesammelt werden. Die anhand der Untersuchungen ausgewählten Klone wurden erneut zur Sequenzierung geschickt, um den erfolgreichen Knock-out zu validieren. Anschließend wurden die Zellen kultiviert und konnten für Versuche genutzt werden.

2.2.28 Färbemethoden

2.2.29 Gewinnung von Slides aus Histoblöcken

Um aus einem Gewebeblock einzelne Schnitte zur Färbung zu gewinnen, wurden diese in das Mikrotom "RM2265" (Leica) eingespannt. Zu Beginn wurde jeweils eine neue Messerklinge genutzt, die sich für viele Blöcke weinternutzen ließ. Am Schneidegerät wurde ein Becken mit 70 %igem Ethanol gefüllt, in dem die abgeschnittenen Gewebemembranen schwimmen konnten. Zusätzlich galt es, ein Wasserbad bereit zu stellen, welches der Entfaltung und Glättung der Schnitte diente. Außerdem sollte eine Heizplatte auf 37°C vorgeheizt werden, auf der die Schnitte trocknen konnten.

Um das Gewebe im Block anzuschneiden, erfolgten die ersten Schnitte mit einer Dicke von 15 µm. Erkannte man erste Gewebeanschnitte auf den abfallenden Stücken wurde die Schnitttiefe auf 3 µm heruntergestellt. Die fertigen Schnitte wurden mithilfe einer Pinzette auf einen Schnittträger geschoben und in das Wasserbad überführt. Dort beließ man sie für zehn Minuten, bis sie sich komplett entfaltet hatten. Dann wurden sie auf einen vorher beschrifteten Schnittträger überführt und zum Trocknen auf die Wärmebank gelegt.

2.2.30 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung) ist eine Gewebefärbung, mit der man die Schnitte näher betrachten kann. In diesem Fall wurde die Färbung vor allem gebraucht, um Unterschiede zwischen verschiedenen Mauslinien und Altersklassen zu erkennen und zu beurteilen, ob Tumovorläuferstufen oder Tumore vorliegen.

Dazu mussten die Schnitte erst im Roticlear entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser rehydriert und mit Hämatoxylin (5 min.) gefärbt. Da dies ein basischer Farbstoff ist, färbt er hydrophile Bestandteile wie die DNA in den Zellkernen oder Ribosomen.

Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Schnitte sechs Minuten unter laufendes Wasser gestellt. Da der pH-Wert des Wassers deutlich basischer war, stieg dieser wieder an und die Schnitte färbten sich ins Bläuliche (Bläuen). Zur Färbung des Zytoplasmas (basischer pH) wurden die Schnitte für 30 sek.

in Eosin gestellt. Da es sich hierbei um einen sauren Farbstoff handelte, wurden azidophile Bestandteile wie das Zytoplasma oder die Mitochondrien angefärbt.

Auch hiernach erfolgte ein dreimaliger Waschgang, bevor die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe wieder jeweils drei Minuten dehydriert wurden. Am Ende erfolgte noch ein Schritt mit Roticlear, bevor die gefärbten Schnitte mit einem Deckgläschen und dem Kleber Rotimount eingedeckt werden konnten. Die Schnitte wurden anschließend bei RT aufbewahrt.

2.2.31 Immunhistochemie ABC-Methode

Die Immunhistochemie (IHC) diente der Anfärbung von Gewebe- oder Kernstrukturen mithilfe verschiedener Antikörper. In unserem Labor wurde hierzu die *avidin-biotin-complex* (ABC)-Methode benutzt.

Hierzu wurden am ersten Tag die Gewebeproben zwei Mal für je zehn Minuten in Roticlear entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (99 %, 95 %, 80 %, 70 %, jeweils vier Minuten) rehydriert. Je nach zu färbendem Antikörper wurde der jeweilige Puffer (Citrat oder TE-Puffer) ausgewählt. Die Schnitte wurden kurz in Wasser überführt und anschließend in ein Kadenzasystem mit dem jeweiligen Puffer gestellt. Dort konnten die Schnitte in einzelnen Slidehaltern befestigt werden.

Es erfolgte ein Aufkochvorgang in der Mikrowelle. Diese feuchte Erhitzung diente der Demaskierung der Epitope, indem Quervernetzungen gelöst wurden und mehr Epitope für die spätere Reaktion zur Verfügung standen. Nach einmaligem Aufkochen wurden die Schnitte für 20 min. bei 600 W weitergekocht. Dann mussten diese zehn Minuten bei RT abkühlen. Anschließend wurden sie für 20 min. auf Eis gestellt, um sie hier noch weiter herunterzukühlen.

Nach diesem Abkühlprozess wurden die Schnitte drei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Dann wurden sie in eine 10 % Lösung aus 30 % Wasserstoffperoxid und Leitungswasser gegeben, um dort für zehn Minuten zu verweilen. Das Wasserstoffperoxid blockierte in diesem Schritt die endogene Peroxidase, um falsch positive Ergebnisse und Hintergrundfärbung zu vermeiden.

Die Schnitte wurden zwei Mal für fünf Minuten mit PBST gewaschen. Je nachdem, ob es sich um zytoplasmatische oder nukleäre Proteine handelte, wurde PBS plus Tween oder Triton X100 verwendet. Die darauffolgende Reaktion mit 10 % BSA diente der Blockierung unspezifischer Quervernetzungen. Die BSA-Lösung verblieb für 60 min. auf den Schnitten. Schlussendlich wurde der Primärantikörper hinzugegeben. Dessen jeweilige Verdünnung richtete sich nach dem Antikörper und wurde in einem Gemisch (200 µl pro Slide) aus PBST und 1 % BSA berechnet. Der Primärantikörper verblieb über Nacht auf dem Gewebe bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder vier Mal mit PBST gewaschen, um den Primärantikörper wegzuwaschen. Anschließend wurde für eine Stunde der Sekundärantikörper (1 % BSA, 0,5 % Sekundärantikörper in PBST) hinzugegeben. Dessen Spezies richtete sich gegen das Fc-Fragment des jeweiligen Primärantikörpers. Er war mit Biotin assoziiert und verblieb für eine Stunde auf dem Gewebe. Nach erneutem Waschen wurde der AB-Komplex darauf gegeben. Dieser enthielt Streptavidin, welches mit Biotin eine Bindung eingehen konnte. Auch dies verblieb eine Stunde auf dem Komplex. Danach erfolgte ein weiterer Waschgang. Es wurde DAB (10 µl DAB in 3000 µl Diluent) auf die Schnitte gegeben.

Je nach Antikörper verblieb das DAB wenige Sekunden bis Minuten auf dem Gewebe (in unserer CD45 Färbung 10 sek.). Mikro- wie auch makroskopisch war eine Braunfärbung zu sehen. Diese Färbung kam durch die Oxidation des DABs zustande, das als Substrat der Peroxidase am Streptavidin wirkte. Die Reaktion konnte mit Wasser abgestoppt werden.

Die Schnitte wurden wieder mit PBST gewaschen. Abschließend stellte man sie für 30 sek. in Hämatoxylin, um eine Kernfärbung zu erreichen. Wie auch bei der HE Färbung wurden die Schnitte sechs Minuten gebläut, um den pH-Wert wieder zu erhöhen. Anschließend durchliefen die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe und wurden mit Roticlear entfettet. Sie wurden mit einem Eindeckglas abgedeckt und zum Trocknen gelegt.

2.2.32 Quantifizierung von CD45 in der IHC

Die Quantifizierung von CD45 erfolgte in Fiji 1.0, Image J (Madison). Zuerst wurde der Hintergrund des Bildes subtrahiert. Bei einer Aufnahme des Randbereichs des Pankreas wurde nur die zu sehende Pankreasfläche markiert. Ebenso wurden größere zystische Läsionen ausgeschnitten, sodass die Quantifizierung ausschließlich im Gewebe erfolgen konnte.

Zur Quantifizierung war es erforderlich, die gewünschten Bereiche stärker rot zu färben. Dafür wurde die entsprechende Farbwellenlänge gewählt, in der die positive IHC lag. In diesem Fall lag der zu färbende Bereich im bräunlichen, um so die positiv gefärbten Zellen zu detektieren. Durch die Rotfärbung war es für den Betrachter ersichtlich, welche Zellen gezählt wurden. Die Software berechnete die Fläche des immunhistochemisch eingefärbten Bereichs auf den vorher markierten Gesamtbereich.

2.2.33 Immunfluoreszenz in Zellen

Um in Zellen eine Immunfluoreszenz (IF) durchführen zu können, mussten die Zellen 24 h vorher in einem 6-Well ausgesät werden, sodass sie eine Konfluenz von 80 % erreichten. Auf dem Boden des 6-Wells wurde ein autoklaviertes Coversheet gelegt, welches nach dem Fixierungsvorgang in eine Box übertragen werden konnte.

Am Tag der Ernte wurden die einzelnen Wells mit PBS für fünf Minuten gewaschen. Anschließend fixierte man die Zellen für 15 min. mit Paraformaldehyd, sodass sie auf dem Coversheet haften blieben. Nach einem erneuten Waschvorgang mit dem PB-Puffer setzte man ein Gemisch aus 10 % NGS in 0,4 % Triton-PB Puffer an, welches für 90 min. bei 4°C auf den Zellen verblieb. Hierdurch wurden unspezifische Bindungen blockiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für fünf Minuten mit PB-Puffer gewaschen.

Bevor der Puffer im dritten Durchlauf abgesaugt wurde, wurden die Coversheets in eine Feuchtkammer überführt. In dieser lagen mehrere feuchte Membranen, die für ein nasses Klima sorgten. Die einzelnen Coversheets wurden so platziert, dass sie mit den Zellen nach oben zu liegen kamen. Der Primärantikörper wurde über Nacht auf die Zellen gegeben. Je nach Experiment wurde auf TNF α (1:200), IL6 (1:50), Cleaved Caspase 3 (1:200) und p65 (1:500) gefärbt. Bei einer Kofärbung wurden die Antikörper gemeinsam genutzt.

Der Antikörper wurde als Lösung mit 10 % NGS, PB-Triton-Puffer und 1,2 μ l des Antikörpers angesetzt. Es konnten auch zwei Antikörper gleichzeitig betrachtet werden, sofern ihre Sekundärantikörper verschiedenen Spezies (beispielsweise Maus und Hase) angehörten.

Am zweiten Tag wurde der Sekundärkörper dazugeben. Dieser sorgte am Ende für die Fluoreszenz. Da er lichtsensibel war, mussten die Reagiergefäße stets unter Alufolie verschlossen gehalten werden. Die Schnitte wurden sechsmal für fünf Minuten mit PB-Puffer gewaschen. Dann wurde das Gemisch aus den beiden Sekundärantikörpern (Mouse (red, abcam, 568 nm Wellenlänge) und Rabbit (green, abcam, 488 nm Wellenlänge)), 2 % NGS in PB-Triton dazugegeben. Die Zellen wurden für 90 min. darin inkubiert. Um die Kerne unspezifisch anzufärben wurde ein Gemisch mit DAPI (1:2000) in PB-Puffer erstellt. Bei DAPI handelte es sich um eine Diamidinphenylindol-Verbindung, die sich aufgrund ihrer chemischen Struktur vor allem in AT-reichen Regionen in der DNA anlagerte und so für eine blaue Kernfärbung sorgte. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und für zehn Minuten mit dem DAPI Gemisch versehen. Danach wurden sie erneut kurz gewaschen. Die Flüssigkeit musste gründlich abgesaugt werden. Nach dem letzten Waschen wurde der Immunomount Kleber auf einen Glasslide gegeben und die Coversheets mit den Zellen nach unten auf den Kleber gedrückt. Die Glasslides mussten für 30 min. trocknen, ehe die fertigen Stücke bei 4°C

gelagert werden konnten. Zum längeren Erhalt der Färbung sollten die Slides längerfristig bei -20°C weggefroren werden.

2.2.34 Quantifizierung der Immunfluoreszenzen

Die Immunfluoreszenzen wurden am konfokalen Mikroskop (IX81, Olympus) begutachtet. Hierbei mussten die Bilder so eingestellt werden, dass ein scharfes Bild entstand. Der Maus-Sekundärantikörper hatte eine Wellenlänge von 568 nm, der Kaninchen-Sekundärantikörper von 488 nm und DAPI von 358 nm.

Mit drei verschiedenfarbigen Lasern konnten Fluoreszenzaufnahmen erstellt werden. Hierbei war es wichtig, dass die Hintergrundstrahlung besonders gering war, die Laserstrahlung sollte auf das kleinstmögliche Maß genormt werden. Die Bilder wurden einzeln je nach Laser aufgetrennt und als Gesamtbild gespeichert. Anschließend wurde mit Fiji die Zahl der gefärbten Zytoplasmas an der Menge der Gesamtkerne bewertet.

2.2.35 Zytokin-ELISA

Der Zytokin-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) diente der Bestimmung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand. Deren Konzentration konnte photooptisch mithilfe des 16-Plex Mouse Cytokine Detektion Kit (Quansys Bioscience) gemessen werden. Das Messprinzip basierte auf einem Sandwich ELISA. Der ELISA war ein Nachweisverfahren, das 1971 entwickelt wurde (Engvall und Perlmann 1971). Wie der vorher verwendete Radioimmun-Assay konnte die Konzentration verschiedener Substrate bestimmt werden. Der Name Sandwich-ELISA entstand aufgrund des mehrschrittigen Bindungsprozesses. So band das zu messende Substrat an Antikörper im Reaktionsgefäß. Durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, der sowohl dieses Substrat wie einen messbaren Stoff beinhaltet, konnte auf die ursprüngliche Substratkonzentration geschlossen werden (Engvall und Perlmann 1971).

Zur Zytokinbestimmung im Überstand der L3.6-Zellen wurden diese für 24 h mit einer Zellzahl von 300.000 in einer Sixwell-Platte ausgesäht. Nach 24 h erfolgte der Wechsel des Mediums von MEM mit 10 % FCS zu MEM mit 1 % FCS. Da das FCS an sich zytokinhaltig war, sollte eine Konzentrationsverschiebung durch dieses möglichst geringgehalten werden. Nach 48 h erfolgte dann die Entnahme des Zellüberstandes zur Zytokinbestimmung.

Das verwendete Kit konnte vom Hersteller nach Analysewünschen zusammengestellt werden. Bei uns im Labor wurde der Boden des Kits mit folgenden Target-Antikörper bestückt: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, CCL5, GM-CSF, IFN γ , MCP-1, MIP-1 α , und TNF α . An diese Antikörper konnte das Target-Protein binden. Durch ein biotinylierten Detektions-

Antikörper konnte die Sensitivität der Messung erhöht werden. Durch die anschließende Bindung von Streptavidin-HRP und eines chemilumineszierenden Substrats kann photometrisch die Bindungshäufigkeit gemessen werden. Dieses erlaubte den Rückschluss auf die Konzentration des Substrats. Zur Vorbereitung der Messung wurde eine Kalibrationsreihe erstellt. Der Kalibrator diente hierbei als Positivkontrolle. Die Kalibrationsreihe bestand aus sechs Wells, in denen der Kalibrator absteigend 1:3 mit Sample Diluent verdünnt wurde. Das Sample Diluent selbst diente somit als Negativkontrolle. Neben den normalen Proben wurde weiterhin 1 %iges FCS aufgetragen, um den FCS Effekt an sich zu messen. Der Zellüberstand wurde drei Minuten bei 1350 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 50 µl der Kalibrationsreihe und der Proben aufgetragen. Dies erfolgte stets in Dreifachbestimmung. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und eine Stunde bei RT im Orbitalschüttler „Thermomixer comfort“ mit 500 rpm inkubiert. Danach wurde die Folie entfernt und die Platte drei Mal mit dem im Kit enthaltenden Waschpuffer gewaschen. Dabei erfolgte die Zugabe von 100 µl Waschpuffer pro Well mit der Multichannelpipette. Dann wurden pro Well 50 µl des Detection Mix biotinylierten Detektions-Antikörper zugegeben. Erneut erfolgte der Verschluss mit einer Folie und die Inkubation für 1 h bei RT im Orbitalschüttler bei 500 rpm. Schließlich wurde die Platte erneut gewaschen und 50 µl Streptavidin-HRP Komplex aufgetragen. Dieser inkubierte für 15 min. unter den gleichen Inkubationsbedingungen. Gleichzeitig erfolgte die Substratherstellung aus Peroxidase und dem Signalenhancer im Verhältnis 1:1. Hierbei war ein stetiger Lichtschutz zu beachten, damit der Signalenhancer seine Funktion nicht einbüßte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde sechs Mal gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl Substrat. Nach 15 min. wurde die Chemilumineszenz im ChemiDoc „XRS+“ gemessen und mit der Image-Labv 5.2.1 Software entwickelt. Die Messzeit lag hierbei zwischen 30 und 300 sek. Mithilfe der Q-View-Software erfolgte die Konzentrationsberechnung.

2.2.36 Supernatant-Assay

Mithilfe des Supernatant-Assays sollte indirekt die Zytokinproduktion verschiedener Zellklone untersucht werden. Das Readout basierte auf der Funktion des Luciferase-Reporter-Assays (2.2.18). So sollte die Transaktivierung eines Promoters, in diesem Fall NF- κ B-responsiven Promoters, gemessen werden.

Dazu wurden 70.000 Zellen pro Well in einer 24-Well Platte ausgesät. Zusätzlich wurden als Donorzellen für das Medium 300.000 Zellen pro Well in einer Sixwell-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium vom 10 % FCS zu 1 % FCS gewechselt, um eventuelle Effekte durch die Zytokine im FCS zu unterbinden. Zusätzlich wurde in das Medium der 24-Well-Platte das Transkript mit dem NF- κ B responsiven Promoter sowie Renilla eingebracht (2.2.18)

Tabelle 33: Modellskizze zur Zellbehandlung im Überstandsexperiment

Cas9 Kontrolle	Cas9 Kontrolle	Cas9 Kontrolle
Cas9 Kontrolle + 30 min. Sp der Cas9 ARID1A	Cas9 Kontrolle + 30 min. Sp der Cas9 ARID1A Kontrolle	Cas9 Kontrolle + 30 min. Sp der Cas9 ARID1A

Sp= *Supernatant* (Überstand)

Nach weiteren 24 h wurde das Medium der Donorzellen geerntet und in Epis bei 4°C gelagert. Um die in Apoptose gegangenen Zellen aus dem Überstand zu entfernen, wurden diese 3 min. bei 1350 rpm zentrifugiert. Der Mediumsüberstand wurde bei RT gelagert. Die Donorzellen wurden zur RNA-Isolation in Trizol geerntet. Das Medium der ersten Donorzellen wurde für 30 min. in Dreifachbestimmung auf die ersten drei Wells gegeben. Dabei wurde sowohl der Überstand der Knock-Out Zellen wie der Kontrollklone aufgetragen. In den entsprechenden Zeitintervallen erfolgte das Auftragen des restlichen Überstandes. Anschließend wurde der Reporter-Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Graph Pad Prism7. Aufgrund der geringen Zahl an Stichproben, die aus der Dreifachbestimmung in der qRT-PCR resultierten, wurde mit dem modifizierten t-Test mit Welch-Korrekturfaktor gerechnet (Ruxton 2006; Goni et al. 2009). Die Stichproben wurden als unverbunden betrachtet. Unter der Voraussetzung, dass die Werte einer qRT-PCR, sowie eines Reporter-Assays normalverteilt sind, wurde ein parametrischer Test, zweiseitiger mit ungleicher Varianz gewählt. Da die Quantifizierung der Immunfluoreszenzen nicht zwangsläufig als normalverteilt angenommen werden konnte, wurde hier ein Mann-Whitney U Test durchgeführt. Die jeweiligen p-Werte wurden nach gängigem Schema:

ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$ aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Der *ARID1A*-Verlust führt zu verstärkter Karzinogenese und Inflammation

Um die Bedeutung von *ARID1A* in der *Kras*^{G12D}-vermittelten PDAC Entstehung und Progression zu untersuchen, wurden *Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D}; *p48Cre* (*Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D}, AKC) Mäuse mit konditionaler *Arid1a*-Defizienz und onkogener Aktivierung von *Kras* gezüchtet (mithilfe von Zhe Zhang, PhD-Doktorandin in der AG Hessmann). In der Immunhistochemie (IHC) konnte dieser K.O. bestätigt werden, da sich hier keine Immunreaktion mit einem *Arid1a*-Antikörper zeigte (Abbildung 6).

Die *Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D} Mäuse wiesen eine deutlich beschleunigte Karzinogenese im Vergleich zu den *Kras*^{G12D}; *p48Cre* (*Kras*^{G12D}, KC) Vergleichstieren auf. Es zeigten bereits vier Wochen alte Tiere eine starke Formation von Tumorvorläuferläsionen wie ADMs und PanINs (Abbildung 7). Mit steigendem Alter der Mäuse verstärkte sich diese Tendenz. Außerdem zeigte sich ein zystenreiches Pankreas in den Mäusen mit einem *Arid1a* K.O. Des Weiteren fiel eine vermehrte Stromabildung mit einer erhöhten Zellkonzentration in den K.O. Mäuse auf (Abbildung 7).

Eine Untersuchung über 12 Wochen hinausgehend war nicht möglich, da die *Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D} Mäuse aufgrund von Pankreasinsuffizienz mit Symptomen wie z. B. Diabetes frühzeitig verstarben oder aufgrund der vorher definierten Abbruchkriterien getötet werden mussten. Keine *Arid1a*^{fl/fl}; *Kras*^{G12D} Maus überlebte länger als drei Monate, weshalb keine Aussage über die Tumorzinzidenz in diesem Modell gemacht werden konnte. Die Tierversuche erfolgten nach den Regularien der Zentralen Tierexperimentellen Haltung der UMG und wurden vom Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt (33.9-42502-04-14/1634).

Arid1a

Abbildung 6: In der IHC bestätigte sich der *Arid1a* K.O. Arid1a IHC in histologischen Schnittpräparaten der Pankreata 12 Wochen alter *Kras^{G12D}* und *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Mäuse. Es findet sich keine Anfärbung von ARID1A in den *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Schnitten.

H&E

H&E

Abbildung 7: *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Mäuse weisen im Vergleich zu *Kras^{G12D}* Mäusen eine verstärkte Läsionenbildung auf. Repräsentative HE-Färbung des Pankreas in *Kras^{G12D}* und *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Mäusen verschiedener Altersgruppen

Die erhöhte Zellinfiltration in den K.O. Mäusen wurde mithilfe einer IHC auf CD45 untersucht. CD45 ist ein unspezifischer Immunmarker, der sich auf der Oberfläche von allen Leukozyten exprimiert wird. Im histologischen Schnittpräparat zeigte sich in der jüngsten Kohorte (4 - 5 Wochen) ein erhöhter Anteil an CD45 positiven Zellen in den *Arid1a* ^{β/β} ; *Kras*^{G12D} Mäusen im Vergleich zu den *Arid1a* Wildtyp-Mäusen. In der mittleren Kohorte (6 - 8 Wochen) stieg der Anteil an CD45 positiven Zellen in den *Arid1a* ^{β/β} ; *Kras*^{G12D} Mäusen stark an. Der Anteil CD45 positiver Zellen war bei den *Kras*^{G12D} Mäusen in allen Alterskohorten vergleichbar. Insbesondere zeigte der Vergleich zwischen den Genotypen einen signifikant erhöhten Anteil CD45-positiver Zellen in den 6 - 8, sowie den 12 Wochen alten *Arid1a* ^{β/β} ; *Kras*^{G12D} im Vergleich zu den *Kras*^{G12D} Mäusen (Abbildung 8). Eine Gruppe höheren Alters konnte nicht gebildet werden, da die *Arid1a* ^{β/β} ; *Kras*^{G12D} Mäuse nicht länger überlebten.

Der Verlust von *Arid1a* scheint die Anzahl an CD45 tragenden Entzündungszellen positiv zu beeinflussen. Der Alterungsprozess hatte in den *Kras*^{G12D} Mäusen keinen großen Einfluss auf die Entzündung. In den *Arid1a* ^{β/β} ; *Kras*^{G12D} Mäusen fand sich in einem fortgeschrittenen Alter mehr Inflammation. Die Tiere zeigten mit steigendem Alter mehr Läsionen, wohingegen sich in den *Kras*^{G12D} Mäusen kaum Karzinogenese abzeichnete. Der Verlust von *Arid1a* scheint in den Tieren einen positiven Einfluss auf Inflammation zu haben, welche mit Tumorfomation einhergeht.

Abbildung 8: *Arid1a* defiziente Mäuse weisen mehr Immunzellinfiltration auf. a: Repräsentative CD45 IHC in KC und AKC Mäusen b: Quantifizierung der IHC gegen CD45; Die Mäuse sind gruppiert nach dem Alter (4-5 Wo.: je 3 Mäuse pro Genotyp, 6-8 Wo.: 3 Mäuse pro Genotyp, 12 Wo.: 3 *Kras^{G12D}* und 2 *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Mäuse). Die Quantifizierung erfolgte mithilfe von Image J. Hierzu wurde das gesamte Pankreas in 10facher Vergrößerung unter dem Mikroskop aufgenommen. Die eingefärbten Flächen wurden mithilfe der Farberkennung durch Image J ermittelt und die gefärbte Fläche auf die Gesamtfläche des Pankreas normiert. ** :p < 0,01, *** :p < 0,001

Die Pankreaskarzinogenese im Kontext der *Arid1a*-Defizienz geht demnach mit einer vermehrten inflammatorischen Reaktion einher. Es ist zu vermuten, dass die *Arid1a*-Defizienz in den pankreatischen Epithelzellen die Expression und/oder Sezernierung proinflammatorischer Zytokine erhöht und somit zu einer vermehrten Rekrutierung inflammatorischer Zellen führt.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden humane (L3.6) PDAC Zellen, sowie primäre PDAC Zellen aus *Kras*^{G12D}; *p53*^{R172H} (des Weiteren als KPC bezeichnet) Mäusen mit und ohne Knock-Out (CRISPR/Cas9) von *ARID1A* verwendet. Der Knock-Out konnte jeweils im WB bestätigt werden (Abbildung 9).

Abbildung 9: Ein CRISPR/Cas9 *ARID1A* K.O. wurde in zwei Zelllinien durchgeführt. a+c: WB in der humanen L3.6 Zelllinie (a) und der murinen KPC Zelllinie (c), b+d: Zellwachstum der L3.6-Zellen (b) und KPC-Zellen (d) unter dem Lichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung. Es handelt sich um eine ausgewählte Aufnahme eines Triplikats.

Um zu überprüfen, ob die verstärkte Inflammation mit einer gesteigerten Zytokinexpression einhergeht, wurden verschiedene inflammatorische Zytokine untersucht. IL6 und TNF α sind häufig beschriebene entzündungstriggernde Zytokine, weshalb diese fokussiert betrachtet wurden. Dazu wurde mRNA aus den L3.6- und KPC-Zellen isoliert. Auf mRNA-Ebene ließ sich der *ARID1A* K.O. bestätigen. Es zeigte sich sowohl in den humanen Zellen wie auch in den murinen Zellen eine signifikant erhöhte Expression von IL6 und TNF α (Abbildung 10).

Abbildung 10: Der K.O. führt auf mRNA-Ebene zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Zytokine. qRT-PCR in den L3.6-Zellen (a) und KPC-Zellen (b) normalisiert auf XS13 nach 24 h Wachstumszeit ohne spezifische Behandlung. Es handelt sich um die Auswahl eines repräsentativen Triplikats.
 *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

Um die ARID1A-abhängige Expression der inflammatorischen Zytokine einschätzen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der inflammatorischen Zytokine IL6 und TNF α durchgeführt. Die von der Tumorzelle exprimierte Zytokine befinden sich vor der Sezernierung im Zytoplasma, in dem sie durch die IF sichtbar gemacht werden können. In den L3.6-Zellen zeigte sich eine erhöhte Expression von IL6 in den ARID1A K.O. Klonen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (Abbildung 11). Auch wenn der Anteil von TNF α nur einen Trend zeigte, so war die Erhöhung von IL6 signifikant (Abbildung 11).

Abbildung 11: Die Sekretion von IL6 und TNF α in den K.O. Zellen war erhöht.

a+b: IF auf TNF α (a) und IL6 (b) in nativen L3.6-Zellen; Dafür wurden die Zellen für 24 h im Zellinkubator belassen und anschließend fixiert und gefärbt.; c+d: Quantifizierung der IF mithilfe von ImageJ; Die Quantifizierung erfolgte an jeweils zehn exemplarisch unter dem Mikroskop ausgewählten Bildern. Es wurde die Menge der positiv gefärbten Zellen auf die Anzahl der durch Dapi gefärbten Gesamtexpression bestimmt. ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$

Nachdem sich für $\text{TNF}\alpha$ keine ARID1A-abhängigen Expressionsunterschiede ergaben, wurde der Fokus der folgenden Experimente auf IL6 gelegt. Die IL6 Expression war in den KPC-Zellen in den Arid1a K.O. Klonen im Gegensatz zu den L3.6-Zellen nicht signifikant erhöht (Abbildung 11,12).

Abbildung 12: Eine erhöhte Sezernierung von IL6 in den KPC zeigte sich nicht. a: IF auf IL6 in nativen KPC-Zellen. Dafür wurden die Zellen für 24 h im Zellinkubator belassen und anschließend fixiert und gefärbt; b: Quantifizierung der IF mithilfe von Image J. Es wurden die Anzahl der IL6 positiven Zellen auf die Gesamtexpression, der durch Dapi gefärbten Zellen in zehn repräsentativ unter den Mikroskop ausgewählten Bildern normiert. Ein repräsentatives Duplikat wurde ausgewählt.

Zytokine wie IL6 werden in den Überstand der Zellen sezerniert und abgegeben. Eine IF stellt eine Momentaufnahme der Zytokinexpression da. Es lässt sich somit nicht sicher ausschließen, dass TNF α in den L3.6-Zellen doch erhöht exprimiert wird, dies in der IF aber nicht darzustellen war. Um die Ergebnisse der IF hinsichtlich IL6 zu bestätigen und TNF α erneut zu untersuchen, wurde der Überstand der L3.6 K.O. Zellen mit den Wildtyp-Zellen auf ein erhöhtes Vorkommen von IL6 und TNF α hin untersucht. Der Überstand wurde im ELISA auf seine Zytokinzusammensetzung hin untersucht. Auch hier zeigte sich ein erhöhter Anteil der inflammatorischen Zytokine, IL6 und TNF α , im K.O. Klon, allerdings schwankten die Werte zwischen den Messungen sehr, sodass sich eine große Standardabweichung ergab und die ARID1A-Status abhängigen Expressionsunterschiede nicht signifikant werden (Abbildung 13). Dennoch scheint die Defizienz von ARID1A die Expression und Sezernierung inflammatorischer Botenstoffe positiv zu beeinflussen.

Abbildung 13: Die Konzentration inflammatorischer Zytokine ist im *ARID1A* K.O. Klon erhöht. ELISA im Überstand von L3.6-Zellen auf IL6 und TNF α . Die Zellen waren 24 h vorher in 10 % FCS Medium ausgesät worden und das Medium nach 24 h zu 1 %igem FCS gewechselt und für weitere 24 h inkubiert worden. Anschließend erfolgte die Messung. ns: $p > 0,05$

Um zu untersuchen, ob auch ein transienter *ARID1A* K.O. ausreichend ist, um die Transkription und damit Expression von Zytokinen zu beeinflussen, wurde ein siRNA vermittelter Knock-Down in den L3.6- und KPC-Zellen durchgeführt.

Die Expression von *ARID1A* wurde, wie in der qRT-PCR zu sehen, signifikant vermindert (Abbildung 14 a). Es konnte gezeigt werden, dass auch der K.D. von *ARID1A* einen Einfluss auf die Zytokinexpression hat. Der IL6 expremierende Anteil der mRNA war in den Zellen mit einem geringeren *ARID1A*-Anteil gering erhöht. Im Unterschied zum K.O. war dieser in den L3.6-Zellen

nicht signifikant, wenn auch erhöht (Abbildung 14a). Die KPC-Zellen wiesen einen signifikanten IL6 Anstieg auf (Abbildung 14b).

Eine posttranskriptionelle Herabregulierung von ARID1A beeinflusst demnach positiv die mRNA-Expression von IL6. Wie zuvor zeigten sich Unterschiede zwischen den Zellarten, dennoch lässt sich bestätigen, dass die *ARID1A*-Defizienz positiv mit einer gesteigerten Expression und Sezernierung der Zytokine IL6 und TNF α korreliert und damit ggf. inflammatorische Prozesse fördert.

Abbildung 14: Der Einfluss der *ARID1A*-Defizienz zeigt sich abgeschwächt in einem transienten Knock-Down. qRT-PCR auf inflammatorische Zytokine in L3.6-Zellen (a) und KPC-Zellen (b) mit siRNA vermitteltem *ARID1A* K.D. Nach 24 h Aussaat wurde lipofectaminvermittelt die siRNA in den Zellkern eingebracht und verblieb dort für weitere 48 h. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die mRNA isoliert. Bei den gezeigten Ergebnissen handelt es sich um repräsentative Beispiele eines Triplikats.
ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$

3.2 *ARID1A* und der NF- κ B-Signalweg

Um zu zeigen, dass die *ARID1A*-Defizienz einen Einfluss auf inflammatorische Signalkaskaden hat, fokussierten sich die folgenden Experimente auf den NF- κ B-Signalweg. Bei diesem handelt es sich um einen der Signalwege, der durch die vermehrte Sezernierung proinflammatorischer Botenstoffe aktiviert wird. Er besteht aus zahlreichen Untereinheiten, die jeweils durch Phosphorylierung aktiviert werden. Eine stärkere Phosphorylierung findet sich vor allem bei I κ B α . Diese inhibitorische Einheit verhindert, dass NF- κ B in den Zellkern transloziert und an die DNA bindet (King et al. 2011; Milanovic et al. 2014). Eine starke Phosphorylierung sorgt für die Ubiquitinierung der inhibitorischen Einheit und damit für deren Abbau. NF- κ B liegt damit frei im Zytosol vor. Posttranskriptionell kann es phosphoryliert und in den Nukleus verlagert werden (King et al. 2011; Milanovic et al. 2014).

Wie gezeigt wurde, hat die *ARID1A*-Defizienz einen positiven Einfluss auf die Expression und Sezernierung inflammatorischer Botenstoffe. Der NF- κ B-Signalweg soll als Beispiel für einen inflammatorischen Signalweg dienen, der durch den Verlust von *ARID1A* reguliert wird. Im Western Blot zeigten sich *ARID1A* abhängige Expressionsunterschiede verschiedener Komponenten des NF- κ B-Signalwegs (Abbildung 15). IKK α als erste phosphorylierende Kinase wies in den L3.6-Zellen keine verstärkte Expression auf. Auch im phosphorylierten Zustand finden sich kaum Unterschiede. Im Gegensatz dazu zeigte sich die inhibitorische Einheit I κ B α im K.O. Klon der Zellen vermehrt phosphoryliert. Wie beschrieben führt diese Phosphorylierung zu einer Ubiquitinierung und damit zum Abbau des Inhibitors. Dies führt zu einem verstärkten Freiwerden der folgenden Untereinheit, genannt p65. Liegt diese frei im Zytosol vor, kann sie phosphoryliert werden und in den Kern gelangen (Milanovic et al. 2014). Bei dieser Untereinheit zeigte sich der Unterschied am stärksten. Im Kontrollklon lag fast kein phosphoryliertes p65 vor, was auf eine geringe Aktivierung des Signalwegs schließen lässt. Dies impliziert, dass der NF- κ B-Signalweg im Kontext einer *ARID1A*-Defizienz stärker aktiv ist.

Abbildung 15: Ein Verlust von *ARID1A* führt zur verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. WB auf Untereinheiten des NF- κ B-Signalwegs in L3.6-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h ausgesät und nativ lysiert. Der gezeigte WB ist ein ausgewähltes Beispiel eines Triplikats.

Um die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs weiter zu beleuchten, wurde eine qtRT-PCR durchgeführt. Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine verstärkte Expression von Zielgenen des NF- κ B-Signalwegs. Sowohl NF- κ BiA wie auch CCL20 werden durch die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs stärker exprimiert. Bei NF- κ BiA handelt es sich um eine inhibitorische Einheit, die im Sinne eines negativen Feedback-loops den NF- κ B-Signalweg selbst reguliert. CCL20 übernimmt chemotaktische Funktionen (Battaglia et al. 2008). Beide Zielgene zeigen in den *ARID1A* K.O. Klonen eine vermehrte Expression. Auch dies deutet auf eine verstärkte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bei einer *ARID1A*-Defizienz hin. In den KPC-Zellen zeigt sich die verstärkte Expression nur bei CCL20, was die bisher gezeigten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien widerspiegelt (Abbildung 16).

Abbildung 16: Auf mRNA-Ebene ist die Expression von NF- κ B Zielgenen verstärkt. qRT-PCR auf NF- κ B Zielgene in (a) L3.6 und (b) KPC-Zellen nach 24 h Aussaat ohne Behandlung. Es handelt sich um ein Beispiel eines Triplikats. ns: $p > 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

Auf Protein-Ebene und mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass eine ARID1A-Defizienz zu einer stärkeren Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt. Um zu untersuchen, ob die verstärkte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs auch eine Transaktivierung NF- κ B-responsiver Promotoren zur Folge hat, wurde ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. In einem Reporter-Assay werden Promotoren verwendet, die an eine Luciferase gekoppelt sind. Werden die Promotoren transaktiviert, wird die nachgeschaltete Luciferase ebenfalls aktiviert. Die Intensität des fluoreszierenden Signals kann detektiert werden und erlaubt somit Rückschlüsse auf den Transaktivierungsgrad des Reporter-Konstrukts. Hier wurde ein NF- κ B responsiver Promoter verwendet. In den L3.6-Zellen und KPC-Zellen wurde untersucht, wie sich die ARID1A-Defizienz auf die Aktivierung dieses Promotors auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transaktivierung in den K.O. Zellen deutlich gesteigert war (Abbildung 17).

Abbildung 17: Eine *ARID1A*-Defizienz führt zur erhöhten Transaktivierung eines NF-κB responsiven Promoters. Luciferase Assay mit einem NF-κB responsiven Promoter in (a) L3.6-Zellen und (b) KPC-Zellen. 24 h nach Aussaat wurde lipofectamin vermittelt das Reporte-Konstrukt in die Zellen gebracht und nach weiteren 24 h die Luciferase-Aktivität gemessen. Es handelt sich hier um den Mittelwert aus drei Triplikaten pro Experiment. Das Ergebnis konnte drei Mal auf diese Weise dargestellt werden. Zu sehen ist hier ein repräsentatives Beispiel.

In Abbildung 10 und Abbildung 14 konnte demonstriert werden, dass es Unterschiede zwischen dem inflammationssteigernden Effekten in den K.O. Zellen im Gegensatz zu den K.D. Zellen gibt. Um den Einfluss von *ARID1A* auf die Transaktivierung des NF-κB responsiven Promoters zu validieren, wurde ein *ARID1A* Konstrukt in die *ARID1A* K.O. Zellen eingebracht und *ARID1A* damit reexprimiert. Hier zeigte sich ein dosisabhängiger Abfall der Promotertransaktivierung nach *ARID1A*-Reexpression (Abbildung 18). Dies stützt die These, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer *ARID1A*-Defizienz und einer verstärkten Aktivierung des NF-κB-Signalwegs vorliegt.

Abbildung 18: Nach Reexpression von *ARID1A* sinkt die Transaktivierung des NF- κ B responsiven Promoters dosisabhängig. Luciferase Assay mit einem NF- κ B responsiver Promoter in L3.6-Zellen unter Reexpression von *ARID1A*. Die Zellen wurden für 24 h ausgesät. Die Reexpression (+: 200 ng, ++: 400 ng, +++: 600 ng des *ARID1A* Konstrukts) erfolgte mithilfe von Lipofectamin und einem *ARID1A*-Konstrukt über 24 h. Dargestellt sind die Mittelwerte eines Triplikats. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Durchgang erneut bestätigt werden. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Der Zusammenhang zwischen dem Verlust von *ARID1A* und der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs sollte genauer beleuchtet werden. p65 ist eine wichtige Untereinheit im NF- κ B-Signalweg. Zusammen mit p50 transloziert p65 in den Nukleus und bindet hier an die DNA. Um die *ARID1A*-Status abhängige p65 Expression zu vergleichen, wurde die relative p65 Expression in einer IF bestimmt. Während sich die *ARID1A* positiven und negativen Zellklone hinsichtlich ihrer Gesamtexpression von p65 nicht unterschieden, zeigten sich Unterschiede in der nukleären Expression von p65. So fand sich eine vermehrte nukleäre Expression von p65 in den *ARID1A* K.O. Zellen. Die nukleäre Translokation von p65 findet erst nach vorheriger Phosphorylierung der inhibierenden Kinase von p65 statt. Die Daten weisen also darauf hin, dass eine *ARID1A*-Defizienz mit einer vermehrten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs einhergeht.

Abbildung 19: In der IF zeigte sich ein erhöhter Anteil von p65 im Kern der *ARID1A* K.O. Zellen.

a: IF in L3.6 mit Dapi und p65 behandelt mit DMSO für 3 h als Nativkontrolle, b: Quantifizierung der IF mit Differenzierung zwischen p65 Lokalisation im Kern und im Zytoplasma mithilfe von ImageJ.

****: $p < 0,0001$. Unter dem Mikroskop wurden zehn repräsentative Aufnahmen der Färbung quantifiziert und auf die Anzahl der durch Dapi gefärbten Nukleii normiert.

Da der NF- κ B-Signalweg zur Transkription inflammatorischer Zytokine wie IL6 führt, wurde der Zusammenhang zwischen IL6 und p65 im Hinblick auf eine eventuelle Aktivierung von NF- κ B durch IL6 (Libermann und Baltimore 1990) untersucht.

Dafür wurden KPC-Zellen ausgesät, fixiert und eine Immunfluoreszenz-Kofärbung von p65 und IL6 vorgenommen. In der Darstellung des p65 ließ sich jeweils zwischen Kern- und Zytoplasmalokalisation differenzieren. Im Gegensatz zu den L3.6-Zellen zeigte sich in den KPC-Zellen eine erhöhte Gesamtexpression von p65 in den *ARID1A* K.O. Zellen. Im Kern hingegen waren keine signifikanten *ARID1A*-abhängigen Unterschiede ersichtlich. Dies spiegelt die schon vorher gezeigten Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen wider. Eine Kolokalisation von p65 und IL6 fand sich, wenn auch nicht signifikant, in den *ARID1A* K.O. Zellen.

Abbildung 20: Die p65 Lokalisation zeigte sich in den KPC-Zellen vom *Arid1a*-Status unabhängig.

a: IF in KPC-Zellen mit Dapi, p65 und IL6. Die Zellen waren für 24 h ausgesät und anschließend fixiert und gefärbt worden. b + c: Quantifizierung der IF. Unter dem Mikroskop wurden zehn repräsentative Aufnahmen ausgewertet. In b) hinsichtlich der p65 Lokalisation. In c) wurde bestimmt, wie häufig p65 und IL6 insgesamt kolokalisiert waren. Dies wurde auf die durch Dapi gefärbte Gesamtexpression bezogen.

ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

3.3 Die ARID1A-Defizienz beeinflusst auch andere Signalwege

Auch andere Signalwege triggern Inflammation. IL6 aktiviert den inflammatorischen JAK-STAT-Signalweg (Corcoran et al. 2011). Die Aktivierung des Signalwegs führt zu einer STAT3-Phosphorylierung an Tyrosin 705 (Tyr 705) und somit zu einer stärkeren transkriptionellen Aktivität des Faktors. Auch dieser Signalweg mündet in der Transkription inflammatorischer Gene. Wie bereits gezeigt werden konnte, wird die IL6 Expression und Sezernierung durch den Verlust von ARID1A gesteigert. Wir vermuteten daher, dass sich als Konsequenz der erhöhten IL6 Expression in den ARID1A-defizienten Zellen auch eine starke Phosphorylierung von STAT3 zeigt. Um dies zu untersuchen, wurden die Pankreata von *Kras^{G12D}* und *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Mäusen verglichen. Als Negativkontrolle für die IHC wurden *STAT3^{-/-}; NFATc1^{+/-wt}; Kras^{G12D}; p48-Cre* (KNS) Mäuse untersucht. Nach STAT3-Depletion zeigte sich in den Epithelzellen des Pankreas keine pSTAT3 (Tyr705) Färbung, wohingegen die Immunzellen positiv imponierten. Im Gewebeschnitt zeigte sich eine verstärkte Anfärbung von pSTAT3 (Tyr 705) in den Epithelzellen der *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* Tiere im Vergleich zu den *Kras^{G12D}* Mäusen (Abbildung 21). Dies unterstützt die Hypothese, dass in den *ARID1A* K.O. Mäusen der JAK-STAT-Signalweg verstärkt aktiviert wird und somit mehr pSTAT3 vorliegt.

Abbildung 21: In den *ARID1A* K.O. Mäusen zeigt sich eine vermehrte pSTAT3-Färbung. p(Tyr 705)STAT3 IHC in Mäusen mit einer *Kras^{G12D}* Mutation sowie entweder *Arid1a^{fl/fl}; Kras^{G12D}* oder einer *STAT3^{-/-}; NFATc1^{+/-wt}; Kras^{G12D}; p48-Cre* Mutation im Alter von acht Wochen. STAT3 zu erkennen in dunkelbraun. Es handelt sich um repräsentativ unter dem Mikroskop ausgewählte Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

Die erhöhte pSTAT3-Expression und damit Aktivierung des Signalwegs im Kontext der ARID1A-Defizienz konnte im WB reproduziert werden (Abbildung 22a). Die Expression von STAT3 zeigte keine großen Unterschiede zwischen den Zellklonen. Dies ließ sich auch auf mRNA-Ebene reproduzieren (Abbildung 22b). Die Unterschiede in der Phosphorylierung des Tyr 705 des STAT3s scheinen somit ausschließlich einer erhöhten Signalwegaktivierung zuzuschreiben zu sein.

Abbildung 22: In den ARID1A K.O. Klonen zeigte sich die Phosphorylierung am Tyr 705 von STAT3 vermehrt. a: Western Blot durchgeführt in nativen L3.6-Zellen. Die Ernte erfolgte 24 h nach Zellaussaat ohne Behandlung. Es handelt sich um eines von drei durchgeführten Ergebnissen mit gleichem Resultat b: qRT-PCR auf *STAT3* in L3.6. Dargestellt ist der Mittelwert eines Triplikats normalisiert auf GAPDH. Dieses Ergebnis wurde zwei Mal reproduziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel. ns: $p > 0,05$

Sowohl *in vivo* wie *in vitro* ließ sich zeigen, dass eine ARID1A-Defizienz zu einer gesteigerten Expression und Sezernierung von ausgewählten Zytokinen führt und dadurch inflammatorische Signalkaskaden aktiviert werden. Beispielfhaft konnte dies für den NF- κ B-, sowie den JAK-STAT-Signalweg gezeigt werden.

3.4 Die vermehrte Zytokinsezernierung ist Folge der vermehrten Signalwegaktivierung durch die ARID1A-Defizienz

Um zu untersuchen, ob das sezernierte Zytokinexpressionsprofil ARID1A-defizienter PDAC Zellen für die vermehrte Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskaden in ARID1A negativen PDAC Zellen verantwortlich ist, wurde erneut ein Reporter-Assay mit einem NF- κ B-responsiven Promoter durchgeführt. Basierend auf unseren Ergebnissen vermuteten wir, dass eine ARID1A-Defizienz in einer gesteigerten Zytokinsezernierung in den Zellüberstand resultiert. Durch die Inkubation mit konditioniertem Medium aus ARID1A depletierten Zellen kann die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in ARID1A positiven Zellen der Aktivierung in K.O. Zellen angeglichen werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden L3.6 Wildtyp PDAC Zellen mit basal niedriger NF- κ B-Aktivität mit nativem und konditioniertem Medium positiver und negativer ARID1A-defizienter Zellen behandelt. Durch die Inkubation des Mediums auf den Zellen sollte das konditionierte Medium eine höhere Konzentration an Zytokinen enthalten und damit zu einer stärkeren Transaktivierung des NF- κ B responsiven Promoters führen. Im Vergleich zu der Inkubation mit konditioniertem Medium aus ARID1A-Wildtyp Zellen konnte in den ARID1A-Wildtyp Zellen durch Inkubation mit konditioniertem Medium aus *ARID1A* K.O. Zellen eine Zunahme der Transaktivierung des NF- κ B-responsiven Promoters erzielt werden.

Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass der Verlust von ARID1A zu einer gesteigerten Zytokinsekretion führt, welche den NF- κ B-Signalweg aktivieren.

Abbildung 23: Der Überstand der *ARID1A* K.O. Zellen führt zu einer verstärkten Transaktivierung eines NF- κ B responsiven Promoter. a: Luciferase Assay mit einem NF- κ B responsiven Promoter nach Konditionierung mit dem Überstand von *ARID1A* defizienten Zellen. Es handelt sich hierbei um den Mittelwert eines Triplikats. Das gezeigte Ergebnis wurde zwei Mal reproduziert. b: Schema zum Versuch. Die Zellen wurden für 24 h in 10 % FCS haltigem Medium ausgesäht. Nach 24 h wurde das Medium zu 1 % FCS haltigem gewechselt, um Effekte durch das FCS zu minimieren. Gleichzeitig wurde das Reporter Konstrukt eingebracht. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium gesammelt und für 30 min. auf die mit dem Reporter transfizierten Zellen gegeben. Anschließend wurde die Transaktivierung im Luciferase Assay bestimmt.

ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$

3.5 Der Einfluss der *ARID1A*-Defizienz auf das Apoptoseverhalten

Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt synchron zu zwei verschiedenen Effekten: der Inflammations- und Apoptoseregulation. Durch die Bindung von p65/p50 an die DNA werden sowohl proinflammatorische wie auch antiapoptotische Faktoren exprimiert. Karzinogenese und Tumorseprogression gehen häufig mit einem Verlust von Apoptose einher. Ein Verlust vom *ARID1A* als Tumorsuppressorgen könnte zu einer verminderten Apoptoserate führen.

Mittels Annexin-PI Färbung und anschließender FACS-Analyse lassen sich verschiedene Apoptoseschritte voneinander unterscheiden.

Die L3.6-Zellen mit und ohne *ARID1A* K.O. wurden für 24 h ausgesät und nach Färbung mit Annexin und PI im FACS separiert. Ohne Behandlung zeigten sich keine Unterschiede in den Zellklonen (Abbildung 24). Die Apoptoselevel waren gering.

Abbildung 24: Das Apoptoseverhalten wird nicht durch *ARID1A* beeinflusst. Annexin/PI Staining in nativen L3.6-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h ausgesät. Nach ihrer Ernte wurden sie mit Annexin und PI gefärbt und im FACS ausgezählt. Eine Färbung mit Annexin wurde als frühe Apoptose gewertet, eine mit PI als späte Apoptose. Eine Färbung mit beiden Reagenzien wurde als tot gewertet. Das Ergebnis konnte zwei Mal reproduziert werden. Es handelt sich hier um ein repräsentatives Beispiel.

Die Effekte durch die Induktion von Apoptose wurden ebenfalls betrachtet. Dazu wurden die L3.6-Zellen mit der apoptoseinduzierenden Substanz Staurosporin (3 h mit 0,6 μ M) behandelt. Schon nach kurzen Behandlungszeitpunkten zeigten sich auffällige morphologische Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen. Sowohl die Kontroll- wie auch die K.O. Zellen zeigten sich zusammengefallen und pyknotisch wie für apoptotische Zellen typisch (Abbildung 25a). Nach der Behandlung mit Staurosporin und der Separierung im FACS zeigte sich eine vermehrte

Apoptose in den *ARID1A*-Wildtyp Zellen (Abbildung 25b). Die *ARID1A* K.O. Zellen gingen zwar auch in Apoptose, jedoch im Vergleich zu den Wildtyp Zellen in geringerem Anteil. Der Verlust von *ARID1A* scheint mit einer erhöhten Resistenz hinsichtlich Apoptoseinduktion einherzugehen, nimmt aber wenig Einfluss auf die nativen Zellen.

Abbildung 25: Staurosporin beeinflusst das Apoptoseverhalten stark. a: Zellmorphologisch zeigen sich in den L3.6-Zellen nach 3 h Behandlung mit Staurosporin (0,6 µM) pyknotische Zellkerne, sowie bereits in Apoptose gegangene Zellen. Zuvor waren die Zellen für 24 h ausgesät und anschließend behandelt worden. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet; b: Im Annexin-PI-Staining zeigte sich nach 3 h Staurosporinbehandlung eine vermehrte Apoptoserate in den L3.6 Wildtyp Zellen. Gezeigt wird der Mittelwert dreier Versuchsdurchführungen.

Um den Einfluss der ARID1A-Defizienz bei Apoptoseinduktion weiter zu überprüfen, wurde erneut eine Behandlung mit Staurosporin durchgeführt und anschließend eine IF für die aktivierte Caspase 3 (*Cleaved Caspase 3*, CC3) durchgeführt. Die aktivierte Caspase 3 ist Teil des exekutiven Apoptosewegs und deutet bei verstärkter Expression auf eine gesteigerte Apoptose hin.

Es zeigte sich eine starke Induktion der Cleaved Caspase 3-Expression in den behandelten Zellen. In den ARID1A-Wildtypzellen war die Rate an Apoptose deutlich gesteigert im Vergleich zu den K.O. Zellen. In der Kontrollpopulation mit DMSO-Behandlung ließ sich zwischen den Klonen kein Unterschied in ihrem Apoptoseverhalten feststellen. Dies bestätigt den Einfluss von ARID1A auf die Apoptoseinduktion bei fehlendem Effekt auf basale Apoptosemechanismen. Auch in den KPC-Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. So konnte reproduziert werden, dass es in den K.O. Zellen zu weniger Apoptoseinduktion kam. In der Kontrollkohorte zeigte sich keine Apoptoseinduktion in den K.O. Zellen, jedoch eine leichte in den Wildtyp Zellen. Insgesamt scheint eine *ARID1A*-Defizienz zu einer geringeren Apoptoseinduktion zu führen, die nativen Apoptosemechanismen jedoch nicht zu beeinflussen. Wie beschrieben hat auch der NF- κ B-Signalweg einen Einfluss auf die Expression antiapoptotischer Faktoren. Die vorherigen Ergebnisse zeigten die stärkere Aktivierung dieses Signalwegs, was mit den beschriebenen Einflüssen auf die geringere Apoptoseinduktion in den K.O. Zellen einhergehen könnte.

Abbildung 26: Der *ARID1A* K.O. Klon reagiert vermindert auf Apoptoseinduktion.

a + b: IF in L3.6 (a) und KPC (b) Zellen auf Cleaved Caspase 3 mit Staurosporin Behandlung. Die Zellen wurden für 24 h ausgesät und für 3 h mit Staurosporin und DMSO als Negativkontrolle (beide 0,6 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt. c + d: Quantifizierung der IF in L3.6 (c) und KPC (d) Zellen auf Cleaved Caspase 3 mithilfe von Image J). Dabei wurden zehn repräsentative Bilder unter dem Mikroskop ausgewertet und anschließend die Anzahl der positiv gefärbten Cleaved Caspase 3 Zellen auf die Zahl der durch Dapi gefärbten Nukleii normalisiert. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

3.6 Der K.D. von p65 führt nicht zu einem Rescue der gesteigerten Expression von Zytokinen im Kontext der ARID1A-Defizienz.

Da eine ARID1A-Defizienz zu einer verstärkten nukleären Lokalisation von p65 führt, wurde im Folgenden untersucht, ob der K.D. von p65 die Sezernierung inflammatorischer Mediatoren beeinflusst.

Um die Relevanz von p65 für die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL6 zu testen, wurde ein siRNA vermittelter K.D. von p65 durchgeführt. Der erfolgreiche K.D. wurde mittels der IF validiert. In einer Kofärbung wurde IL6 dargestellt, um dessen Expression in Abhängigkeit des ARID1A-Status und der p65-Expression zu untersuchen. Hierbei zeigte sich in den L3.6-Zellen auch nach p65 K.D. eine erhöhte Expression von IL6 in den *ARID1A* K.O. Zellen. Folglich scheint die gesteigerte Aktivierung von p65 im Kontext der ARID1A-Defizienz nicht ausschlaggebend für die erhöhte IL6-Expression in ARID1A K.O. Zellen zu sein.

Abbildung 27: In der IF mit p65 K.D. zeigt sich keine Veränderung hinsichtlich IL6. a: IF in L3.6 mit Dapi, p65 und IL6, Die Zellen wurden ausgesät und nach 24 h lipofectaminvermittelt eine p65 siRNA in die Zellen eingebracht. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und angefärbt. b: Quantifizierung der IF. Unter dem Mikroskop wurden zehn repräsentative Färbungen ausgewählt. Die fehlende Färbung von p65 in den mit siRNA behandelten Zellen wurde als erfolgreicher K.D. gewertet. Die Anzahl der IL6 positiv gefärbten Zellen wurde auf die Anzahl der durch Dapi gefärbten Nuklei normlasiert.
 ns: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *ARID1A* zu einer gesteigerten Karzinogenese *in vivo* und zu einer vermehrten Inflammation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt. Dabei kommt es zu einer vermehrten Expression und Sezernierung inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL6. Bei beiden Botenstoffen handelt es sich um wichtige Initiatoren inflammatorischer Signalwege. Diese Arbeit konzentrierte sich auf den NF- κ B-Signalweg. Unsere Ergebnisse suggerieren eine stärkere Aktivierung des Signalwegs im Kontext der *ARID1A*-Defizienz. Auch der JAK-STAT-Signalweg scheint durch den Verlust von *ARID1A* stärker aktiv zu sein. Eine mögliche Erklärung wäre die verstärkte Expression und Sezernierung von Zytokinen, die in erhöhter Konzentration zu einer vermehrten Aktivierung genannter Signalkaskaden führen.

Neben seiner inflammatorischen Wirkung hat der NF- κ B-Signalweg auch antiapoptotische Funktionen. In der Untersuchung des Apoptoseverhaltens der Zellklone zeigten sich die *ARID1A* K.O. Zellen weniger sensibel gegenüber einer Staurosporin-vermittelten Induktion der Apoptose. Der Verlust tumorsuppressiver *ARID1A*-Funktionen scheint also Apoptose-basierende Tumor-Failsafe Mechanismen zu behindern.

Insgesamt bestätigen die gezeigten Ergebnisse die Hypothese, dass ein Verlust von ARID1A durch entzündungssteigernde und apoptosepräventive Einflüsse die Progression des PDAC steigert.

4. Diskussion

4.1 Subtypen des Pankreaskarzinoms

Für die Einteilung des PDACs auf Basis seines genetischen Profils gibt es bisher noch kein einheitliches Schema. Dennoch zeigen viele Arbeiten, dass bestimmte molekulare Veränderungen für unterschiedliche Tumoreigenschaften verantwortlich sind (Collisson et al. 2011; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016). Neben den charakteristischen Mutationen des PDACs (KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4) können auch Gene, die für epigenetische Regulatoren kodieren, von molekularen Veränderungen betroffen sein. Waddell und Kollegen benennen genetische Veränderungen des *ARID1A*-Gens als Komponente des SWI/SNF-Komplexes als ein wichtiges Ereignis in der Tumorbilogie des PDAC, das sich auch in der Subgruppierung des Tumors niederschlägt (Waddell et al. 2015). Mutationen in Komponenten dieses Chromatinremodellingkomplexes werden Veränderungen der Expression und Aktivität von TF zugeschrieben, die wiederum Prozesse der Inflammation, sowie Zellproliferation und -differenzierung beeinflussen (Fang et al. 2015; Kim et al. 2016; Livshits et al. 2018). Diese Mechanismen würden aufgrund ihrer Reversibilität einen Ansatzpunkt für eine stratifizierungs-basierte Behandlung bieten (Hessmann et al. 2017). Damit zeigt sich die Subklassifikation des PDACs als potentiell therapeutisch prädiktiv. Es ist davon auszugehen, dass Tumore mit einer bestimmten Mutation besser auf eine solche spezialisierte Therapie ansprechen würden als andere. Das genetische Profil des Tumors zu kennen, erwies sich somit als sehr nützlich.

Abbildung 28: Mutierte Gene im PDAC angelehnt an (Bailey et al. 2016). Es lassen sich Untergruppen häufiger Mutationen im PDAC bilden.

4.2 Konsequenzen des *ARID1A*-Verlusts im PDAC

In vielen verschiedenen Tumorentitäten wurde gezeigt, dass ein Verlust von *ARID1A* zu einer beschleunigten Karzinogenese führt und die Tumورprogression begünstigt. In verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise Leber-, Ovarial-, Endometrium-, Magen- und Kolonkarzinom konnte ein Einfluss von *ARID1A* beschrieben werden (Wang et al. 2012; Samartzis et al. 2013; Fang et al. 2015; Kim et al. 2016; Mathur et al. 2017). Auch im PDAC gehört *ARID1A* zu den häufig mutierten Genen (Wu et al. 2014).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie (CALL) und dem Institut für Pathologie der UMG nachweisen, dass in Gewebemikroanalysen (*tissue microarray*, TMA) in vielen Pankreastumoren kein natives *ARID1A* exprimiert wird. Hierbei konnte in 18 % aller entnommenen Probe (n=74) *ARID1A* nicht angefärbt werden, was auf eine inaktivierende Mutation/ Deletion in diesem Gen schließen lässt. Damit schätzen wir die Zahl der Tumore mit einem Verlust der nativen *ARID1A*-Funktion etwas höher als Wu und Kollegen mit einer Zahl von 8 %, wobei diese eine Stichprobe der Größe 36, sowie eine weitere der Größe 119 untersuchten (Wu et al. 2014). Eine mögliche Erklärung könnte in einer Inaktivierung liegen. Zusätzlich zu einer Mutation oder Deletion des *ARID1A*-Gens wäre es denkbar, dass es durch epigenetische Regulationen zu einem Abschalten von *ARID1A* kommt. Wu und Kollegen zeigten das Ergebnis genomischer Analysen, womit epigenetische Regulatorien nicht abgebildet werden. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass es sich bei unseren Tumoren um operable Tumore handelte. Ein höherer Anteil *ARID1A* negativer PDACs in einem späteren Stadium wäre möglich, vor allem, da es sich bei *ARID1A* um eine Mutation handelt, die erst spät in der Tumورprogression auftritt (Zhang et al. 2018). Eine genauere Betrachtung der Wirkung einer *ARID1A*-Fehlfunktion auf die Tumورprogression könnte zu einem besseren Verständnis epigenetischer Regulatorien in Karzinomen beitragen und neue Therapieansätze ermöglichen.

In unserem genetisch modifizierten Mausmodell von Zhe Zhang (PhD, AG Heßmann) zeigte die Gegenüberstellung von Mäusen mit einer zusätzlich zur *Kras*^{G12D} bestehenden *Arid1a*^{fl/fl} Mutation eine erhöhte Sterblichkeit, Zellinfiltration, sowie eine verfrühte Bildung von Vorläuferläsionen (Abbildung 7). Dies bestätigt die Ergebnisse von Livshits und Kollegen, in deren *Arid1a* defizienten Mausmodell im Kontext einer *Kras*-Mutation eine beschleunigte Pankreaskarzinogenese beschrieben wurde (Livshits et al. 2018). Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *Arid1a* entscheidende Einflüsse auf die Differenzierung von Zellen hat. Kimura und Kollegen sahen in ihrem Mausmodell eine Zunahme zystischer Läsionen im Kontext einer *Kras*^{G12D} Mutation (Kimura et al. 2018). Sie diskutierten den Einfluss von *Arid1a* auf die Dedifferenzierung von Zellen und sahen in *Arid1a* einen möglichen Einflussfaktor auf die Entstehung von Vorläuferläsionen des PDACs

(Kimura et al. 2018). So kam es nach Verlust von *Arid1a* zu einer gehäuften Bildung von IPMNs im Vergleich zu einer Kontrollkohorte (Kimura et al. 2018; Wang et al. 2018; Wang W et al. 2019). Wang und Kollegen beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von *Arid1a* und der Aggressivität der Tumore (Wang et al. 2018). Vermutet wird hierbei unter anderem die Wirkung von *Arid1a* auf die Expression verschiedener Gene. Bereits mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass es im Falle eines Verlusts von *Arid1a* zu einer geringeren Expression von E-Cadherinen - Zelladhäsionsmolekülen - kam. Dies führte zu einer gesteigerten Zellinvasion und Migration, Komponenten, die zu einer gesteigerten Tumoraggressivität beitragen (Zhang et al. 2018; Wang W et al. 2019). Zhang und Kollegen konnten zeigen, dass ein Verlust von *Arid1a* neben aggressiveren Tumoren auch zu einer gesteigerten Metastasenbildung führte (Zhang et al. 2018; Wang W et al. 2019). Durch den Verlust von *Arid1a* werden metastasierungsfördernde Gene wie *Lox* und *Lef1* vermehrt exprimiert (Wang W et al. 2019). Außerdem wird *ARID1A* eine entscheidende Rolle bei DNA-Reparaturprozessen zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass es in *Arid1a*-defizienten Zellen nach Behandlung mit zellschädigenden Substanzen zu keiner Reparatur der DNA kam (Wang W et al. 2019).

Wang und Kollegen sahen ebenso wie Kimura und Kollegen eine vermehrte Zystenbildung (Kimura et al. 2018; Wang et al. 2018). Ein Zusammenhang zwischen der Fehlfunktion *ARID1A*s und einem veränderten Phänotyp ist damit wahrscheinlich. Auch in anderen Tumorentitäten wie dem Magenkarzinom zeigte sich eine geringere Sterblichkeit bei wildtypischem *ARID1A*-Status (Wang et al. 2012). *ARID1A* scheint damit ein Faktor zu sein, der Tumorprogression zu inhibieren oder verlangsamen scheint. Ein Wegfall dieser Funktion führt somit zu einer beschleunigten Progression und Sterblichkeit (Kimura et al. 2018). Auf mögliche tumorbiologische Konsequenzen einer *ARID1A*-Defizienz soll im Folgenden weiter eingegangen werden. Um eine gezielte Therapie jener Patienten, die von einer Mutation in diesem Gen betroffen sind, anbieten zu können, ist eine genaue Betrachtung der Wirkung eines *ARID1A*-Verlustes notwendig.

Abbildung 29: Mäuse mit einem Verlust von *Arid1a* versterben deutlich früher. Unveröffentlichte Daten, mit freundlicher Genehmigung von Zhe Zhang, AG Heßmann. Zwei Mauspopulationen mit einer *Arid1a* *fl/fl*; *Kras^{G12D}* Mutation und solche mit einer *Kras^{G12D}* Mutation wurden hinsichtlich ihres Überlebens verglichen.

4.3 *ARID1A* und Inflammation

Der Einfluss des *ARID1A*-Status auf Entzündungsprozesse konnte bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Fang et al. 2015; Kim et al. 2016). In unserem Mausmodell sahen wir eine erhöhte Immunzellinfiltration im Stroma der Mäuse. Eine vermehrte Invasion CD45 positiver Zellen konnten Wang und Kollegen in ihrem *Arid1a*-defizienten Mausmodell ebenfalls beobachten (Wang et al. 2018). Als Teil der Immunabwehr findet sich eine vermehrte Immunzellinfiltration in Tumoren. Es wird davon ausgegangen, dass Epithelzellen chemotaktische Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren und Chemokine freisetzen, die zur Invasion von Immunzellen führen. Im Sinne einer positiven Verstärkung produzieren die Entzündungszellen weitere Botenstoffe, die zu einer vermehrten Zelleinwanderung führen (Roussos et al. 2011). Die gesteigerte Immunzellinfiltration in den Mäusen mit einem Verlust von *Arid1a* könnte auf eine gesteigerte Expression dieser Botenstoffe hindeuten. Dabei lassen sich zwei mögliche Wege diskutieren: eine erhöhte Sekretion von Chemokinen führt zu Entzündung, welche die Karzinomentstehung und -progression fördern. Alternativ könnten die entarteten Tumorzellen eine vermehrte Sekretion von Chemokinen zeigen, welche zu Inflammation führt. Eine Immunzellinfiltration kann einmal der Versuch des Immunsystems sein, das entartete Gewebe abzutöten und Wachstum zu verhindern. Gleichzeitig lässt sich diskutieren, ob es durch die Tumorzellen zu einer Reprogrammierung des lokalen Immunsystems kommt und somit Raum für weiteren Tumorprogress geschaffen wird. Wie bereits aufgezeigt, stellt eine Pankreatitis einen Risikofaktor für die Entstehung eines PDACs dar (Guerra et al. 2007). Im Kontext einer *Kras^{G12D}* Mutation kommt es durch chemische Induktion einer Pankreatitis zu einer frühzeitigen

Entstehung von Vorläuferläsionen im PDAC (Guerra et al. 2007). Allerdings zeigte sich auch, dass Tumorzellen Botenstoffe ausschütten, die Immunzellen aktivieren und rekrutieren (Lin und Karin 2007). Eine gegenseitige Beeinflussung von Karzinogenese und Inflammation ist damit wahrscheinlich und erklärt das hohe Vorliegen der CD45 positiven Zellen im stärker entarteten Gewebe der *Arid1a*-defizienten Tiere.

Auch *in vitro* zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine *ARID1A*-Defizienz mit einer erhöhten Expression und Sezernierung inflammatorischer Zytokine einhergeht. Zytokine führen zur Aktivierung proentzündlicher Signalwege, sind aber auch Folge dieser. Ein erhöhtes Vorkommen deutet somit auf eine gesteigerte inflammatorische Aktivität hin (Lin und Karin 2007). Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine verstärkte Expression von IL6 und TNF α in den *ARID1A*-defizienten Zellen. Des Weiteren war die Sezernierung beider Botenstoffe in der IF und im ELISA verstärkt.

Diese Ergebnisse konnten in den K.D. Zellen nicht signifikant reproduziert werden (Abbildung 14). Davon ausgehend, dass es durch den Verlust von ARID1A zu einer Fehlfunktion des SWI/SNF-Komplexes kommt, könnte die Restaktivität bei unvollständigem K.D. von *ARID1A* einen signifikanten Effekt verhindern. Bis zur Integration der siRNA in die Zelle vergeht Zeit, in der eine normale Zytokinexpression mit einem funktionsfähigen ARID1A stattfinden kann. Der Betrachtungszeitpunkt nach K.D. könnte durch seine Kürze ein signifikantes Ergebnis kaschieren. Denn, obwohl die Zytokinerhöhung in den Zellen mit verringerter *ARID1A*-Konzentration sich nicht signifikant zeigte, war doch ein positiver Trend zu sehen. Darüber hinaus könnte die Aktivierung von Kompensationsmechanismen als Folge des ARID1A K.D.s eine Rolle in der Regulation der Zytokine spielen. So zeigten Kelso und Kollegen, dass ein Verlust von ARID1A in bestimmten Fällen durch ARID1B, einer weiteren Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, kompensiert werden kann (Kelso et al. 2017; Trizzino et al. 2018). Inwieweit der ARID1A K.D. oder K.O. aber zu einer Steigerung der ARID1B-Expression oder -Aktivität führt, bleibt noch zu untersuchen.

Zwei mögliche Theorien zum Einfluss von *ARID1A* auf die PDAC Progression werden diskutiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass es durch eine Mutation in *ARID1A* zu einer veränderten Bindung des SWI/SNF-Komplexes an die DNA kommt. Zu diskutieren wäre hierbei ein veränderter Bindungslocus an anderen Zielgenen, sowie eine stärkere oder schwächere Bindungsaffinität. So kommt es beispielsweise zu einer gesteigerten Expression von Untereinheiten des mTOR-Signalwegs (Kimura et al. 2018). Zusätzlich wird ein verändertes TF-Bindevverhalten an der DNA diskutiert (Pavlidou und Balis 2020). So zeigte sich, dass es durch einen Verlust von ARID1A zu einer veränderten Öffnung bzw. Blockade verschiedener Chromatinabschnitte kommt (Livshits et al. 2018). Dies ermöglicht TF ein verändertes Bindungsverhalten, wodurch es z. B. zu einer verstärkten Expression von Aktivatoren inflammatorischer Signalkaskaden kommen kann (Ong und Corces 2012).

Auch im malignen Melanom konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit einer Mutation im PBAF-Teil des SWI/SNF-Komplexes eine gesteigerte Bindung an das Interferon γ kodierende Gen vorlag, wodurch es zu einer vermehrten Chemokinsekzernierung und damit einer gesteigerten Inflammation im Kontext von SWI/SNF kam (Pan et al. 2018). Im inflammatorischen Mammakarzinom lag durch eine Wechselwirkung verschiedener Signalwege und TF eine gesteigerten Expression von IL6 vor, welche die Malignität des Tumors weiter steigerte (Ndlovu et al. 2009). Unveröffentlichte Chip-Sequenzierungsdaten unserer Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls, dass es durch den Verlust von ARID1A zu einer erhöhten Chromatinöffnung am IL6-Locus kam und damit mehr IL6 transkribiert wurde. Die gesteigerte Expression von TNF α und IL6 in den *ARID1A* K.O. Zellen könnten somit durch die veränderte Chromatinstruktur und transkriptionelle Aktivität bei einer durch den ARID1A-Verlust ausgelösten Fehlfunktion des SWI/SNF-Komplexes erklärt werden.

Lässt sich der Einfluss von ARID1A auf die Zytokinexpression gut darstellen, so lassen sich für die Konsequenzen des ARID1A-Verlusts jedoch mehrere mögliche Hypothesen aufstellen. Entweder beeinflusst das veränderte Chromatinremodelling im Kontext der ARID1A-Defizienz die Expression von Zytokinen wie IL6 oder TNF α direkt, z. B. durch eine veränderte Bindungsaffinität des SWI/SNF-Komplexes an diesen Zielgenen oder es werden als Konsequenz des ARID1A-Verlusts verschiedene TF exprimiert oder aktiviert, die konsekutiv zur Aktivierung von Signalkaskaden und damit zu einer gesteigerten Expression der Zytokine führen.

Der JAK-STAT-Signalweg ist einer der Signalkaskaden, die durch IL6 angeregt werden (Block et al. 2012; Au-Yeung et al. 2013). Im PDAC zeigte sich eine Tumorprogression und Entstehung von ADMs und PanINs durch eine Mutation innerhalb des JAK-STAT-Signalwegs (Iliopoulos et al. 2009; Corcoran et al. 2011). Corcoran und Kollegen definierten das phosphorylierte STAT3 als einen wichtigen Prediktor in der Vorhersage, ob Inhibitoren des Signalwegs als eine mögliche Therapie wirken können (Corcoran et al. 2011). Im Non-Hodgkin-Lymphom wird mit Rituximab, einem CD20-Antikörper, der JAK-STAT-Signalweg inhibiert und eine DNA-Bindung STAT3s verhindert. Hiermit fand sich ein neuer wirksamer Therapieaspekt innerhalb dieser Tumorentität (Alas und Bonavida 2001). Auch wir konnten zeigen, dass es zu einer Hochregulation des JAK-STAT-Signalwegs in den Zellen mit einem Verlust von ARID1A kommt (Abbildung 22). Dabei waren in der mRNA-Expression von *STAT3* keine wesentliche Unterschiede zwischen den Wildtyp und den *ARID1A* K.O. Zellen zu sehen. Das weist darauf hin, dass die einzelnen Komponenten des JAK-STAT-Signalwegs durch den ARID1A-Verlust nicht in ihrer Expression verändert werden. Es findet sich jedoch eine erhöhte pSTAT3-Expression, die auf eine stärkere Aktivierung des Signalwegs in den *ARID1A*-defizienten Zellen schließen lässt. Dieser inflammatorische Signalweg führt bei Akti-

vierung ebenfalls zur Transkription entzündungsfördernder Botenstoffe und triggert so die Inflammation. Für das PDAC konnte bereits ein relevanter Einfluss des Signalwegs auf die Tumorprogression gezeigt werden (Iliopoulos et al. 2009; Block et al. 2012). Die erhöhte Expression von IL6 als Aktivator des JAK-STAT-Signalwegs in den *ARID1A*-defizienten Zellen stellt eine gute Erklärung dieses Mechanismus dar. Im Ovarialkarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass eine Blockierung von IL6 im Kontext einer Mutation im Gen der *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (PIK3CA) zu einem reduzierten Wachstum von Tumorzellen führt (Kim et al. 2016), was im Umkehrschluss die prokarzinogene Wirkung von IL6 im Kontext mit anderen Mutationen bestätigt.

Zusammengefasst findet sich mit *ARID1A* als Teil des Chromatinremodellingkomplexes SWI/SNF ein mögliches Gen, dessen Verlust durch eine Veränderung innerhalb der Chromatinstruktur Inflammation positiv beeinflusst. Der zugrunde liegende Mechanismus muss dabei noch untersucht werden, um gezielt die proinflammatorischen Signalkaskaden im Kontext einer *ARID1A*-Mutation therapeutisch blockieren zu können.

4.4 *ARID1A* und Apoptose

Nicht nur Inflammation, sondern auch das apoptotische Verhalten ist in Tumorzellen verändert. Apoptose bezeichnet den selbstprogrammierten Zelltod. Die Zelle kann intern oder extern zur Apoptose angeregt werden. Die Apoptose läuft dann in einem mehrschrittigen Prozess ab (Kerr et al. 1972). So gibt es Mechanismen wie den extrinsischen Caspasen-Weg (Parrish et al. 2013) oder den intrinsischen Bcl-2 Weg (Czabotar et al. 2014). Beide Wege führen über verschiedene Signalkaskaden zur Initiierung von programmiertem Zelltod. Genau diese Vorgänge können durch Botenstoffe aktiviert oder inaktiviert werden. Viele Tumore zeichnen sich durch ein verändertes Apoptoseverhalten aus, welches zu einer Langlebigkeit fehlerhafter Zellen und damit zur Krebsentstehung führt (Hanahan und Weinberg 2000).

Im Nicht Kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigte sich, dass *ARID1A* den Zellzyklus sowie Apoptose über seinen Einfluss auf regulierende Proteine wie dem B-Zell Lymphom 2 (*B-cell lymphoma 2*, Bcl-2) und Cyklin D1 beeinflussen kann und ein Verlust von *ARID1A* zu einer erhöhten Rate an Apoptose führte (Zhang et al. 2014). Des Weiteren fand sich im Ovarialkarzinom ein vermehrter Telomerschaden im Rahmen einer *ARID1A*-Defizienz (Zhao et al. 2019). Telomere sind die Endstücke der Chromosomen. Durch das Enzym Telomerase wird verhindert, dass sich mit jeder Chromosomenreplikation deren Länge verkürzt, sodass ein Schaden im Telomer zu einem veränderten Wachstumsverhalten der Zellen führt (Zhao et al. 2019). Auch zeigte sich in den *ARID1A*-defizienten Zellen eine erhöhte Chromosomenfusion, sowie Chromosomendefekte und längere Mitoseraten (Watanabe

et al. 2014; Shen et al. 2015; Zhao et al. 2019). Diese Charakteristika führen ebenfalls zu einem gestörten Wachstum der Zellen.

Ein Einfluss von ARID1A auf die Topoisomerase II, ein Enzym, welches vor der DNA-Replikation die DNA-Doppelhelix auftrennen kann und so einen maßgebenden Einfluss auf die Replikation der DNA hat, konnte gezeigt werden. Ein Verlust von ARID1A führt so zu einer verlängerten Pause dieses Enzyms und damit zu einer Änderung der Replikation (Dykhuizen et al. 2013; Trizzino et al. 2018). Insgesamt führt eine ARID1A-Defizienz über verschiedene Mechanismen zu einer verminderten Apoptoserate und einer erhöhten Langlebigkeit der mutierten Zellen.

Wir erwarteten daher, dass sich in nativen Zellen ARID1A-Status abhängige Unterschiede in den Apoptoseleveln zeigen und eine *ARID1A*-Defizienz zu einer vermehrten Apoptose führen würde. Allerdings zeigte sich im Annexin/PI Staining kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellklonen. Dies widerspricht den aufgezeigten Erkenntnissen, ein Verlust von *ARID1A* habe einen Einfluss auf die Apoptose. Im Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von ARID1A auf die Topoisomerase II durch ARID1B wieder hergestellt werden konnte und sich erst durch weitere Mutationen in z. B. *p53* zeigte (Trizzino et al. 2018). Eine mögliche Wirkung von ARID1B bzw. fehlende Mutationen in anderen Genen, deren Zusammenspiel erst zur Apoptose führt, wären hier dementsprechend möglich und würde den fehlenden Unterschied zwischen den Klonen erklären.

Um die Reaktion der Zellen auf eine Induktion von Apoptose zu untersuchen, erfolgte eine Behandlung mit Staurosporin. Staurosporin wirkt sowohl über den schnellen Caspase vermittelten wie auch über einen langsameren Caspase unabhängigen Apoptosemechanismus. Die genauen Funktionswege sind bisher noch unbekannt (Belmokhtar et al. 2001). Die *ARID1A*-defizienten Zellen reagierten weniger stark auf eine Induktion von Apoptose durch Staurosporin als die Wildtypzellen. Dies zeigte sich sowohl im Annexin-PI Staining wie auch in der IF, bei der die Wildtypzellen mehr Cleaved Caspase 3 aufwiesen. Diese Daten zeigen, dass der ARID1A-Status wie vermutet das Apoptoseverhalten der Zellen beeinflusst. In unseren Zellen zeigte sich jedoch eine verminderte Apoptoserate in den Zellen mit einer ARID1A-Defizienz, was der aktuellen Literatur widerspricht. Eine erhöhte Effektivität bei längerer Behandlungszeit konnte nicht untersucht werden. Bei einer verlängerten Behandlungszeit zeigten bereits viele Zellen morphologische Hinweise auf Apoptose wie Zellkernschrumpfung und Zellmembraneinziehungen (Belmokhtar et al. 2001), sodass Proteinanalysen sowie RNA-Gewinnung meist nicht möglich waren und die Expression von Markern der Apoptoseinduktion nicht untersucht werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in nativen Zellen keinen Hinweis auf einen Einfluss von ARID1A im Apoptoseverhalten der Zellen gibt. Hingegen reagieren die Wildtyp-Zellen auf eine

Apoptoseinduktion deutlich sensitiver. Eine *ARID1A*-Defizienz scheint die Zellen vor einem Zelltod durch Apoptoseinduktion zu schützen. Im Ovarialkarzinom zeigte sich eine gesteigerte Resistenz gegen das Spindelgift Paclitaxel in Zellen mit einer *ARID1A*-Defizienz, da diese ein verändertes Apoptose- und Proliferationsverhalten aufwiesen (Zhao et al. 2019). Überträgt man dies auf das PDAC, so hätte der *ARID1A*-Status einen Einfluss auf die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika und wäre ggf. wegweisend für eine Therapiestratifizierung.

4.5 *ARID1A* und NF- κ B

Der NF- κ B-Signalweg trägt sowohl zur Transkription inflammatorischer wie antiapoptotischer Gene bei (Sen und Baltimore 1986). Damit wirkt er förderlich auf beide tumorprogressionsfördernden Mechanismen. Eine Aktivierung der Untereinheiten des NF- κ B-Signalwegs wird v. a. über posttranslationale Phosphorylierungen reguliert/kontrolliert. Eine Ausnahme bildet hierbei die inhibitorische Kinase I κ B α , welche phosphoryliert inaktiv ist und so im Zytoplasma verbleibt (Sen und Baltimore 1986; Serasanambati und Chilakapati 2016). Im WB zeigte sich in den *ARID1A*-defizienten Zellen eine vermehrte Phosphorylierung des TF p65, sowie des phosphorylierten I κ B α . In den aktivierten Kinasen IKK α und IKK β konnte man keine starke Zunahme der Phosphorylierung erkennen. Die gesteigerte Phosphorylierung der inaktiven Untereinheit I κ B α führt dazu, dass p65 im Zytoplasma freiliegt. Dies ermöglicht damit die Translokation in den Nukleus zur Bindung an die DNA. Das freie p65 kann posttranslational phosphoryliert werden. Dadurch wird eine veränderte Bindung und Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht (King et al. 2011; Milanovic et al. 2014). Die basale Expression der Untereinheiten des NF- κ B-Signalwegs zeigten keine *ARID1A*-Status abhängigen Unterschiede. Dies deutet daraufhin, dass der Verlust von *ARID1A*-Einfluss speziell auf die Aktivierung des Signalwegs nimmt. Eine stärkere Aktivierung des Signalwegs in den *ARID1A*-defizienten Zellen müsste sich auch in einer erhöhten Expression der phosphorylierten IKK α zeigen. Dass sich hier keine Unterschiede finden, könnte von dem schnellen Ablaufen des Signalwegs abhängen. So zeigt sich im WB immer nur eine Momentaufnahme. Im Sinne negativer Feedback-mechanismen inhibiert eine starke Aktivierung des Signalwegs sich selber. Es wäre möglich, dass dieser Zeitpunkt im Experiment abgebildet wurde. Als Teil des klassischen Aktivierungswegs, welcher durch die Aktivierung durch inflammatorische Zytokine und Viren gekennzeichnet ist, zeigte sich vor allem IKK β zuständig für die Phosphorylierung von I κ B α (Dolcet et al. 2005). Der nicht-klassische Weg wird durch die TNF-Gruppe oder Lymphotoxine aktiviert und triggert vor allem IKK α (Dolcet et al. 2005). Da hier im WB keine verstärkte Phosphorylierung vorlag, handelt es sich im Falle der *ARID1A*-defizienten Zellen um eine stärkere Aktivierung des klassischen Signalwegs.

Eine Aktivierung durch das vermehrte Vorliegen von Zytokinen würde auch zu den oben gezeigten Ergebnissen der vermehrten Sezernierung von IL6 passen.

Auch die Transaktivierung eines NF- κ B responsiven Promoters war in den K.O. Zellen verstärkt und die mRNA-Expression von NF- κ B Target Genen erhöht. Dies bestätigt die erhöhte Aktivierung des Signalwegs im Rahmen einer *ARID1A*-Defizienz.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen in der Genexpressionsanalyse die NF- κ B Zielgene im *ARID1A* K.O. Klon deutlich erhöht (Abbildung 30).

Abbildung 30: Die Gene des NF- κ B-Signalwegs zeigen eine verstärkte Aktivierung in den *ARID1A* K.O. Zellen. (a) unveröffentlichte Daten Zhe Zhang, AG Heßmann, Genexpressionsanalyse (*Gene set enrichment analysis*, GSEA) von L3.6 RNA-seq data (b) RNA-seq GSEA Analyse unter Benutzung der GSEA Datenbank C2 cgp in L3.6-Zellen vergleichend der normalisierten Anreicherungsweite (*normalized enrichment scores*, NES) von *ARID1A* K.O. vs. WT Zellen mit einer Fehlerrate < 0,25 (*false discovery rate*, FDR)

Die vorliegenden Daten unterstützen daher die These, dass ein Verlust von *ARID1A* zu einer stärkeren Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt. Die verstärkte Anreicherung von IL6 als inflammatorischen Botenstoffe wäre eine mögliche Ursache, um wie oben beschrieben den klassischen NF- κ B-Signalweg zu aktivieren.

Der aktive NF- κ B-Signalweg führt durch den TF p65 zu einer verstärkten Expression inflammatorischer Zytokine (Sen und Baltimore 1986; Iliopoulos et al. 2009). Eine verstärkte Anreicherung von IL6 wäre somit nicht nur eine mögliche Ursache der Aktivierung des Signalwegs, sondern auch eine Folge dessen. Es konnte gezeigt werden, dass IL6 verstärkt sezerniert wird, wenn p65 im Zellkern lokalisiert ist. Führt IL6 zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und damit zu einer Translokation von p65 in den Kern oder führt die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs an sich zu einer verstärkten Transkription inflammatorischer Zytokine wie IL6? Im Zusammenhang mit *ARID1A* lassen sich zwei mögliche Modelle diskutieren:

- 1) eine *ARID1A*-Defizienz führt durch ein verändertes Chromatinremodelling zu einer gesteigerten Transkription und Sekretion inflammatorischer Botenstoffe wie IL6 und infolgedessen zu einer verstärkten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs.
- 2) ein Verlust von *ARID1A* führt zu einer direkten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs über ein verändertes Chromatinremodelling und damit zu einer verstärkten Sekretion inflammatorischer Botenstoffe wie IL6.

Abbildung 31: Zwei mögliche Hypothesen zur Auswirkung des *ARID1A*-Verlusts Der *ARID1A*-Verlust könnte durch eine Zytokinexpression zu einer Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Verlust sich direkt auf die Regulation der Signalwege auswirkt, die damit zu einer verstärkten Zytokinsekretion beiträgt.

Beide Modelle sind mit den hier gezeigten Ergebnissen kompatibel. Zur Klärung dieser Problemstellung sollte der Überstand-Versuch dienen. Bei diesem wurde der Überstand von *ARID1A* Wildtyp- und *ARID1A*-defizienten Zellen nach Inkubation entnommen und die Transaktivierung eines NF- κ B-sensitiven-Promoters in den L3.6-Zellen mit den verschiedenen Überständen untersucht.

Wir vermuteten, dass sich im Überstand der *ARID1A*-defizienten Zellen eine erhöhte Zytokinkonzentration befand, die zu einer suffizienten Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führen kann. Es zeigte sich eine verstärkte Transaktivierung in den Zellen, die mit dem Überstand der defizienten Zellen behandelt wurden. Das Resultat spricht dafür, dass der Verlust von ARID1A zu einer verstärkten Sezernierung inflammatorischer Zytokine führt und damit zur Aktivierung weiterer inflammatorischer Signalkaskaden beiträgt. Im Sinne eines Feedback-Mechanismus ist aber nicht auszuschließen, dass die vermehrte Aktivierung des Signalwegs ebenfalls zu einer vermehrten Zytokinausschüttung führt. Ein Zusammenwirken beider Hypothesen wäre somit möglich. Ein Verlust von ARID1A verändert die Chromatinstruktur und damit die Transkription inflammatorischer Botenstoffe. Die damit einhergehende vermehrte Zytokinausschüttung regt Signalkaskaden an, die wiederum die Bildung inflammatorischer Botenstoffe anregen. Gleichzeitig werden inflammatorische Zytokine transkribiert und damit ebenfalls Signalwege aktiviert. Gemäß eines Feedback-Forward-Mechanismus würde der Effekt sich selber verstärken und zu mehr Inflammation führen.

P65 als eine der wichtigsten, DNA-bindenden Untereinheiten des NF- κ B-Signalwegs zeigte sich im WB stärker phosphoryliert und damit aktiviert. Bei einem K.D. von p65 wäre die stärkere Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch den K.D. vermindert. Die Zytokinsezernierung durch den verstärkt aktivierten Signalweg müsste damit zurückgefahren werden. Verfolgt man Hypothese Nummer eins, würde ein K.D. von p65 zu keiner Veränderung der Zytokinexpression führen, da diese bereits vor der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur im Bereich Zytokin-regulierender Gene aktiviert werden. In der IF zeigte sich durch den K.D. von p65 keine verminderte Sezernierung von IL6. Auch wenn dieses Ergebnis das Model einer direkten Kontrolle der Zytokinexpression im Kontext des ARID1A-Verlusts wie in Hypothese 1. beschrieben unterstützt, kann das Model der indirekten Zytokinregulation über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs trotzdem nicht vollständig verworfen werden. So bildet eine IF immer nur eine Momentaufnahme ab. Es ist nicht auszuschließen, dass eine erhöhte Expression von IL6 zu einem späteren Zeitpunkt erreicht worden wäre. Zusätzliche Einflussfaktoren sind außerdem möglich. Im Mammakarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von IL6 durch TNF α und NF- κ B über eine Promoterbindung gesteuert wird, jedoch hierfür weitere Cofaktoren notwendig sind (Ndlovu et al. 2009). Auch im Sarkom zeigte sich ein zum NF- κ B-Signalweg zusätzlicher Einfluss von *Mitogen-activated protein Kinase* (MAPK)-Signalwegen auf die IL6-Genexpression. Ein K.D. von p65 führte hier ebenfalls zu keiner Veränderung in der Expression von IL6 und IL8 (Ndlovu et al. 2009). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Expression von IL6 auch durch andere Mechanismen gesteuert wird und diese den Einfluss des K.D.s wiederherstellen. Annehmend, dass ein Verlust

von ARID1A sich zuerst auf die Zytokinexpression auswirkt und konsekutiv inflammatorische Signalwege induziert werden, bestätigen die Ergebnisse diese Hypothese.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *ARID1A*-Defizienz eine starke Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, sowie eine vermehrte Zytokinexpression bewirkt. Wie oben dargestellt scheint ARID1A als Teil des SWI/SNF-Komplexes den NF- κ B-Signalweg über eine vermehrte Zytokinexpression anzuregen. Möglich wäre die durch den Verlust von ARID1A veränderte Chromatinstruktur, die die Bindung von TF an definierte Genabschnitte begünstigt und damit die Transkription von Zytokinen induziert. Dieser Prozess geht mit einer Hochregulation von IL6 einher, welches andere Signalwege wie den JAK-STAT-Signalweg aktiviert. Der NF- κ B-Signalweg ist daher nur einer von vielen möglichen Signalwegen, die durch eine *ARID1A*-Defizienz beeinflusst werden.

Der genaue Mechanismus, mit dem der Verlust von ARID1A die erwähnten Ergebnisse bewirkt, bleibt ungeklärt. Eine Veränderung in der Chromatinstruktur durch eine Fehlfunktion des SWI/SNF-Komplexes erscheint jedoch ein naheliegendes Szenario zu sein.

4.6 Erweiterte Einflussfaktoren

Auch wenn die KPC und die L3.6-Zellen eine Hochregulation des NF- κ B-Signalwegs unter *ARID1A*-Defizienz zeigen, sind einige Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ersichtlich. Auf mRNA fielen Unterschiede bei den NF- κ B Zielgenen auf. NF- κ -BiA war in den KPC-Zellen nicht signifikant erhöht. Außerdem zeigte sich die vermehrte IL6-Expression in der IF in den murinen Zellen nicht so prominent, wohingegen sich der Effekt im *ARID1A* K.D. deutlicher in den KPC-Zellen als in den L3.6 darstellte. Weiterhin zeigte sich in der IF eine erhöhte Gesamtexpression von p65 in den KPC-Zellen, jedoch nicht im Nukleus.

Gründe für die genannten Unterschiede können im unterschiedlichen Ursprung beider Zellen liegen. So handelt es sich einmal um eine humane (L3.6) (Bruns et al. 1999) und einmal um eine murine (KPC) Zelllinie. Des Weiteren unterscheiden sich diese genetisch vor allem in ihrem p53-Status. In den KPC-Zellen konnte eine Punktmutation gefunden werden: Trp53R172H/+ (Hingorani et al. 2005). Für die L3.6-Zellen findet sich keine veränderte Expression in ihrem p53 Status (Gysin et al. 2005). *TP53* ist ein Tumorsuppressorgen und beeinflusst Apoptose und Zellviabilität (Meylan et al. 2009; Leroy et al. 2014). Es konnte bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen ARID1A und p53 gezeigt werden (Guan et al. 2011; Wu et al. 2014). Die Unterschiede im p53 Status der Zelllinien könnte die Zellen zusätzlich beeinflussen und so dazu führen, dass die gezeigten Ergebnisse leicht divergieren.

Zusammengefasst lässt sich trotz der Unterschiede zwischen den Zelllinien eine deutliche Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, sowie ein Einfluss von *ARID1A* auf das Inflammations- und Apoptoseverhalten erkennen.

4.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend stellten wir fest, dass eine *ARID1A*-Defizienz die Entstehung zystischer Vorläuferläsionen des PDAC fördert und im etablierten Tumor mit einer gesteigerten Progression und lokalen Inflammation einhergeht. Die vermehrte Inflammation äußerte sich sowohl anhand einer erhöhten Immunzellinfiltration *in vivo*, als auch *in vitro* durch den Nachweis einer erhöhten Expression und Sezernierung von IL6 und TNF α . Durch diese inflammatorischen Zytokine kommt es zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden wie beispielsweise des JAK-STAT-Signalwegs. Des Weiteren reagieren die Zellen mit einem Verlust von ARID1A weniger sensitiv auf die Induktion von Apoptose, wobei sich in der basalen Apoptoserate keine Unterschiede zwischen den Zellklonen zeigte. Auch der NF- κ B-Signalweg wird durch den Verlust von ARID1A stärker aktiviert und führt damit ebenfalls zu einer vermehrten Inflammation. Ursächlich erscheint die verstärkte Transkription inflammatorischer Zytokine im Kontext der ARID1A-Defizienz, welche den Signalweg aktivieren. Ein wechselseitiger Einfluss durch Co-faktoren auf diese Aktivierung kann nicht ausgeschlossen werden. Ein ARID1A-Verlust wirkt somit sowohl durch die Induktion inflammatorischer Prozesse, als auch durch die Blockade der Apoptoseinduktion im Pankreas tumorprogressionsfördernd.

4.8 Ausblick

Bereits vielfach wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich das Pankreaskarzinom anhand bestimmter Mutationen in verschiedene Subtypen einteilen lässt. Als Therapieoption wäre es somit essentiell, den Subtyp zu bestimmen und so die Eigenschaften des Tumors beispielsweise hinsichtlich der Aktivierung zentraler onkogener Signalwege zu kennen. So könnte ein gezieltes medikamentöses Eingreifen in diese Wege zu einem besseren Therapieansprechen führen (Jones et al. 2008; Collisson et al. 2011; Waddell et al. 2015; Bailey et al. 2016).

Geht man davon aus, dass sich die Mutation in *ARID1A* vor allem über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs tumorprogressionsfördernd wirkt, wäre es sinnvoll, diesen Signalweg gezielt in Subtypen mit einer ARID1A-Defizienz zu blockieren. Im Ovarialkarzinom konnte für NF- κ B-Signalweg Inhibitoren bereits eine Funktion als Sensitizer für Carboplatin im Mausmodell nachgewiesen werden (Kim et al. 2016). Hierbei sind allerdings der *Kras* und *Tp53* Status wegweisend für die Therapie mit NF- κ B-Signalweg Inhibitoren, da nur eine Mutation innerhalb dieser Gene zu einem Therapieerfolg führen würde (Meylan et al. 2009). Die Inhibitoren zeigten bisher eine gute Wirkung, vor allem

hinsichtlich der Reduzierung der antiapoptotischen Effekte, sodass die Subgruppierung der Tumore und eine gezielte Behandlung als sinnvoll angesehen wird (Jana et al. 2017). Die Nebenwirkungen dieser Inhibitoren sind bisher allerdings so hoch, dass sie im klinischen Alltag selten eingesetzt werden (Zeligs et al. 2016). Da der Verlust von ARID1A zu einer starken Beeinflussung des NF- κ B-Signalwegs führt, wäre es möglich, dass Patienten mit einer *ARID1A*-Mutation eher von einer Therapie mit NF- κ B-Signalweg Inhibitoren profitieren als Patienten ohne einen ARID1A-Verlust. Es wäre daher wichtig, das PDAC hinsichtlich seines ARID1A-Status zu klassifizieren, um somit auf Basis des ARID1A-Status eine stratifizierungsbasierte Therapie des PDAC anbieten zu können.

5. Zusammenfassung

Trotz zahlreicher klinischer Untersuchungen ist das Pankreaskarzinom (PDAC) nach wie vor einer der aggressivsten malignen Tumore. Aufgrund der ausgeprägten molekularen Heterogenität des PDAC ist die zielgerichtete Therapie des Tumors eine große Herausforderung. Der Verlust des Tumorsuppressorgens *ARID1A*, einer Untereinheit des SWI/SNF-Chromatinremodelling Komplexes, kann in 6 - 8 % aller PDAC gefunden werden. In verschiedenen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die ARID1A-Defizienz mit einer vermehrten lokalen Inflammation einhergeht und somit die Tumorprogression fördert. Die genauen Mechanismen, mit denen der ARID1A-Verlust zu einer Hochregulation von Entzündung im PDAC führt, sind noch nicht hinreichend untersucht. Mithilfe eines konditionalen transgenen Mausmodells untersuchten wir die Rolle einer *ARID1A*-Defizienz im Pankreas im Kontext einer *Kras*-Mutation. In HE Färbungen und IHC zeigte sich eine vermehrte Zystenbildung und eine höhere Immunzellinfiltration im pankreatischen Stroma Arid1a-defizienter Mäuse. Die Expression, intrazelluläre Lokalisation und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wurden in humanen (L3.6) und murinen (KPC) ARID1A-Wildtyp und K.O. (CRISPR/Cas9) Zellen mithilfe von Immunoblots und Immunfluoreszenz untersucht. Mittels ELISA und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurde der Einfluss der ARID1A-Expression auf die Zytokintranskription und -sezernierung bestimmt. Die Untersuchungen zeigten eine erhöhte Expression und Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine, sowie eine verstärkte Aktivierung der inflammatorischen und tumorprogressionsfördernden STAT3- und NF- κ B-Signalwege im Kontext der ARID1A-Defizienz. Dabei suggerieren unsere Ergebnisse, dass die gesteigerte Zytokinexpression im Kontext des ARID1A-Verlusts für die verstärkte Aktivierung der STAT3- und NF- κ B-Signalwege verantwortlich ist.

Obwohl sich das basale Apoptoselevel nicht von einem ARID1A-Verlust beeinflusst zeigte, kam es im Kontext einer ARID1A-Defizienz zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptoseinduktoren. Der Verlust der tumorsuppressiven ARID1A-Funktion scheint somit Apoptose basierte Tumor-Failsafe Mechanismen zu inhibieren.

Zusammenfassend assoziieren unsere Daten ARID1A-defiziente PDAC Subtypen mit einem pro-inflammatorischen und anti-apoptotischen Phänotyp und weisen somit neue therapeutische Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Behandlung ARID1A-defizienter PDAC Subtypen auf.

6. Summary

Despite significant clinical efforts PDAC (pancreatic ductal adenocarcinoma) is still one of the most aggressive malignant disease. Due to the extreme molecular heterogeneity of PDAC one-fits-all therapeutic concepts in PDAC treatment are still in development. This includes subtype-specific and individualized therapeutic approaches. Loss of the tumor suppressor gene *ARID1A*, which is part of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, occurs in approximately up to 6-8% of PDAC specimen. Moreover, *ARID1A* loss is correlated with an inflammatory tumor phenotype in various tumor entities. Thus, targeting inflammation appears to be a promising approach as a therapeutic strategy for tumor types with *ARID1A* deficiency. Yet, if *ARID1A*-deficient PDAC subtypes are linked with an increase of inflammation-associated mechanisms has not been reported.

ARID1A loss is associated with the development of cystic lesions and abundance of inflammatory cells in the pancreatic stroma through histological analysis conducted in the pancreas of a transgenic conditional mouse model of *Arid1a* deficiency and an oncogenic activation of *Kras*. The expression and intracellular localization of inflammatory transcription factors and their upstream signaling components were studied in *ARID1A* wildtype and knockout (CRISPR/Cas9) human L3.6 cells and murine KPC cells using immunoblot and immunofluorescence assays. ELISA and qRT-PCR were utilized to determine the impact of the *ARID1A* status on cytokine expression and secretion. The analyses revealed an increased expression and secretion of pro-inflammatory cytokines as well as increased activity of the inflammatory and tumorigenic STAT3- and NF- κ B signaling pathways in the context of *ARID1A* deficiency. Further, the results demonstrate that the increased transcription and secretion of pro-inflammatory cytokines evident in the absence of *ARID1A* accounts responsible for subsequent activation of NF- κ B and STAT3 signaling.

Although the *ARID1A* status did not have an impact on basal apoptotic activity, further analyses revealed that an *ARID1A* loss makes PDAC cells less susceptible towards apoptosis induction. Hence, the loss of the tumor suppressive *ARID1A* function seems to inhibit apoptosis-based tumor-failsafe mechanisms.

In conclusion, inflammatory signaling pathways like the NF- κ B and STAT3 pathways are upregulated in *ARID1A* deficient PDAC cells. Besides, these cells showed a higher resistance against apoptotic induction. This suggests that a pharmacological treatment of inflammatory signaling pathways might be a potential therapeutic strategy in *ARID1A*-deficient PDAC subtypes.

7. Literaturverzeichnis

- Abremski K, Hoess R (1984): Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 259, 1509–14
- Alas S, Bonavida B (2001): Rituximab Inactivates Signal Transducer and Activation of Transcription 3 (STAT3) Activity in B-Non-Hodgkin's Lymphoma through Inhibition of the Interleukin 10 Autocrine/Paracrine Loop and Results in Down-Regulation of Bcl-2 and Sensitization to Cytotoxic Drugs. *Cancer Res* 61, 5137–44
- Andricovich J, Perkail S, Kai Y, Casasanta N, Peng W, Tzatsos A (2018): Loss of KDM6A Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to BET Inhibitors. *Cancer Cell* 33, 512–26
- Arlt A, Schäfer H, Kalthoff H (2012): The 'N-factors' in pancreatic cancer: functional relevance of NF- κ B, NFAT and Nrf2 in pancreatic cancer. *Oncogenesis* 1, e35
- Au-Yeung N, Mandhana R, Horvath CM (2013): Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT* 2, e23931
- Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, Miller DK, Christ AN, Bruxner TJC, Quinn MC, et al. (2016): Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 47–52
- Baldwin AS (2001): Series Introduction: The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 107, 3–6
- Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–45
- Bardeesy N, DePinho RA (2002): Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2, 897–907
- Bártová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S (2008): Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J Histochem Cytochem* 56, 711–21
- Battaglia F, Delfino S, Merello E, Puppò M, Piva R, Varesio L, Bosco MC (2008): Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3 α /CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)- κ B. *J Leukoc Biol* 83, 648–62
- Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E (2001): Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20, 3354–62
- Block KM, Hanke NT, Maine EA, Baker AF (2012): IL-6 stimulates STAT3 and Pim-1 kinase in pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 41, 773–781
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Vries MV, Boom JH van, Eb AJ van der, Vogelstein B (1987): Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293–7
- Bossen C, Murre CS, Chang AN, Mansson R, Rodewald H-R, Murre C (2015): Brg1 activates enhancer repertoires to establish B cell identity and modulate cell growth. *Nat Immunol* 16, 775–84
- Brunner TB, Scott-Brown M (2010): The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma. *Radiat Oncol* 5, 64
- Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999): In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Neoplasia* 1, 50–62

- Bulajic M, Panic N, Löhr JM (2014): Helicobacter pylori and pancreatic diseases. *World J Gastro-intest Pathophysiol* 5, 380–3
- Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA (2006): One Thousand Consecutive Pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg* 244, 10–15
- Cheng F, Wang H-W, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, et al. (2003): A Critical Role for Stat3 Signaling in Immune Tolerance. *Immunity* 19, 425–36
- 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, 500–3
- Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C, Benes CH, Settleman J, Engelman JA, Bardeesy N (2011): STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res* 71, 5020–9
- Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–7
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014): Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49–63
- DiMagno EP (1999): Pancreatic cancer: clinical presentation, pitfalls and early clues. *Ann Oncol* 10 Suppl4, 140–2
- Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R (2014): Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int* 2014, 474905
- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005): NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446, 475–82
- Dykhuizen EC, Hargreaves DC, Miller E, Cui K, Korshunov A, Kool M, Pfister S, Cho Y-J, Zhao K, Crabtree GR (2013): mSWI/SNF (BAF) Complexes Facilitate Decatenation of DNA by Topoisomerase IIα. *Nature* 497, 624–7
- Eberhart A, Feodorova Y, Song C, Wanner G, Kiseleva E, Furukawa T, Kimura H, Schotta G, Leonhardt H, Joffe B, Solovei I (2013): Epigenetics of eu- and heterochromatin in inverted and conventional nuclei from mouse retina. *Chromosome Res* 21, 535–54
- Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–4
- Fang J-Z, Li C, Liu X-Y, Hu T-T, Fan Z-S, Han Z-G (2015): Hepatocyte-Specific Arid1a Deficiency Initiates Mouse Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 10, e0143042
- Faris JE, Blaszkowsky LS, McDermott S, Guimaraes AR, Szymonifka J, Huynh MA, Ferrone CR, Wargo JA, Allen JN, Dias LE, et al. (2013): FOLFIRINOX in Locally Advanced Pancreatic Cancer: The Massachusetts General Hospital Cancer Center Experience. *Oncologist* 18, 543–8
- Goni R, García P, Foissac S (2009): The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper* 1–9
- Guan B, Wang T-L, Shih I-M (2011): ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res* 71, 6718–27
- Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P,

- Sandgren EP, Barbacid M (2007): Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* 11, 291–302
- Gysin S, Rickert P, Kastury K, McMahon M (2005): Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer* 44, 37–51
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999): Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 17, 1474–81
- Hessmann E, Johnsen SA, Siveke JT, Ellenrieder V (2017): Epigenetic treatment of pancreatic cancer: is there a therapeutic perspective on the horizon? *Gut* 66, 168–79
- 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, 437–50
- 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, 469–83
- Hruban RH, Fukushima N (2007): Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. *Mod Pathol* 20 Suppl 1, S61–70
- Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143, 545–554
- Hruban RH, Maitra A, Goggins M (2008): Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 1, 306–16
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K (2009): An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell* 139, 693–706
- Jana A, Krett NL, Guzman G, Khalid A, Ozden O, Staudacher JJ, Bauer J, Baik SH, Carroll T, Yazici C, Jung B (2017): NF κ B is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget* 8, 37377–37393
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, et al. (2008): Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321, 1801–6
- Kalimuthu SN, Chetty R (2016): Gene of the month: SMARCB1. *J Clin Pathol* 69, 484–9
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000): Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621–63
- Kelso TWR, Porter DK, Amaral ML, Shokhirev MN, Benner C, Hargreaves DC (2017): Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *eLife* 6, e30506
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–57

- Kim M, Lu F, Zhang Y (2016): Loss of HDAC-Mediated Repression and Gain of NF- κ B Activation Underlie Cytokine Induction in ARID1A- and PIK3CA-Mutation-Driven Ovarian Cancer. *Cell Reports* 17, 275–88
- Kimura Y, Fukuda A, Ogawa S, Maruno T, Takada Y, Tsuda M, Hiramatsu Y, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T, et al. (2018): ARID1A Maintains Differentiation of Pancreatic Ductal Cells and Inhibits Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Gastroenterology* 155, 194–209
- King CC, Sastri M, Chang P, Pennypacker J, Taylor SS (2011): The Rate of NF- κ B Nuclear Translocation Is Regulated by PKA and A Kinase Interacting Protein 1. *PLoS One* 6, e18713
- Kopp JL, Dubois CL, Schaeffer DF, Samani A, Taghizadeh F, Cowan RW, Rhim AD, Stiles BL, Valasek M, Sander M (2018): Loss of Pten and Activation of Kras Synergistically Induce Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia From Pancreatic Ductal Cells in Mice. *Gastroenterology* 154, 1509–23
- Kowalewski A, Szyllberg Ł, Saganek M, Napiontek W, Antosik P, Grzanka D (2018): Emerging strategies in BRCA-positive pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 144, 1503–7
- Lee AYL, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, Kopp JL (2018): Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 1–12
- Leroy B, Girard L, Hollestelle A, Minna JD, Gazdar AF, Soussi T (2014): Analysis of TP53 Mutation Status in Human Cancer Cell Lines: A Reassessment. *Hum Mutat* 35, 756–765
- Liebermann TA, Baltimore D (1990): Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10, 2327–34
- Lièvre A, Bachet J-B, Corre DL, Boige V, Landi B, Emile J-F, Côté J-F, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, et al. (2006): KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 66, 3992–5
- Lin W-W, Karin M (2007): A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117, 1175–83
- Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee D-F, Chang Z, Li J, Peng B, Fleming JB, Wang H, et al. (2012): KrasG12D-Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 105–120
- Livshits G, Alonso-Curbelo D, Morris JP, Koche R, Saborowski M, Wilkinson JE, Lowe SW (2018): Arid1a restrains Kras-dependent changes in acinar cell identity. *eLife* 7, e35216
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK, Perrault J, Whitcomb DC (1997): Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst* 89, 442–6
- Luo J-L, Maeda S, Hsu L-C, Yagita H, Karin M (2004): Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6, 297–305
- Mathur R, Alver BH, San Roman AK, Wilson BG, Wang X, Agoston AT, Park PJ, Shivdasani RA, Roberts CWM (2017): ARID1A loss impairs enhancer-mediated gene regulation and drives colon cancer in mice. *Nat Genet* 49, 296–302
- Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A (2011): Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 141–150
- Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, Jacks T (2009): Requirement for

- NF- κ B signaling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* **462**, 104–7
- Milanovic M, Kracht M, Schmitz ML (2014): The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor κ B p65 is mediated by p65 phosphorylation. *Biochem J* **457**, 401–13
- Mino-Kenudson M, Castillo CF, Baba Y, Valsangkar NP, Liss AS, Hsu M, Correa-Gallego C, Ingkakul T, Johnston RP, Turner BG, et al. (2011): Prognosis of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm depends on histological and precursor epithelial subtypes. *Gut* **60**, 1712–20
- Morris JP, Wang SC, Hebrok M (2010): KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* **10**, 683–95
- Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE (1997): p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **57**, 2140–3
- Nagai H (2003): Configurational anatomy of the pancreas: its surgical relevance from ontogenetic and comparative-anatomical viewpoints. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **10**, 48–56
- Ndlovu 'Matladi N., Lint CV, Wesemael KV, Callebert P, Chalbos D, Haegeman G, Berghe WV (2009): Hyperactivated NF- κ B and AP-1 Transcription Factors Promote Highly Accessible Chromatin and Constitutive Transcription across the Interleukin-6 Gene Promoter in Metastatic Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol* **29**, 5488–504
- Neesse A, Algül H, Tuveson DA, Gress TM (2015): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* **64**, 1476–84
- Ong C-T, Corces VG (2012): Enhancers: emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep* **13**, 423–30
- Ormanns S, Esposito I, Siveke JT, Kirchner T, Neumann J (2014): Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. *Trillium Krebsmedizin* **23**, 110–5
- Pan D, Kobayashi A, Jiang P, de Andrade LF, Tay RE, Luoma AM, Tsoucas D, Qiu X, Lim K, Rao P, et al. (2018): A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. *Science* **359**, 770–5
- Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013): Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008672
- Pavlidou EN, Balis V (2020): Diagnostic significance and prognostic role of the ARID1A gene in cancer outcomes (Review). *World Acad Sci J* **2**, 49–64
- Plass C, Pfister SM, Lindroth AM, Bogatyrova O, Claus R, Lichter P (2013): Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet* **14**, 765–780
- 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* **1–9**
- Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE (2003): Loss of BRG1/BRM in Human Lung Cancer Cell Lines and Primary Lung Cancers: Correlation with Poor Prognosis. *Cancer Res* **63**, 560–6
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011): Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *J Vis Exp*
- Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A (2011): Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 573–87
- Ruxton G (2006): The Unequal Variance T-Test is an Underused Alternative to Student's T-Test

- and the Mann-Whitney U Test. *Behav Ecol* 17, 688–90
- Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D, Imesch P (2013): ARID1A Mutations and PI3K/AKT Pathway Alterations in Endometriosis and Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *Int J Mol Sci* 14, 18824–49
- Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, Pierotti MA, Porta GD, Barbacid M (1984): Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 223, 661–64
- Sen M, Wang X, Hamdan FH, Rapp J, Jessica Eggert, Kosinsky RL, Wegwitz F, Kutschat AP, Younesi FS, Gaedcke J, et al. (2019): ARID1A facilitates KRAS signaling-regulated enhancer activity in an AP1-dependent manner in colorectal cancer cells. *Clin Epigenetics* 11, 1–16
- Sen R, Baltimore D (1986): Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921–8
- Serasanambati M, Chilakapati SR (2016): Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) in Human Diseases-A Review. *sijbs* 2, 368–87
- Shen J, Peng Y, Wei L, Zhang W, Yang L, Lan L, Kapoor P, Ju Z, Mo Q, Shih I-M, et al. (2015): ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 5, 752–67
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019): Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69, 7–34
- Slack JM (1995): Developmental biology of the pancreas. *#Development* 121, 1569–80
- Spadi R, Brusa F, Ponzetti A, Chiappino I, Birocco N, Ciuffreda L, Satolli MA (2016): Current therapeutic strategies for advanced pancreatic cancer: A review for clinicians. *World J Clin Oncol* 7, 27–43
- Storz P (2017): Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 296–304
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998): The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17, 5001–14
- Strahl BD, Allis CD (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45
- Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, Arias D, Rolfo C, Trinh XB, van Dam PA (2017): The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 120, 141–150
- Tolstorukov MY, Sansam CG, Lu P, Koellhoffer EC, Helming KC, Alver BH, Tillman EJ, Evans JA, Wilson BG, Park PJ, Roberts CWM (2013): Swi/Snf chromatin remodeling/tumor suppressor complex establishes nucleosome occupancy at target promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10165–10170
- Trizzino M, Barbieri E, Petracovici A, Wu S, Welsh SA, Owens TA, Licciulli S, Zhang R, Gardini A (2018): The tumor suppressor ARID1A controls global transcription via pausing of RNA Polymerase II. *Cell Rep* 23, 3933–3945
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39–51
- Waddell N, Pajic M, Patch A-M, 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 D, Chen Y, Pan K, Wang W, Chen S, Chen J, Zhao J, Lv L, Pan Q, Li Y, et al. (2012): Decreased Expression of the ARID1A Gene Is Associated with Poor Prognosis in Primary Gastric Cancer. *PLOS ONE* 7, e40364
- Wang GG, Allis CD, Chi P (2007a): Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 13, 363–72
- Wang GG, Allis CD, Chi P (2007b): Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 13, 373–80
- Wang L, Xie D, Wei D (2019): Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. *Methods Mol Biol* 1882, 299–308
- Wang SC, Nassour I, Xiao S, Zhang S, Luo X, Lee J, Li L, Sun X, Nguyen LH, Chuang J-C, et al. (2018): SWI/SNF component ARID1A restrains pancreatic neoplasia formation. *Gut* 1–12
- Wang W, Friedland SC, Guo B, O'Dell MR, Alexander WB, Whitney-Miller CL, Agostini-Vulaj D, Huber AR, Myers JR, Ashton JM, et al. (2019): ARID1A, a SWI/SNF subunit, is critical to acinar cell homeostasis and regeneration and is a barrier to transformation and epithelial-mesenchymal transition in the pancreas. *Gut* 68, 1245–58
- Wang Z, Li Y, Zhan S, Zhang L, Zhang S, Tang Q, Li M, Tan Z, Liu S, Xing X (2019): SMAD4 Y353C promotes the progression of PDAC. *BMC Cancer* 19, 1037
- Wasif N, Ko CY, Farrell J, Wainberg Z, Hines OJ, Reber H, Tomlinson JS (2010): Impact of Tumor Grade on Prognosis in Pancreatic Cancer: Should We Include Grade in AJCC Staging? *Ann Surg Oncol* 17, 2312–20
- Watanabe R, Ui A, Kanno S, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, Yasui A (2014): SWI/SNF Factors Required for Cellular Resistance to DNA Damage Include ARID1A and ARID1B and Show Interdependent Protein Stability. *Cancer Res* 74, 2465–75
- Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH (2013): Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA Cancer J Clin* 63, 318–48
- Wu R-C, Wang T-L, Shih I-M (2014): The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. *Cancer Biol Ther* 15, 655–64
- Xu Y, Liu J, Nipper M, Wang P (2019): Ductal vs. acinar? Recent insights into identifying cell lineage of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Pancreat Cancer* 2, 1–12
- Yeo TP (2015): Demographics, Epidemiology, and Inheritance of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Seminars in Oncology* 42, 8–18
- Yin G, Kistler S, George SD, Kuhlmann N, Garvey L, Huynh M, Bagni RK, Lammers M, Der CJ, Campbell SL (2017): A KRAS GTPase K104Q Mutant Retains Downstream Signaling by Offsetting Defects in Regulation. *J Biol Chem* 292, 4446–56
- Zeligs KP, Neuman MK, Annunziata CM (2016): Molecular Pathways: The Balance between Cancer and the Immune System Challenges the Therapeutic Specificity of Targeting Nuclear Factor- κ B Signaling for Cancer Treatment. *Clin Cancer Res* 22, 4302–8
- Zhang L, Wang C, Yu S, Jia C, Yan J, Lu Z, Chen J (2018): Loss of ARID1A Expression Correlates With Tumor Differentiation and Tumor Progression Stage in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 17, 1–10
- Zhang Y, Xu X, Zhang M, Bai X, Li H, Kan L, Niu H, He P (2014): ARID1A is downregulated in

non-small cell lung cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Tumor Biol* 35, 5701–7

Zhao B, Lin J, Rong L, Wu S, Deng Z, Fatkhutdinov N, Zundell J, Fukumoto T, Liu Q, Kossenkova A, et al. (2019): ARID1A promotes genomic stability through protecting telomere cohesion. *Nat Commun* 10, 4067

Zor T, Selinger Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 236, 302–308

Danksagung

Mit dem nun abgeschlossenen Dokument meiner Doktorarbeit blicke ich auf eine spannende und lehrreiche Zeit zurück, für die ich mich bei allen bedanken möchte, die hinter mir gestanden haben. Bedanken möchte ich mich hierbei bei meiner Arbeitsgruppe der AG Heßmann, vor allem meiner großartigen Betreuerin und Doktormutter PD Dr. med. Elisabeth Heßmann. Weiterhin danke ich der AG Ellenrieder, insbesondere Frau Kristina Reutlinger, der AG Neesse und der AG Shiv. Besonderer Dank gebührt dabei vor allem Frau Waltraut Kopp für die Einarbeitung und unermüdliche Hilfsbereitschaft und Frau Jessica Spitalieri für alle Hilfe im Labor, am Wochenende und am Telefon. Frau Zhe Zhang danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellung. Weiterhin danke ich meinem Zweitbetreuer PD Dr. med. Marian Grade, Dr. med. Hannibal Bohnenberger und Prof. Dr. Steven A. Johnsen für die gute Kooperation. Außerdem an meine Laborgefährtn Frau Dimitra Spyropoulou und den Rest der Gruppe der Labormediziner, die das Arbeiten definitiv deutlich unterhaltsamer gestaltet haben.

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an die Deutsche Krebshilfe für die finanzielle und ideelle Unterstützung im Rahmen des Mildred-Scheel-Doktorandenprogramms.