

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Protein-Phosphatase 2A als pharmakologisches Zielprotein in
Pankreaskarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Alessa Kristin Leydecker
aus Speyer

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
FORMELVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1 LITERATURDISKUSSION	1
1.1 MECHANISMEN DER KREBSENTSTEHUNG	1
1.2 PANKREASKARZINOM	3
1.2.1 <i>Tumorpathogenese</i>	4
1.2.2 <i>Therapie des Pankreaskarzinoms</i>	5
1.3 DNA DAMAGE RESPONSE (DDR)	8
1.4 PROTEIN-PHOSPHATASE 2A (PP2A)	11
1.5 1,10-PHENANTHROLIN-5,6-DION (PD)	14
2 ZIELSETZUNG	15
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 <i>Geräte</i>	17
3.1.2 <i>Labormaterialien</i>	18
3.1.3 <i>Software</i>	18
3.1.4 <i>Chemikalien</i>	19
3.1.5 <i>Puffer und Lösungen</i>	20
3.1.6 <i>Polyacrylamidgele</i>	21
3.1.7 <i>Medium und Mediumzusätze</i>	21
3.1.8 <i>Zelllinien</i>	22
3.1.9 <i>Inhibitoren</i>	22
3.1.10 <i>Antikörper</i>	23
3.1.10.1 <i>Primäre Antikörper</i>	23
3.1.10.2 <i>Sekundäre Antikörper</i>	23
3.2 METHODEN	24
3.2.1 <i>Zellkultur</i>	24
3.2.1.1 <i>Auftauen der Zellen</i>	24
3.2.1.2 <i>Erhaltungskultur</i>	25
3.2.1.3 <i>Bestimmung der Zellzahl und Aussaat</i>	25
3.2.1.4 <i>Behandlung</i>	26
3.2.2 <i>Western Blot-Analyse</i>	27
3.2.2.1 <i>Ernte</i>	27
3.2.2.2 <i>Herstellung der Proteinlysate</i>	27

3.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	28
3.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese	28
3.2.2.5 Western Blot-Analyse	29
3.2.3 <i>Durchflusszytometrie</i>	30
3.2.3.1 Analyse der Zellzyklusverteilung (SubG1-Messung)	31
3.2.3.2 Bestimmung der Apoptoserate	32
4 ERGEBNISSE	34
4.1 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE EFFEKTE EINER PD-BEHANDLUNG AUF MURINE PDAC-ZELLEN	34
4.1.1 <i>Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate muriner PDAC-Zellen</i>	34
4.1.1.1 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinien 9591 und 3250	35
4.1.1.2 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinie 5436	37
4.1.1.3 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinie W22	38
4.1.2 <i>Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach PD-Behandlung muriner PDAC-Zellen</i>	39
4.1.3 <i>Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung muriner PDAC-Zellen</i>	41
4.1.3.1 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinien 9591 und 3250	42
4.1.3.2 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinie 5436	45
4.1.3.3 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinie W22	48
4.2 MORPHOLOGISCHE UNTERSCHIEDE MURINER PDAC-ZELLEN	49
4.3 PD-INDUZIERTE ZELLTOXIZITÄT MURINER PDAC-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BEHANDLUNGSDAUER	51
4.4 REAKTION VERSCHIEDENER MURINER PDAC-ZELLINIEN AUF PD IM VERGLEICH	52
4.5 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE EFFEKTE EINER PD-BEHANDLUNG AUF HUMANE PDAC-ZELLEN	54
4.5.1 <i>Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der humanen Zelllinie MIA PaCa-2</i> ..	54
4.5.2 <i>Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung humaner PDAC-Zelllinien</i>	56
4.6 REAKTION VERSCHIEDENER MURINER PDAC-ZELLINIEN AUF REPLIKATIONSSTRESS IM VERGLEICH ..	59
4.6.1 <i>Effekte einer Behandlung mit Hydroxyurea auf murine PDAC-Zelllinien</i>	59
4.6.2 <i>Effekte einer Behandlung mit MK-1775 auf murine PDAC-Zelllinien</i>	60
5 DISKUSSION	62
5.1 MESENCHYMALE ZELLINIEN ERHALTEN MEHR PR130 UND SIND PD-SENSITIV	62
5.2 P53 IST NICHT ESSENTIELL FÜR DEN ZELLTOD DURCH PD	66
5.3 PD-BEHANDLUNG HAT NUR GERINGEN EINFLUSS AUF ZELLZYKLUSVERTEILUNG	67
5.4 PR130 WIRD DURCH NOXA REGULIERT	68
5.5 ÜBEREXPRESSION VON BCL-XL KANN RESISTENTE ZELLINIEN VOR PD SCHÜTZEN	69
5.6 PD VERURSACHT PROTEOTOXISCHEN STRESS	70

5.7 MESENCHYMALE UND EPITHELIALE PDAC-ZELLINIEN UNTERSCHIEDEN SICH NICHT IN IHRER REAKTION AUF REPLIKATIONSSTRESS	71
6 ZUSAMMENFASSUNG	73
LITERATURVERZEICHNIS	75
ANHANG	86
DANKSAGUNG.....	88
CURRICULUM VITAE.....	89

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 STRUKTURELLER AUFBAU VON PP2A.....	12
ABBILDUNG 2: PD-INDUZIERTER ZELLTOXIZITÄT DER ZELLINIEN 9591 UND 3259 NACH 24 H UND 48 H.....	35
ABBILDUNG 3: PD-INDUZIERTER ZELLTOXIZITÄT DER ZELLINIE 5436 NACH 24 H UND 48 H	37
ABBILDUNG 4: PD-INDUZIERTER ZELLTOXIZITÄT DER ZELLINIE W22 NACH 24 H.....	38
ABBILDUNG 5: PD-INDUZIERTER ZELLZYKLUSVERTEILUNG DER ZELLINIEN 9591 UND 3250 NACH 24 UND 48 H	40
ABBILDUNG 6: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIEN 3250 UND 9591 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT PD43	
ABBILDUNG 7: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIE 5436 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT PD.....	46
ABBILDUNG 8: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIE W22 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT PD	48
ABBILDUNG 9: DIGITALMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELLINIEN 9591 (OBEN) UND 3250 (UNTEN)	50
ABBILDUNG 10: PD-INDUZIERTER ZELLTOXIZITÄT DER ZELLINIEN 9591 (OBEN) UND 3250 (UNTEN) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BEHANDLUNGSDAUER.....	51
ABBILDUNG 11: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIEN S411, 8248, 3250, S821, 8296 UND 9591 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT PD.....	53
ABBILDUNG 12: PD-INDUZIERTER ZELLTOXIZITÄT DER ZELLINIEN MIA PACA-2 UND MIA PACA-2 NOXA KO NACH 24 H UND 48 H.....	55
ABBILDUNG 13: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIEN MIA PACA-2 UND MIA PACA-2 NOXA KO	57
ABBILDUNG 14: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIEN S411, 8248, 3250, S821, 8296 UND 9591 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT HU	60
ABBILDUNG 15: WESTERN BLOT-ANALYSE DER ZELLINIEN S411, 8248, 3250, S821, 8296 UND 9591 NACH 24 H BEHANDLUNG MIT MK.....	61

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GERÄTE.....	17
TABELLE 2: LABORMATERIALIEN.....	18
TABELLE 3: SOFTWARE	18
TABELLE 4: CHEMIKALIEN	19
TABELLE 5: PUFFER UND LÖSUNGEN.....	20
TABELLE 6: POLYACRYLAMIDGELE.....	21
TABELLE 7: MEDIUM UND MEDIUMZUSÄTZE.....	21
TABELLE 8: ZELLINIEN.....	22
TABELLE 9: INHIBITOREN	22
TABELLE 10: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	23
TABELLE 11: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.....	23

Formelverzeichnis

FORMEL 1: BERECHNUNG DER ZELLDICHTE	26
FORMEL 2: BERECHNUNG DES BENÖTIGTEN VOLUMENS AN ZELLSUSPENSION	26

Abkürzungsverzeichnis

2n	einfacher Chromosomensatz
4n	doppelter Chromosomensatz
5-FU	5-Fluoruracil
53BP1	p53-binding protein-1
Abb.	Abbildung
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATM	Ataxia Telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
BAK	BCL-2 homologous antagonist/killer
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BRCA1	breast cancer susceptibility protein-1
BRCA2	breast cancer susceptibility protein-2
BSA	Bovines Serumalbumin
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CDC25	cell division cycle 25
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHK1	Checkpoint-Kinase 1
CHK2	Checkpoint-Kinase 2
CKI	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
cl. Casp. 3	cleaved caspase 3
cl. PARP	cleaved Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
con	Kontrolle
CSC	Cancer Stem Cell
CT	Computertomographie
DBS	Doppelstrangbruch

DDR	DNA damage response
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma 4
DSB	DNA double-strand break
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
G1-Phase	gap 1 phase
G2-Phase	gap 2 phase
GPX4	Glutathionperoxidase 4
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HR	homologe Rekombination
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HSP90	Hitzeschockprotein 90
HU	Hydroxyurea
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPMN	Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie
K-RAS	Kirsten Rat Sarcoma
KAP1	KRAB-associated protein-1
KO	knockout
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCN	Muzinöse Zystische Neoplasie
MDC1	DNA damage checkpoint 1
min	Minute
MK	MK-1775

Mre11	meiotic recombination 11
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Variable der Anzahl
N-Cadherin	neurales Cadherin
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NHEJ	non-homologous end joining
NP-40	Nonidet® P 40
p-	phosphoryliert
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphate buffered saline
PD	1,10-phenanthrolin-5,6-dion
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PI	Propidiumiodid
PIC	Proteaseinhibitorcocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PS	Phosphatidylserin
R0	kein Residualtumor
RAF	rat fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RIPK3	receptor-interacting protein kinase-3
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
RPA	Replikationsprotein A
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S-Phase	synthesis phase
SCC	side scatter
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

sicon	siRNA Kontrolle
siRNA	small interfering ribonucleic acid
T	Threonin
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organisation
zVAD	z-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluormethylketon
γ H2AX	phosphoryliertes H2AX

1 Literaturdiskussion

1.1 Mechanismen der Krebsentstehung

In Deutschland wurde in den letzten fünf Jahren bei rund 1,7 Millionen Menschen eine Krebserkrankung diagnostiziert (Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2019b). Die Prognose für Betroffene ist hierbei stark abhängig von der Art des Tumors. Während maligne Neoplasien der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), der Lunge oder der Leber 5-Jahres-Überlebensraten von unter 20 Prozent verzeichnen, betragen diese bei Prostatakrebs oder dem malignen Melanom über 90 Prozent (Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2019b).

Der Begriff „Krebs“ beschreibt laut *World Health Organisation* (WHO) eine große Gruppe an Erkrankungen, welche jeglichen Part des Körpers betreffen können und sich durch die Bildung abnormer Zellen mit unkontrolliertem Wachstum auszeichnen. Diese Zellen besitzen zudem die Fähigkeit, sich in andere Gewebe oder Organe auszubreiten. Dies wird als Metastasierung bezeichnet und stellt oftmals die Ursache für das Versterben der Patienten dar (World Health Organisation 2020).

Grundsätzlich kann zwischen zwei Tumorarten unterschieden werden. Merkmale eines benignen Tumors sind ein begrenztes Zellwachstum mit geringeren Mitoseraten. Eine fibröse Kapsel grenzt den Tumor klar vom umliegenden Gewebe ab und im Gegensatz zum Malignom findet hier keine Metastasierung statt. Zellen in malignen Tumoren ähneln den Zellen, von welchen sie sich ableiten, weniger stark als bei gutartigen Tumoren. Es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum mit hohen Mitoseraten. Des Weiteren besitzt der Tumor die Fähigkeit, benachbartes Gewebe zu infiltrieren und Metastasen zu bilden (Aigner et al. 2016).

Anhand der Gewebe, aus denen maligne Entartungen hervorgehen, ist eine weitere Differenzierung möglich. Den überwiegenden Anteil der bösartigen Neubildungen bilden Karzinome, welche ihren Ursprung in epithelialen Zellen der inneren und äußeren Körperoberfläche besitzen. Insgesamt etwa 70 % der Tumoren gehen vom Drüsengewebe aus und werden dementsprechend als Adenokarzinome bezeichnet. Des Weiteren sind Entartungen des Binde- und Stützgewebes (Sarkome), der Stützzellen des Nervensystems (Gliome) und der pigmentbildenden Zellen (Melanome) zu differenzieren. Auch blutbildende Zellen des Knochenmarks oder lymphatische Organe können Ursprung einer bösartigen Krebserkrankung sein, welche in diesem Fall als Leukämie bzw. Lymphom bezeichnet wird (Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2019b).

Trotz der morphologischen Unterschiede verschiedener Tumorarten liegt der gemeinsame Auslöser der Kanzerogenese in der Entstehung von DNA-Schäden, welche Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen nach sich ziehen (Aigner et al. 2016; Basu 2018). Im Rahmen der onkogenen Aktivierung findet die Umwandlung eines Proto-Onkogens in ein Onkogen statt. Da die Produkte der Proto-Onkogene in Vorgänge wie Zellteilung und -differenzierung involviert sind, fördern die abnorme Expression des Onkogens sowie dessen veränderte Genprodukte maligne Transformation. Die Aktivierung des transformierten Onkogens *Rat sarcoma* (RAS) stellt eine entscheidende genetische Alteration im Rahmen der Tumorphathogenese des Pankreaskarzinoms dar und wird in 1.2.1 genauer beschrieben (Marshall and Nigg 1998; Diamandis 1992). Die ebenfalls im Rahmen der malignen Transformation essenziellen Tumorsuppressorgene sind negative Regulatoren des Zellwachstums. Deren Inaktivierung durch Mutationsereignisse führt dazu, dass sich Zellen ihrer Wachstumshemmung entziehen können, wodurch maligne Transformation ebenfalls gefördert wird (Marshall 1991; Diamandis 1992).

Mithilfe des Mehrstufenkonzepts der Karzinogenese, welches auf Isaak Beerensblum zurückzuführen ist, kann die Tumorgenese in drei Phasen untergliedert werden: Tumorinitiation, -promotion und -progression. Hierbei beschreibt die Phase der Initiation eine irreversible, vererbare Mutation im Genom der Zelle (Aktories et al. 2017). Neben zahlreichen chemischen Noxen, wie Tabakrauch, Aflatoxinen oder Nitroaromaten, können auch physikalische Gammastrahlung oder UV-Licht ursächlich für derartige Schädigungen des Erbguts sein (Basu 2018). Chronische Entzündungen wiederum können Wachstum und Fortschreiten des Tumors zusätzlich fördern (Balkwill and Mantovani 2001). Im folgenden Schritt der Promotion kommt es dadurch, dass die initiierte Zelle deutlich stärker als gesunde Zellen auf die teilungsstimulierende Wirkung eines Tumorpromotors reagiert, zur Zellvermehrung. Voraussetzung dafür sind weitere Mutationen in kritischen Genen. Die maligne Entartung der Zellen wird in der Progressionsphase erreicht; ausgelöst durch Karzinogene kommt es nun zur Transformation des gutartigen in einen bösartigen Tumor, der schließlich invasiv wächst und metastasiert (Aktories et al. 2017; Pitot 1989).

Hanahan und Weinberg beschreiben sechs „*Hallmarks of Cancer*“. Während der mehrstufigen Kanzerogenese werden diese von den betroffenen Zellen erworben. Diese sukzessiv gewonnenen Merkmale machen die Komplexität, mit welcher maligne

Transformation stattfindet, deutlich. Zu ihnen zählen die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung, das Umgehen von Tumorsuppressoren, die Resistenz gegen den Zelltod, die Ermöglichung einer replikativen Immortalität, die Induktion der Angiogenese, Aktivierung von Invasion und Metastasierung, Neuprogrammierung des Energiestoffwechsels und die Umgehung der Eliminierung durch das Immunsystem (Hanahan and Weinberg 2011).

1.2 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom zählt zu einer der weltweit tödlichsten Krebserkrankungen. Die WHO registrierte im Jahr 2020 insgesamt 495.773 neue Fälle, womit das Pankreaskarzinom die Zwölft häufigste aller Krebserkrankungen darstellte. Bezogen auf die Sterblichkeit belegte es mit weltweit 466.003 registrierten Todesfällen sogar Platz sieben (World Health Organisation: International Agency for Research on Cancer 2020). Die ungünstige Prognose zeigt sich auch in der 5-Jahres-Überlebensrate, welche in Deutschland laut aktueller Zahlen des Robert-Koch-Instituts (RKI) neun Prozent beträgt. Neben dem Mesencheliom zeigt das Pankreaskarzinom somit die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen (Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2019a).

Betroffen sind vor allem Männer zwischen 40 und 85 Jahren, wobei das Risiko mit zunehmendem Alter weiter ansteigt (Goral 2015). Neben dem Alter zählen jedoch auch Einflüsse wie Übergewicht, Rauchen, langjähriger Alkoholkonsum, bestehende chronische Pankreatitis, zystische Neoplasien des Pankreas sowie genetische Faktoren zu den klassischen Risikofaktoren (Herold 2019).

Die Diagnose in einem frühen, noch heilbaren Stadium gestaltet sich schwierig. Nur selten zeigen Betroffene Symptome, weshalb die Erkrankung häufig über einen längeren Zeitraum unerkannt bleibt (Kleeff et al. 2016; McGuigan et al. 2018). Beschwerden treten meist erst dann auf, wenn der Tumor das umliegende Gewebe infiltriert oder in andere Organe metastasiert hat. Zudem sind die auftretenden Symptome als unspezifisch einzuordnen; u. a. zählen hierzu Bauch- und Rückenschmerzen, obstruktiver Ikterus und Gewichtsverlust. Ausgelöst durch das Tumorwachstum können außerdem eine chronisch-obstruktive Pankreatitis oder im fortgeschrittenen Stadium eine Magenausgangsstenose mit Übelkeit und Erbrechen auftreten. Das Ausbleiben einer spezifischen Frühsymptomatik hat zur Folge, dass bei

Stellung der Diagnose bereits ca. 50 % der Patienten eine Metastasierung aufweisen (Loveday, Lipton, and Thomson 2019).

Bei klinischem Verdacht auf Pankreaskarzinom erfolgt nach sorgfältiger Anamnese und umfangreicher körperlicher Untersuchung die bildgebende Diagnostik. Methode der ersten Wahl stellt hier die Sonographie des Abdomens dar, welche bei unklarem Befund durch eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) ergänzt werden kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Biopsie oder einer Bestimmung der Tumormarker CEA und CA 19-9 im Rahmen einer Blutuntersuchung (Oettle et al. 2018).

Das häufigste Malignom des Pankreas bildet mit einem Anteil von über 95% das duktales Adenokarzinom, das meist im Bereich des Pankreaskopfs lokalisiert ist (Mostafa et al. 2017; Oettle et al. 2018). Im Gegensatz zu soliden Tumoren, welche die überwiegende Mehrheit an duktales Adenokarzinomen bilden, weisen zystische Läsionen meist eine günstigere Langzeitprognose auf (Adsay 2008). Daneben lässt sich außerdem die Gruppe der weitaus selteneren, nicht-duktales Adenokarzinome differenzieren. Dazu zählen Malignome wie der neuroendokrine Tumor des Pankreas, das Azinuszellkarzinom, das Pankreatoblastom und die solide pseudo-papilläre Neuoplasie (Mostafa et al. 2017).

1.2.1 Tumorpathogenese

Zur Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms wurden bereits verschiedene Theorien entwickelt, wobei der zelluläre Ursprung noch immer nicht vollkommen geklärt werden konnte. Es wird davon ausgegangen, dass der Ursprung des Tumors auf drei möglichen Vorläuferläsionen beruht. Dazu gehören die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die Muzinöse Zystische Neoplasie (MCN) sowie die Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie (IPMN) (Gnoni et al. 2013; Matthaei, Dal Molin, and Maitra 2013). Diese wiederum sollen sich aus pankreatischen Krebsstammzellen (CSC) gebildet haben (Goral 2015).

Untersuchungen der PanIN zeigten, dass diese Art der Läsion klonale Mutationen in krebsassoziierten Genen aufweist. Die Menge an zytologischen sowie morphologischen Änderungen korreliert hierbei mit der Intensität der genetischen Veränderungen bzw. der Mutationsereignisse (Matthaei, Dal Molin, and Maitra 2013; Luttges et al. 2001; Fukushima et al. 2002).

Anhand dieser Merkmale lassen sich bezogen auf die PanIN drei Grade differenzieren. Grad 1 wiederum kann in PanIN-1A, eine flache epitheliale Läsion, und PanIN-1B, eine flache epitheliale Läsion mit zusätzlich papillären, mikropapillären oder basal pseudostratifizierten Anteilen, unterteilt werden. PanIN-2 weist bereits ein gewisses Maß an nukleären Atypien auf, während PanIN-3 einem *carcinoma in situ* mit schweren Zellatypien entspricht (Hruban et al. 2001).

Studien ergaben, dass K-RAS-Mutationen, wie sie im invasiven duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu finden sind, ebenfalls bereits in PanIN nachgewiesen werden können. Die Zahl der Mutationen steigt mit zunehmendem Dysplasiegrad der Läsion (Lohr et al. 2005). Allerdings sind K-RAS-Mutationen teilweise bereits im gesunden Pankreas detektierbar, was darauf schließen lässt, dass derartige Veränderungen über einen gewissen Zeitraum bestehen können, ohne ein Fortschreiten der Läsion zu initiieren. Der konkrete Auslöser für die maligne Transformation der Läsion wird unter anderem in der Akkumulation von Mutationen vermutet, konnte jedoch bisher nicht im Detail geklärt werden (Luttges et al. 1999; Ott et al. 2007).

Mit zunehmendem Dysplasiegrad der Läsion sind weitere Genveränderungen feststellbar, welche mit denen des Pankreaskarzinoms übereinstimmen. Dazu zählen unter anderem die Hemmung der Expression der Tumorsuppressorgene p16, p53 sowie DPC4, aber auch die Überexpression von HER-2/neu (Wilentz et al. 1998; Norfadzilah et al. 2011; Hua et al. 2003; Tomaszewska et al. 1998; Talar-Wojnarawska and Malecka-Panas 2006).

1.2.2 Therapie des Pankreaskarzinoms

Die einzige therapeutische Option, welche derzeit potentiell zu einer vollständigen Heilung der Krebserkrankung führen kann ist die chirurgische R0-Resektion des Karzinoms (Piper 2013). Im Bereich des Resektionsrandes dürfen bei der postoperativen pathologischen Untersuchung somit keine Karzinomzellen mehr nachweisbar sein (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013). Da der Tumor aus den in 1.2 genannten Gründen jedoch meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist die kurative Entfernung des Karzinoms nur noch in 15-20 % der Fälle durchzuführen (Oettle et al. 2018). Eine bereits stattgefundene Fernmetastasierung schließt laut aktueller Leitlinie die

Resektion des Primärtumors aus (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013).

Im Rahmen der kurativen Operation sollte zum Pankreasgewebe, den Gallengängen und dem Magen ein Sicherheitsabstand von 1 mm eingehalten werden, um eine R0-Resektion zu ermöglichen. Die OP-Technik sowie der Umfang der Resektion umliegender Organe wie Magen und Duodenum richten sich hierbei nach der Lokalisation des Tumors (Oettle et al. 2018). Zusätzlich ist die Entfernung von mindestens zehn regionären Lymphknoten obligat (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013). Doch selbst nach vollständiger Tumorsektion fällt die Prognose für den Patienten ungünstig aus, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt dennoch nur etwa 25 % (Richter et al. 2003). Weiterhin besteht die Gefahr des Wiederauftretens der Erkrankung, wobei dies sich einerseits in Form von lokalen Rezidiven, aber auch als Fernmetastasen darstellen kann (Hishinuma et al. 2006). Es ist somit sinnvoll, die chirurgische Therapie durch eine adjuvante Chemotherapie zu ergänzen, da diese die Wahrscheinlichkeit für das Rezidivieren der Erkrankung deutlich reduzieren kann (Oettle et al. 2007). Die Wahl des Zytostatikums richtet sich hier vor allem nach dem Allgemeinzustand des Patienten. Während eine Therapie mit FOLFIRINOX, einem Kombinationspräparat aus 5-Fluoruracil (5-FU), Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin, gegenüber Gemcitabin zwar zu einer signifikanten Verlängerung der Lebenszeit führt, kommt es hier zum vermehrten Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen. Dazu zählen unter anderem Diarrhoe, Parästhesien, Müdigkeit, Übelkeit und Mukositis (Conroy et al. 2018). Verglichen mit Fluoruracil/Folinsäure führt eine Behandlung mit Gemcitabin bei gleicher Effektivität seltener zum Auftreten von Nebenwirkungen wie Stomatitis oder Diarrhoe (Neoptolemos et al. 2010). Da der postoperative Zustand der Patienten eine aggressive Therapie mit FOLFIRINOX häufig ausschließt, wird Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand die adjuvante Monotherapie mit Gemcitabin empfohlen. Bei Unverträglichkeit des Präparats kann auf Fluoruracil/Folinsäure ausgewichen werden. Aufgrund der signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit stellt FOLFIRINOX für Patienten mit gutem Allgemeinzustand eine geeignete adjuvante Therapieoption dar (Oettle et al. 2018).

Eine Empfehlung für die Durchführung einer adjuvanten Radiochemotherapie besteht derzeit aufgrund der unsicheren Studienlage nicht. Es konnte bisher kein sicherer Nutzen der Behandlung registriert werden. Auch in Bezug auf sogenannte *Targeted*

Therapies, Immuntherapien sowie Hyperthermie-Behandlungen sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, sodass zum jetzigen Zeitpunkt keine entsprechende Empfehlung ausgesprochen werden kann (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013).

Ist eine R0-Resektion nicht zu erreichen, bestehen die Behandlungsoptionen aus symptomlindernden operativen Eingriffen, beispielsweise zum Zwecke der Cholestasebeseitigung, einer Radiatio oder Chemotherapie, wobei sich das Therapiekonzept nach den individuellen Patientenbedingungen richtet (Piper 2013; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013). Abhängig davon kann unter Umständen auch bei primär nicht-resektablen Karzinomen eine Resektabilität mittels Radiochemotherapie oder Chemotherapie erreicht werden (Oettle et al. 2018).

Patienten, welche unter einem metastasiertem bzw. lokal fortgeschrittenem Karzinom leiden, werden nach dem palliativem Therapiekonzept behandelt. Je nachdem, ob der Patient bezogen auf seinen allgemeinen Gesundheitszustand als Chemotherapie-fähig eingeschätzt wird oder nicht, werden entweder eine palliative medikamentöse Tumortherapie mittels Zytostatika oder davon unabhängige supportive Behandlungsmaßnahmen durchgeführt (Oettle et al. 2018; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF 2013). In Bezug auf das palliative Behandlungskonzept stellt Gemcitabin das Standardtherapeutikum dar, da es im Vergleich zu 5-FU eine deutlich effektivere Linderung der Symptome sowie Verlängerung der Lebenszeit mit sich bringt (Burriss et al. 1997; Oettle et al. 2018). Klinische Studien konnten unter Gemcitabin Remissionsraten zwischen fünf und zehn Prozent registrieren (Oettle et al. 2018). Die Verabreichung von FOLFIRINOX sollte trotz überlegener Effektivität des Präparats aus den oben genannten Gründen nur bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand erfolgen (Conroy et al. 2011).

Da die Heilungsraten des Pankreaskarzinoms unter den heutigen Therapieoptionen noch immer unzureichend sind, ist eine stetige Weiterentwicklung von Behandlungskonzepten notwendig. Aktuelle Studien streben derzeit an, die individuellen Mutationsmuster der Patienten zu bestimmen, um daraus eine persönlich auf den Patienten abgestimmte Behandlungsstrategie zu entwerfen. Die Definition bestimmter Untergruppen anhand spezifischer molekularer Veränderungen erfordert intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit und bleibt eine vielversprechende Herausforderung für die Zukunft (Chantrill et al. 2015; Neoptolemos et al. 2018).

1.3 DNA Damage Response (DDR)

Jede Zelle des menschlichen Körpers ist täglich Tausenden von DNA-Schäden ausgesetzt (Lindahl and Barnes 2000; Jackson and Bartek 2009). Neben der Blockade von DNA-Replikation und -Transkription können diese Läsionen Mutationen hervorrufen, welche die Überlebensfähigkeit der Zelle bzw. des Organismus beeinträchtigen. Diese Mutationen treten dann auf, wenn DNA-Schäden nicht oder nur unzureichend repariert werden (Jackson and Bartek 2009). Um sich vor den möglichen Auswirkungen von DNA-Läsionen zu schützen, haben Zellen Mechanismen entwickelt, welche der Detektion von Schäden, der Signaltransduktion und schließlich der Reparatur des Schadens dienen. Diese Prozesse werden zusammenfassend als *DNA Damage Response* (DDR) bezeichnet (Harper and Elledge 2007; Rouse and Jackson 2002; Harrison and Haber 2006; Jackson and Bartek 2009)

Die Koordinierung der DNA-Schäden erfolgt vor allem über zwei Signalkaskaden: Den *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM)-CHK2- und den *ATM and Rad3 related* (ATR)-CHK1-Weg (Cimprich and Cortez 2008). Deren Aktivierung erfolgt über DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) oder einzelsträngige DNA und kann neben der Reparatur der Schäden auch zelluläre Vorgänge wie Apoptose oder Seneszenz vermitteln (Smith et al. 2010). Durch das Vorliegen von Doppelstrangbrüchen wird ATM rekrutiert, während einzelsträngige DNA die Aktivierung von ATR bewirkt (Suzuki, Kodama, and Watanabe 1999; Lee and Paull 2005; Zou and Elledge 2003; Smith et al. 2010). Die Aktivierung von ATR erfolgt somit während jeder S-Phase, um die Replikation geschädigter DNA und den frühzeitigen Mitoseeintritt der Zelle zu verhindern (Shechter, Costanzo, and Gautier 2004; Cimprich and Cortez 2008).

Im Rahmen der ATM-Aktivierung kommt es zur Autophosphorylierung der im inaktiven Zustand als Dimer oder Multidimer vorliegenden Kinase. Dies hat die Dissoziation des Dimers in teilaktive Monomere zur Folge (Bakkenist and Kastan 2003; Smith et al. 2010). Zusätzlich wird die Affinität von ATM gegenüber dessen Substraten über Wechselwirkungen mit dem Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN)-Sensorkomplex gesteigert (Lee and Paull 2007; Smith et al. 2010). Studien zeigten außerdem, dass die ATM-Aktivität durch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) beeinflusst wird. Um eine Phosphorylierung von ATM bei Serin (S) 1981 in unbeschädigten Zellen zu verhindern, unterliegt ATM einer konstitutiven Wechselwirkung mit der strukturellen Untereinheit PP2A-A und der katalytischen Untereinheit PP2A-C (Goodarzi et al. 2004; Goder et al.

2018). Göder et al. konnten zudem durch gezielte genetische Elimination der regulatorischen Untereinheit PR130 zeigen, dass diese die Dephosphorylierung von ATM durch PP2A fördert (Goder et al. 2018).

Nachdem die ATM-Monomere über Wechselwirkungen mit dem MRN-Komplex zu den DSBs rekrutiert wurden, können diese dort mit weiteren Substraten interagieren (Lee and Paull 2007; Smith et al. 2010).

Eines der frühesten Zielproteine stellt H2AX dar, dessen Aktivierung über Phosphorylierung an S139 erfolgt (Scully and Xie 2013; Kuo and Yang 2008). Diese Aktivierung von H2AX als Reaktion auf DSBs und blockierte Replikationsgabeln kann neben ATM auch durch ATR oder die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) erfolgen (Smith et al. 2020; Burma et al. 2001). Rogakou et al. zeigten anhand ihrer Studien die schnelle Bildung von phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) in Zellen nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und stellten fest, dass diese Reaktion durch verschiedene Ereignisse, welche DSBs erzeugen, hervorgerufen wird (Rogakou et al. 1998). Innerhalb der phosphorylierten γ H2AX-Moleküle kommt es zur Herdbildung, wobei von einer direkten Korrelation zwischen der Anzahl der DNA-DSBs und der Menge an γ H2AX-Foci ausgegangen wird (Sedelnikova et al. 2002). Anschließend kann γ H2AX weitere Faktoren wie MDC1 rekrutieren, was wiederum die Rekrutierung des MRN-Komplexes über Interaktion zwischen MDC1 und Nbs1 zur Folge hat (Chapman and Jackson 2008; Scully and Xie 2013). Der MRN-Komplex behält seine Fähigkeit, ATM zu aktivieren auch in Distanz zu dem DNA-Schaden. Das bedeutet, dass MDC1 die ATM-Antwort zusätzlich verstärken kann. Es kommt zu einer positiven Rückkopplungsschleife, welche zur Akkumulation von ATM und der erleichterten ATM-abhängigen Phosphorylierung von γ H2AX führt (Lou et al. 2006; Scully and Xie 2013).

Des Weiteren erleichtert MDC1 die Akkumulation von *p53-binding protein-1* (53BP1) und *breast cancer susceptibility protein-1* (BRCA1), welche gleichzeitig auch direkte Substrate von ATM darstellen (Lavin 2008). Dadurch wird die DNA-Reparatur via *non-homologous end joining* (NHEJ) und homologer Rekombination (HR) gefördert. 53BP1 ist in der Lage, das NHEJ zu unterstützen, indem es die Resektion der DSB-Enden verhindert. BRCA1 hingegen nimmt eine entscheidende Rolle im Prozess der HR ein (Panier and Boulton 2014; Prakash et al. 2015; Smith et al. 2020).

Ein weiteres wichtiges Zielprotein von ATM stellt CHK2 dar. ATM phosphoryliert CHK2 an Threonin (T) 68, was zu dessen Aktivierung führt (Ahn et al. 2000). Aktiviertes CHK2

kann sich von der Schadensstelle lösen und rekrutiert nun verschiedene Substrate, die an Zellzyklusprogression, Apoptose und Gentranskription beteiligt sind. Zu diesen Substraten zählt u. a. p53 (Lukas et al. 2003; Smith et al. 2010; Smith et al. 2020). Die Aktivierung von p53 wird neben CHK2 auch durch ATM, ATR und CHK1 ausgelöst, was die Verknüpfung der Signalwege verdeutlicht (Smith et al. 2020). Aktiviertes p53 ist u. a. in der Lage, je nach Ausmaß der Schädigung, entweder den Zellzyklus zu stoppen, um eine Reparatur der Läsion zu ermöglichen, oder die Apoptose einzuleiten (Bourdon 2007).

Entscheidend für die Rekrutierung von ATR als Reaktion DNA-Schäden ist die Interaktion zwischen dem *ATR interacting protein* (ATRIP) und dem Replikationsprotein A (RPA), welches an einzelsträngige DNA gebunden vorliegt (Zou and Elledge 2003; Li, Pearlman, and Hsieh 2016). Nach der ATR-Aktivierung erfolgt die Koordinierung von Replikation, Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose über eine komplexe Signalkaskade (Li, Pearlman, and Hsieh 2016).

Eine wichtige Rolle stellt hier die Serin-Threonin-Kinase CHK1 dar (Cimprich and Cortez 2008). Deren Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung an S317 und S345 durch ATR (Zhao and Piwnica-Worms 2001). Aktives CHK1 kontrolliert die *cell division cycle 25* (CDC25)-Phosphatasen, welche für die Regulation der Zellzyklusübergänge verantwortlich sind (Boutros, Dozier, and Ducommun 2006; Cimprich and Cortez 2008; Boutros, Lobjois, and Ducommun 2007). Indem CHK1 die CDC25-Proteine phosphoryliert, kann deren Aktivität gehemmt und die Cyclin-abhängige Kinasen (CDK)-Aktivierung verhindert werden. Dadurch wird der Eintritt in die Mitose blockiert (Furnari, Rhind, and Russell 1997; Cimprich and Cortez 2008). Des Weiteren hemmt der ATR-CHK1-Signalweg das Auslösen von Replikationsursprüngen, was eine verlangsamte Replikationsrate unter Stressbedingungen zur Folge hat. Der genaue biochemische Mechanismus ist hier noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die CHK1-vermittelte WEE1-Aktivierung und CDC25A-Hemmung über die Hemmung von CDK2 zu einer Unterdrückung des Replikationsursprungs führt (Rundle et al. 2017).

Für die Koordination der DNA-Reparatur durch HR scheinen ATR und CHK1 ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen, indem sie die Aktivierung wichtiger HR-Regulationsproteine, wie BRCA1, RAD51 und BRCA2, vermitteln (Narayanaswamy et al. 2016; Tibbetts et al. 2000; Sorensen et al. 2005; Rundle et al.

2017). Sie sind daher für die Aufrechterhaltung der DNA-Integrität von großer Bedeutung (Rundle et al. 2017).

1.4 Protein-Phosphatase 2A (PP2A)

Die Eigenschaften und Funktionen von Proteinen können durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Dies geschieht durch die Anlagerung funktioneller Gruppen. Je nach Art des gebundenen Moleküls kann u. a. zwischen Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung und Phosphorylierung unterschieden werden. Da ein Protein auf verschiedene Arten modifiziert werden kann, variiert dessen Funktion anhängig von seinem Modifikationszustand (Wang and Wang 2019).

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen stellt einen wichtigen Mechanismus in Bezug auf die Signaltransduktion dar. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die Phosphoregulation einer strengen Kontrolle und wird durch Proteinkinasen und -phosphatasen im Gleichgewicht gehalten (Reynhout and Janssens 2019).

Bei der Serin/Theronin-Phosphatase 2A (PP2A) handelt es sich um ein Enzym, das eine Vielzahl von Proteinen dephosphoryliert (Dzulko et al. 2020; Fowle, Zhao, and Grana 2019). PP2A kann dadurch verschiedene zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus, Apoptose, Stoffwechsel und Wachstum, regulieren (O'Connor et al. 2018). Im Rahmen zahlreicher Erkrankungen kommt es zur Dysregulation dieses Enzyms. Dazu zählen neben Morbus Alzheimer, Autoimmunerkrankungen oder Diabetes mellitus auch verschiedene Krebserkrankungen (Sontag and Sontag 2014; Crispin, Hedrich, and Tsokos 2013; Kowluru and Matti 2012; Ruvolo 2016; Reynhout and Janssens 2019). Strukturell liegt PP2A in der Regel als dimerer oder trimerer Komplex vor, welcher aus einer strukturellen A-Untereinheit (PP2A-A α /A β), einer katalytischen C-Untereinheit (PP2A- C α /C β) und einer regulatorischen B-Untereinheit (PP2A-B) besteht (s. Abb. 1). Dadurch, dass der dimere Komplex aus A- und C-Untereinheit an eine Vielzahl von regulatorischen Untereinheiten vom B-Typ binden kann, ist die Ausbildung verschiedener trimerer Komplexe möglich. Innerhalb des Komplexes sind dessen katalytische Aktivität, die zelluläre Lokalisation und die Substratselektivität abhängig von der Art der B-Typ-Untereinheit. Diese ist somit maßgeblich für die Funktion des Holoenzym verantwortlich (Lambrecht et al. 2013; Dzulko et al. 2020; Janssens and Goris 2001). Derzeit sind 15 verschiedene Gene bekannt, welche u. a. über alternatives Spleißen mindestens 26 verschiedene Isoformen der B-Untereinheit codieren (Eichhorn, Creighton, and Bernards 2009). Zu diesen Isoformen gehört auch

PR130 (B''α1), welches sich ebenso wie PR72 (B''α2) von dem Gen PPP2R3A ableitet. Während PR72 nur in Herz- und Skelettmuskelgewebe exprimiert wird, lässt sich PR130 in verschiedenen Gewebearten nachweisen und ist an der Steuerung tumorrelevanter Funktionen in diversen Arten von Krebszellen beteiligt (Dzulko et al. 2020).

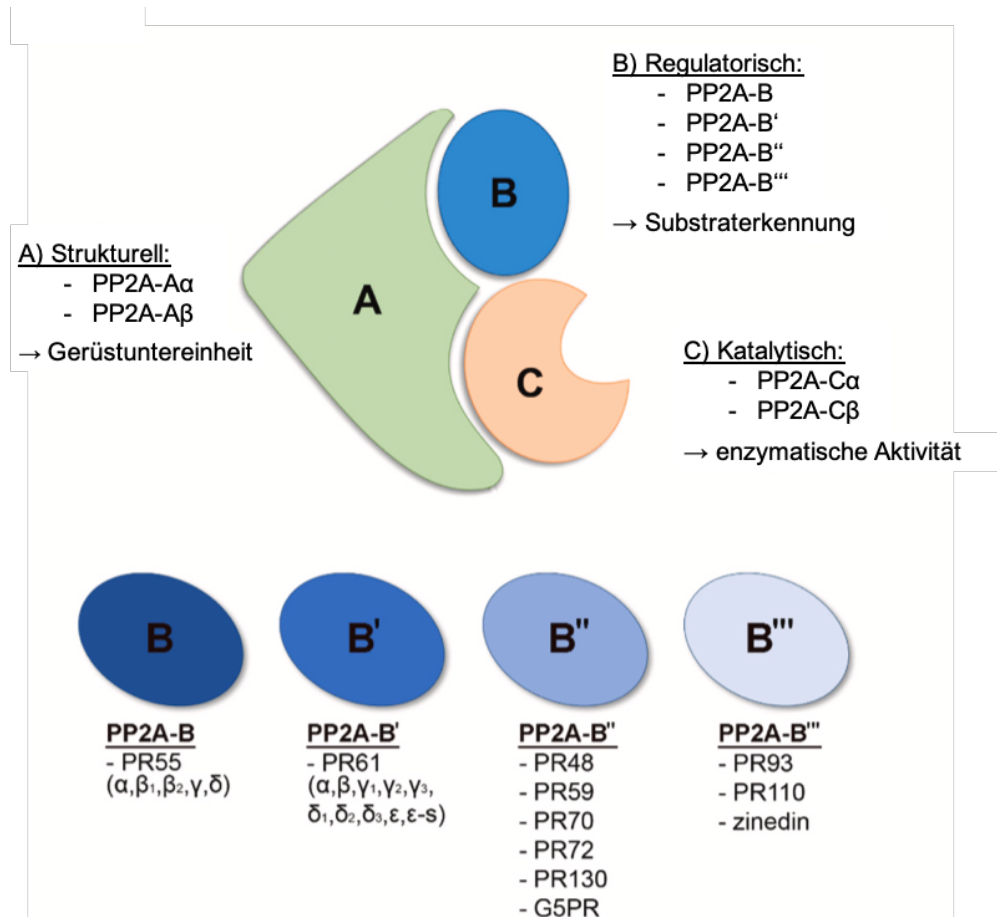


Abbildung 1 Struktureller Aufbau von PP2A

Übersicht über den Aufbau des PP2A-Proteins mit seinen Untereinheiten PP2A-A (strukturell), PP2A-B (regulatorisch) und PP2A-C (katalytisch) und deren Isoformen (Dzulko et al. 2020). Modifiziert nach (Dzulko et al. 2020).

Indem PP2A die Aktivität der primären (ATM, ATR, DNA-PK) und sekundären Kinasen (CHK1, CHK2) reguliert, kann sie in die DDR eingreifen (Ramos et al. 2019).

Es wird unter anderem berichtet, dass PP2A in unbeschädigten Zellen mit ATM interagiert und somit die Autophosphorylierung an S1981 unterdrückt (s. 1.3). Erst als Reaktion auf DNA-Schäden dissoziieren PP2A und ATM, was die

Autophosphorylierung von ATM und somit die Rekrutierung weiterer Substrate der DDR erlaubt (Goodarzi et al. 2004; Kalev et al. 2012). Zudem konnten Göder et al. zeigen, dass die Untereinheit PR130 die Phosphorylierung von ATM durch PP2A fördert (Goder et al. 2018).

Ähnliche Effekte konnten in Bezug auf CHK1 und CHK2 registriert werden. Es wird davon ausgegangen, dass PP2A an der Regulation von CHK1 beteiligt ist, da eine PP2A-Hemmung in Abwesenheit von DNA-Schäden die Akkumulation von S317/S345-phosphoryliertem CHK1 zur Folge hat (Leung-Pineda, Ryan, and Piwnicka-Worms 2006; Yan et al. 2010). Des Weiteren stellt die B'-regulatorische Untereinheit von PP2A einen CHK2-Bindungspartner dar. DNA-DSBs führen zur Dissoziation beider Proteine, wodurch eine Zunahme der ATM-abhängigen Phosphorylierung von CHK2 an S33 und S35 ausgelöst wird (Freeman, Dapic, and Monteiro 2010).

Untersuchungen an JB6-Zellen zeigten außerdem, dass PP2A für die Dephosphorylierung von p53 an S15 verantwortlich ist und so den apoptotischen Bak-p53-Signalweg hemmen kann (Qin et al. 2008).

Einen weiteren Einfluss auf die DDR hat PP2A, indem es zusammen mit γ H2AX in DNA-Schadensherden lokalisiert ist und γ H2AX dephosphorylieren kann. Die Rekrutierung von PP2A ist in diesem Fall H2AX-abhängig. Eine PP2A-Hemmung führt zu persistierenden DNA-Foci, welche neben einer ineffizienten DNA-Reparatur auch eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen auf DNA-Schäden zur Folge haben (Chowdhury et al. 2005; Yan et al. 2010).

Durch die Bildung verschiedener heterotrimerer Holoenzyme ist PP2A somit in der Lage, eine Vielzahl von zellulären Prozessen zu beeinflussen (Wlodarchak and Xing 2016). Aufgrund der Komplexität des PP2A-Aufbaus sowie der Vielzahl an Signalwegen, über welche PP2A wirkt, ist das Verständnis über den genauen Wirkmechanismus noch immer begrenzt (Kiely and Kiely 2015). Zudem sollen Forschungsarbeiten mit Medikamenten, welche die PR130-Expression modulieren bzw. die Aktivität von PP2A beeinflussen, weitere krebisrelevante Eigenschaften von PR130 aufdecken. Das kann die Grundlage zur Entwicklung einer Krebstherapie, welche auf abnormal aktivierte PP2A-Komplexe abzielt, schaffen (Dzulko et al. 2020).

1.5 1,10-phenanthrolin-5,6-dion (PD)

Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg beschreibt einen der am häufigsten mutierten Signalkaskaden im Rahmen von Krebserkrankungen (Davies et al. 2002; Yue et al. 2020). Auch das Pankreaskarzinom weist entsprechende Mutationen auf, die zu einer konstitutiven Förderung des aktiven MAPK-Signalwegs führen (Yue et al. 2020). Die Aktivierung des Signalwegs trägt zur Zellproliferation und dem -überleben bei und fördert dadurch die Initiation und Progression des Tumors (McCubrey et al. 2007; Yue et al. 2020). Entsprechende Mutationen betreffen unter anderem K-RAS, dessen Mutation, wie bereits in 1.2.1 erläutert, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Pankreaskarzinoms zu spielen scheint (Patnaik 2018; Desterke et al. 2011; Davies et al. 2002; Muzumdar et al. 2017; Yue et al. 2020). Bisher ist es jedoch kaum gelungen, Therapeutika zu entwickeln, die mutiertes RAS gezielt hemmen. Zudem besteht bei der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika die Gefahr, dass sich Zellen durch Eintritt in eine zelluläre Ruhephase deren Wirkung entziehen (Yeh and Ramaswamy 2015; Phan and Croucher 2020). Die pharmakologische Inhibition von PP2A soll deshalb eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung von Krebserkrankungen liefern, indem sie die DDR aktiviert, ohne dabei eine zelluläre Ruhephase zu erlauben (Yue et al. 2020).

Im Rahmen dieser Dissertation wird PD genutzt, um eine PP2A-Hemmung zu erreichen und die DDR auszulösen. PD ist ein *small molecule inhibitor*, welcher als Phenanthrolin-Derivat die Phosphataseaktivität hemmen kann (Urbanek et al. 2001) und die spezifische Inhibition der PP2A zur Folge hat (Yue et al. 2020). Diverse Studien stellten bereits fest, dass Phenanthrolinderivate die Zytotoxizität in Krebszellen fördern können (Pivetta et al. 2014; Deegan et al. 2006; Yue et al. 2020). Untersuchungen an Melanomzellen konnten die folgenden Effekte von PD nachweisen und somit die Bedeutung von PP2A für die DNA-Schadensantwort unterstreichen: In jeder der drei untersuchten Zelllinien hatte der Inhibitor das Auslösen der DDR durch die Aktivierung von ATM zur Folge. Der Zelltod wurde gefördert, ohne dabei einen Zellzyklusarrest zu erlauben (Yue et al. 2020).

Yue et al. konnten somit bereits zeigen, dass PD die Schadensantwort-Kaskade induzieren und die Proliferation von Krebszellen stoppen kann. Diese Effekte sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Pankreaskarzinomzellen untersucht werden.

2 Zielsetzung

Das Pankreaskarzinom stellt nach wie vor eine der tödlichsten Krebserkrankungen weltweit dar und weist laut RKI mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von neun Prozent zusammen mit dem Mesencheliom die schlechteste Prognose aller Krebserkrankungen auf (World Health Organisation: International Agency for Research on Cancer 2020; Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten 2019a). Einen Grund für die ungünstige Prognose stellt vor allem die oftmals späte Diagnosestellung dar. Patienten entwickeln meist nur unspezifische Symptome, sodass die Erkrankung meist über einen längeren Zeitraum unerkannt bleibt (Loveday, Lipton, and Thomson 2019). Zudem sind die heutigen Therapieoptionen noch immer unzureichend. Selbst nach vollständiger Tumorresektion, welche bei lediglich 15-20 % der Patienten noch durchgeführt werden kann (Oettle et al. 2018), liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei etwa 25 % (Richter et al. 2003). Dies macht eine stetige Weiterentwicklung von Behandlungsmöglichkeiten notwendig, weshalb sich aktuelle Studien derzeit unter anderem intensiv mit Therapieoptionen auf Grundlage individueller Mutationsmuster beschäftigen (Chantrill et al. 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation soll PP2A als mögliches pharmakologisches Zielprotein in Pankreaskarzinomzellen untersucht werden. Bei PP2A handelt es sich um eine Serin/Threonin-Phosphatase, welche an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt ist. Dazu gehören unter anderem die Regulation von Zellzyklus, Wachstum, Stoffwechsel und Apoptose (O'Connor et al. 2018). Zahlreiche Krankheiten, darunter auch verschiedene Krebserkrankungen, weisen eine Fehlregulation von PP2A auf (Chen et al. 2013). Dzulko et al. konnten den PR130-PP2A-Komplex bereits als Schlüsselprotein zur Steuerung tumorrelevanter Funktionen in verschiedenen Krebszellarten definieren (Dzulko et al. 2020). PP2A-Mutationen betreffen mit einem Anteil von 12 % am zweithäufigsten das PR130-Gen PPP2R3A. Innerhalb von 11 B-Typ-Untereinheit-Mutationen konnten PPP2R3A-Mutationen sogar am häufigsten nachgewiesen werden, was die Relevanz dieser PP2A-Untereinheit im Rahmen malignen Geschehen zusätzlich verdeutlicht (Sangodkar et al. 2016; Dzulko et al. 2020).

Obwohl eine Dysregulation von PR130 bereits in vielen Krebsarten nachgewiesen werden konnte, wurde die Bedeutung von PR130 in Pankreaskarzinomzellen bisher nicht untersucht. Diese Arbeit widmet sich daher nicht nur der Fragestellung, inwiefern PP2A ein pharmakologisches Zielprotein in Pankreaskarzinomzellen darstellen kann,

sondern beschäftigt sich zudem damit, welche Bedeutung die Untereinheit PR130 dabei einnimmt.

Um PP2A gezielt anzugreifen, wurden die Zellen mit PD behandelt. PD ist ein *small molecule inhibitor* von PP2A. Yue et al. konnten anhand von Melanomzellen bereits zeigen, dass PD in der Lage ist, die DDR zu induzieren und somit die Proliferation von Krebszellen zu stoppen (Yue et al. 2020). Diese Effekte liefern den Ausgangspunkt für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche und sollen nun an Pankreaskarzinomzellen untersucht werden.

Um die Auswirkungen eines direkten PP2A-Angriffs in Pankreaskarzinomzellen zu definieren, erfolgt zunächst die Behandlung muriner sowie humaner Krebszellen mit verschiedenen Konzentrationen an PD. Die Effekte der Behandlung auf den Zellzyklus sowie die Sterblichkeit der Zellen werden mittels durchflusszytometrischer Messungen bestimmt. Zudem werden Western Blot-Analysen durchgeführt, um die Ergebnisse der FACS-Messungen zu bestätigen und deren Mechanismen auf Proteinebene zu analysieren. Der Fokus liegt dabei vor allem auf dem Nachweis ausgewählter Schlüsselproteine der DDR. Mithilfe der beschriebenen Experimente sowie ergänzender Versuche mit den Inhibitoren Hydroxyurea (HU) und MK-1775 (MK) sollen schließlich generelle Merkmale herausgearbeitet werden, welche für die Sensitivität bestimmter PDAC-Zelllinien gegenüber einem PP2A-Angriff mittels PD verantwortlich sein können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra
Blottingapparatur Mini Trans-Blot®- Cell	Bio-Rad
CO2-Inkubator HeraCell 150	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Feinwaage Basic	Sartorius
Gefrierschrank GNP 2713	Liebherr
Gefrierschrank VIP Series -86°C Ultra-Low Temperature	SANYO
Gelgießapparatur	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Kühlschrank Liebherr IKB 2320 Comfort	Liebherr
Mikroskop Primovert	Zeiss
Mikroskop Rebel	Echo
Mini-Centrifuge, Tischzentrifuge	Roth
Photometer Sunrise Microplate Reader	Tecan
Pipet-Lite XLS (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Rainin
Pipet-X	Mettler Toledo
Pipette AutoRep E	Rainin
Rocking Platform	VWR
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Scientific
Sonifizier-Gerät UP2200Ht ultrasonic processor	Hielscher
Spannungsquelle PowerPac™ HC	Bio-Rad
Sterilbank LaminAir HB2472	Thermo Scientific
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage Precisa Junior 500	Precisa
Wasseraufbereitungssystem PURELAB Classic	ELGA LabWater
Wasserbad AQUAline AL 5	Lauda
Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System	Li-Cor Biosciences
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific

3.1.2 Labormaterialien

Tabelle 2: Labormaterialien

Material	Hersteller
CELLStar® Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-one
CELLStar® Zellkulturflaschen (40 mL, 200 mL)	Greiner Bio-one
CELLStar® Zellkulturplatten (6 Well, 12 Well, 96 Well)	Greiner Bio-one
CELLStar® Zellkulturschalen (6 cm)	Greiner Bio-one
Einmal-Skalpell	Feather
Einweghandschuhe Nitrile Powder-Free	Abena
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Falcon-Tubes (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-one
Filter-Pinzette	Millipore
Glaswaren	Schott Duran
Mini PROTEAN® Glass Plates	Bio-rad
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld-Superior Germany
Nitrozellulose-Membran Amersham Protan 0,2 µm NC	GE Healthcare Life
Pasteurpipetten	Roth
Pipette AutoRep E	Rainin
Pipette Tips Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1250 µL)	Greiner Bio-one
Safe Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf
Serologische Messpipetten aus Glas	Hirschmann Instruments™

3.1.3 Software

Tabelle 3: Software

Software	Hersteller
CellQuest Pro™ Software	BD Biosciences
Endnote X9.3.3	Clarivate Analytics
FACSDiva™ Software	BD Biosciences
GraphPad Prism 8.2.0	GraphPad Software Inc.
Image Studio Lite Version 5.2.5	Li-Cor Biosciences
Microsoft Office 2020	Microsoft
Odyssey Software	Li-Cor Biosciences

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Annexin V	Miltenyi Biotec
Aqua dest.	BRAUN
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue®	Merck
Dimethylsulfoxid	Roth
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Applichem
FACS clean	Becton Dickinson
FACS flow	Becton Dickinson
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
NEWBlot™ Nitro Strippingbuffer	Li-COR Biosciences
Nonidet® P40	Fluka
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PBS Dulbecco	Biochrom
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitorcocktail-Tablette	Roche
RNase A	Sigma-Aldrich
Salzsäure 37%	Roth
Sodiumdodecylsulfat	Roth
Tetramethylethylendiamin	Roth
Tris Puffer	Roth
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween®	Roth

3.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
10 x TBS-Puffer	20 mM Tris 1,4 M NaCl Ad. 1 L Aqua dest.
5 x Lämmli-Puffer	30 g Tris 144 g Glycin Ad. 1 L Aqua dest.
6 x Probenpuffer	375 mM Tris, pH 6,8 12 % SDS 30 % Glycerin 500 mM DTT 0,01% Bromphenolblau
Annexin V Puffer (1x)	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 140 nM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA
Blotpuffer	100 mL 5x Lämmli-Puffer 200 mL Ethanol Ad. 1 L Aqua dest.
Blockpuffer	5 %ig Milchpulver in TBS-T 0,1 % Tween
Bradford Reagenz	50 mg Coomassie Brilliant Blau® 25 mL Ethanol 50 mL Phosphorsäure Ad. 500 mL Aqua dest.
NET-N Lysepuffer 0,5 %	100 mM NaCl 10 mM 1M Tris-HCl, pH 8 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,5 % NP-40 Proteaseinhibitorcocktail-Tablette (Phosphataseinhibitor (1:100), DTT (1:1000)): 1 Tablette/10 mL
SDS-Elektrophoresepuffer	200 mL 5x Lämmli-Puffer 10 mL 10 % SDS Ad. 1 L Aqua dest.
TBS-T Puffer	100 mL 10x TBS 4 mL Tween® Ad. 1 L Aqua dest.

3.1.6 Polyacrylamidgele

Tabelle 6: Polyacrylamidgele

Gel	Zusammensetzung
7,5 %iges Trenngel (2 x 1 mm)	6,5 mL Aqua dest. 3 mL Tris, 1,5 M, pH 8,8 2,3 µL Acrylamid (40 %) 120 µL SDS (10 %) 60 µL APS (10 %) 6 µL TEMED
10 %iges Trenngel (2 x 1 mm)	5,6 mL Aqua dest. 3 mL Tris, 1,5 M, pH 8,8 3,1 µL Acrylamid (40 %) 120 µL SDS (10 %) 60 µL APS (10 %) 6 µL TEMED
15 %iges Trenngel (2 x 1 mm)	4,2 mL Aqua dest. 3 mL Tris, 1,5 M, pH 8,8 4,6 µL Acrylamid (40 %) 120 µL SDS (10 %) 60 µL APS (10 %) 6 µL TEMED
Sammelgel	4,4 mL Aqua dest. 0,76 mL Tris, 1,5 M, pH 8,8 0,76 µL Acrylamid (40 %) 60 µL SDS (10 %) 60 µL APS (10 %) 6 µL TEMED

3.1.7 Medium und Mediumzusätze

Tabelle 7: Medium und Mediumzusätze

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose	Sigma-Aldrich
Fötiales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Gibco

3.1.8 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Kultureigenschaft	Beschreibung
3250	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
5436	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren, p53R172h-Mutation
8248	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
8296	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
9591	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
MIA PaCa-2	Adhärent	Humane PDAC-Zelllinie, im Jahr 1975 isoliert aus Tumorgewebe eines 65-jährigen männlichen Patienten
MIA PaCa-2 NOXA knockout (KO)	Adhärent	Humane PDAC-Zelllinie, im Jahr 1975 isoliert aus Tumorgewebe eines 65-jährigen männlichen Patienten, CRISPR/Cas-knockdown von NOXA
S411	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
S821	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren
W22	Adhärent	Murine PDAC-Zelllinie isoliert aus primären Pankreastumoren, homozygote Deletion von p53

3.1.9 Inhibitoren

Tabelle 9: Inhibitoren

Inhibitor	Stockkonzentration	Katalognummer	Hersteller
1,10-phenanthrolin-5,6-dion	10 mM	496383-1G	Sigma-Aldrich
Hydroxyurea	100 mM	H8627	Sigma-Aldrich
MK-1775	1 mM	S1525	Selleck Chemicals

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primäre Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
AKT	Kaninchen	1:1000	ab32505	Abcam
ATM	Kaninchen	1:5000	CS-2873	Cell Signaling
β-actin	Maus	1:2000	SC-47778	Santa Cruz
BCL-XL	Kaninchen	1:1000	ab32370	Abcam
CHK1	Maus	1:1000	CS-2360	Cell Signaling
E-Cadherin	Kaninchen	1:500	CS-3195	Cell Signaling
ERK 1/2	Kaninchen	1:500	CS-9102	Cell Signaling
γH2AX ^(S139)	Kaninchen	1:500	SC-101696	Santa Cruz
HDAC1	Kaninchen	1:1000	CS-34589	Cell Signaling
HSP70	Maus	1:1000	SC-66048	Santa Cruz
HSP90	Maus	1:2000	SC-13119	Santa Cruz
N-Cadherin	Maus	1:500	BD610921	BD Biosciences
p21	Kaninchen	1:1000	ab109199	Abcam
p53	Kaninchen	1:500	NCL-p53-CM5p	Novocastra
pATM ^(S1981)	Kaninchen	1:750	ab81292	Abcam
pKAP1 ^(S824)	Kaninchen	1:2000	NB100-2350	Novus
pp53 ^(S15)	Kaninchen	1:5000	CS-9284	Cell Signaling
PR130	Kaninchen	1:500	NBP1-87233	Novus
RAD51 ^(H-92)	Kaninchen	1:1000	SC-8349	Santa Cruz
Vinculin	Maus	1:1000	SC-73614	Santa Cruz

3.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung in TBS-T	Hersteller
IgG Kaninchen IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Maus IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Kaninchen IRDye® 680RD	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Maus IRDye® 680RD	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Um Kontamination zu vermeiden und möglichst keimfreie Voraussetzungen zu schaffen, wurden sämtliche Arbeitsschritte mit Einmalhandschuhen unter einer Sterilbank mit laminarer Strömung durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden zuvor durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Desinfektion der Arbeitsflächen sowie der verwendeten Materialien und Instrumente fand 70 %iger Ethanol Anwendung.

Die kultivierten Zelllinien wurden regelmäßig auf mögliche Kontaminationen untersucht.

3.2.1.1 Auftauen der Zellen

Die Lagerung von Zellen, die zum entsprechenden Zeitpunkt nicht für Versuche benötigt wurden, fand bei -196 °C in flüssigem Stickstoff statt. Zum Schutz der Zellen vor möglichen Schäden, die durch den Gefriervorgang ausgelöst werden können, wurde zuvor Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzsubstanz hinzugegeben. Hierbei war zu beachten, dass DMSO bei Raumtemperatur zelltoxische Wirkungen aufweist und die Zellen diesem somit nur für einen möglichst kurzen Zeitraum ausgesetzt sein sollten.

Für den Auftauprozess selbst wurden in einem Reaktionsgefäß (Greiner, Kremsmünster) 5 mL Medium vorgelegt. Durch Zugabe einiger Milliliter des Mediums auf die gefrorenen Zellen und anschließendes Aufschwemmen (Resuspendieren) wurde ein möglichst schonendes Lösen der Zellen im Medium gewährleistet. Die gelöste Zellsuspension wurde anschließend wieder vollständig in das Greinerröhrchen überführt.

Zur notwendigen Entfernung des DMSO wurden die Zellen daraufhin bei 1300 *revolutions per minute* (rpm) für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt, während das entstandene Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt wurde.

Anschließend wurden die Zellen mindestens sieben Tage lang in Kultur gehalten, bevor sie für Experimente genutzt wurden.

3.2.1.2 Erhaltungskultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂. Zur Überwachung der Kultur fand eine regelmäßige Kontrolle der Zelldichte mittels Lichtmikroskop statt.

Um optimale Bedingungen für die Aufrechterhaltung der Zellkultur zu gewährleisten, wurde das Medium regelmäßig gewechselt und die Zellen bei einem Konfluenzgrad von ca. 80 % gesplittet. Der Vorgang des Passagierens soll ein zu dichtes Zellwachstum und folglich einen platzbedingten Nährstoffmangel mit Absterben der Zellen verhindern. Daher wurde das Splitten der Zellen etwa zwei bis drei Mal pro Woche in einem Verhältnis von 1:10, bzw. entsprechend der Zelldichte durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das alte Medium zunächst mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit wenigen Millilitern *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien adhärente Eigenschaften besitzen, war als nächster Schritt das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche erforderlich. Zu diesem Zweck wurden je nach Flaschengröße 1 bzw. 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung aufgetragen. Nach anschließendem Inkubieren für wenige Minuten wurde das vollständige Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Es folgte das Resuspendieren der Zellen in 4 bzw. 7 mL Medium. Je nach Konfluenzgrad wurde schließlich eine sinnvolle Menge der Zellen in der Kulturflasche belassen und mit frischem Medium entsprechend der Flaschengröße aufgefüllt. Die übrige Zellsuspension wurde entweder verworfen oder für weitere Experimente ausgesät.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat

Um die Zellen für Versuche nutzen und mit Inhibitoren behandeln zu können, ist eine Aussaat auf entsprechende Schalen notwendig, wobei die benötigte Zelldichte pro Well je nach Art des Experiments variieren kann. Während sich zu dünn ausgesäte Zellen durch ein nur sehr langsames Anwachsen am Boden des Kulturgefäßes auszeichnen, kommt es bei zu dicht ausgesäten Zellen frühzeitig zu Konfluenz und Kontakthemmung (Gstraunthaler and Lindl 2013). Damit die Zellen in einer adäquaten Dichte ausgesät werden können, ist darum eine vorherige Bestimmung der Zellzahl erforderlich.

Für das Zählen der Zellen wurden diese zunächst analog zu dem in 3.2.1.2 beschriebenen Vorgang von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst. Nach anschließender Resuspension der Zellen wurden 10 µL der Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Diese ist eingeteilt in vier Quadranten, welche wiederum in 16 quadratische Felder untergliedert sind. Die Anzahl aller Zellen in den vier Quadranten wurde mikroskopisch bestimmt und die Zelldichte anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Formel 1: Berechnung der Zelldichte

Daraufhin konnte mithilfe der berechneten Zelldichte die für die Aussaat benötigte Menge an Zellsuspension bestimmt werden.

$$\text{benötigtes Volumen der Zellsuspension} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{tatsächliche Zelldichte}}$$

Formel 2: Berechnung des benötigten Volumens an Zellsuspension

Es wurde schließlich eine geeignete Menge an Medium im entsprechenden Well vorgelegt, sodass diese zusammen mit der entsprechenden Menge an Zellsuspension ein für das genutzte Well adäquates Volumen ergibt.

3.2.1.4 Behandlung

Im Rahmen der Dissertation wurden die Zelllinien mit den Inhibitoren PD, Hydroxyurea (HU) und MK-1775 (MK) behandelt. Zwischen Aussaat und Behandlung der Zellen lagen mindestens 24 h.

Da PD in Pulverform vorliegt, wurde vor der Anwendung zunächst eine Stammlösung aus 0,002 g PD in 1 mL 100 %igem Ethanol angesetzt. Die Stockkonzentration betrug 10 mM. HU lag mit einer Stockkonzentration von 100 mM vor. Dafür wurden

0,0076 g HU in 1 mL PBS gelöst. Die MK-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM wurde aus 5 mg MK und 9,988 mL DMSO angesetzt.

Abhängig von der Versuchsreihe variierten die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren. Die zu pipettierenden Volumina wurden auf die verwendete Schalengröße angepasst, wobei bei Volumina von unter 2 µL eine Verdünnung (1:10, 1:100) mit Medium angesetzt wurde.

3.2.2 Western Blot-Analyse

3.2.2.1 Ernte

Nach einer Behandlungsdauer von 24 h wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde zunächst das Medium abpipettiert und in Greinerröhrchen überführt. Nach Waschen des Zellrasens mit 1 mL PBS und Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung wurden die gelösten Zellen in den entsprechenden, bereits mit Medium gefüllten Greinerröhrchen gesammelt.

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1300 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und der entstandene Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Das Zellpellet wurde daraufhin mit PBS gewaschen, in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und bei 1300 rpm für 5 min bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert.

Das PBS wurde schließlich abgesaugt und die Zellpellets bei -80 °C gelagert oder lysiert.

3.2.2.2 Herstellung der Proteinlysate

Zur Proteinextraktion aus den Zellpellets wurden diese zunächst in NET-N-Lysepuffer resuspendiert. Die Menge an verwendetem Lysepuffer richtete sich nach der Größe der entstandenen Zellpellets und betrug zwischen 80 und 130 µL.

Anschließend folgte das Sonifizieren der Zellen mit zehn Pumpschlägen pro Probe und einer Amplitude von 40 %. Daraufhin wurden die Proben bei 4 °C und 13.300 rpm für 25 min zentrifugiert. Der in diesem Schritt entstandene Überstand mitsamt der Proteine wurde nun in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

3.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um ein photometrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge in einer gegebenen Lösung. Sie ermöglicht das Auftragen von gleichmäßigen Proteinmengen in die Taschen des SDS-Gels und wurde deshalb vor jeder SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzeugen.

Genutzt wurde dazu der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue*. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass sein Absorptionsmaximum ohne gebundene Proteine bei 465 nm liegt; bindet der Farbstoff jedoch an die Seitenketten der Aminosäuren, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm (Goldring 2019). Im Rahmen dieser Verschiebung kommt es zu einem Farbumschlag von Rot zu Blau. Das jeweilige Absorptionsmaximum der Probe liefert somit Rückschlüsse über die darin enthaltene Proteinmenge.

Für die Bradford Proteinbestimmung wurden die Proben zunächst mit destilliertem Wasser verdünnt und auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Um die Proteinmenge im späteren Verlauf bestimmen zu können, wurden außerdem BSA-Proben bekannter Proteinkonzentration für die Erstellung einer Eichgeraden aufgetragen. Alle Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung pipettiert und mit 200 µL Bradford-Reagenz ergänzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption photometrisch.

Der Proteingehalt der Lysate konnte nun durch Vergleichen der Absorptionswerte der Proben mit denen des Standards errechnet werden. Entsprechend dieser Werte wurden die Proben schließlich für die folgende Gelelektrophorese angeglichen. Um alle Proteine zuverlässig detektieren zu können, sollten etwa 30-40 µg Protein pro Probe enthalten sein. Ein Sechstel des Probenvolumens wurde mit 6-fach-SDS-Probenpuffer angesetzt.

3.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese

Bei der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Labormethode, welche die Auftrennung von Proteingemischen anhand des Molekulargewichts der Proteine ermöglicht.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine durch die Poren der SDS-Gelmatrix. Die Größe der Poren ist abhängig von der verwendeten Gelkonzentration; mit steigender Konzentration nimmt die Größe der Poren ab. Wie

weit sich ein Protein durch die Gelmatrix in Richtung der Anode bewegen kann, wird zum einen durch das Molekulargewicht der Proteine, aber auch durch die Größe der Poren bestimmt (Matsumoto, Haniu, and Komori 2019).

Aus diesem Grund wurden die vorgefertigten Proben zunächst bei 95 °C erhitzt und die erhaltenen Proteine somit denaturiert. Durch Anlagerung des SDS, einem anionischen Detergens, an die denaturierten Proteine kam es zur Bildung von negativ geladenen Komplexen, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt wurden. Die Menge an SDS, die an ein Protein bindet, ist abhängig von der jeweiligen Größe des Proteins und bestimmt somit die Ladung des Komplexes und dadurch wie weit dieser im elektrischen Feld wandert (Smith 1994).

Die Anfertigung der SDS-Gele fand mindestens einen Tag vor der eigentlichen Gelelektrophorese statt. Sowohl Sammel- als auch Trenngel wurden entsprechend der in Tabelle 6 aufgeführten Zusammensetzungen hergestellt. Das Sammelgel zeichnet sich durch größere Poren aus und erzeugt ein Konzentrieren der Proben, während das Trenngel mit seinen kleineren Poren für die Auftrennung der Proteine sorgt.

Nachdem die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingebracht worden sind, wurde diese mit SDS-Elektrophoresepuffer befüllt. Anschließend wurden die Proben sowie 4 µL eines Markers in die Geltaschen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 95 V wurde die Elektrophorese gestartet; eine Erhöhung der Spannung auf 120 V fand nach erfolgreicher Konzentrierung der Proben statt.

3.2.2.5 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse dient der Bestimmung von Proteinen und deren Molekulargewicht und basiert auf spezifischen Antigen-Antikörper-Interaktionen. Ziel ist es hierbei, die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen und zu immobilisieren (Hnasko and Hnasko 2015).

Die Übertragung der Proteinbanden auf die Membran erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zum Gel ausgerichtet wurde. Die Stromstärke betrug hierbei 0,15 mA pro Gel. Die Nitrozellulosemembran war während des Blottings so in die Gitterkassette eingespannt, dass der Transfer der negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode vom Gel auf die Membran erfolgte. Die Gitterkassette selbst befand sich währenddessen in einer mit Blottingpuffer gefüllten Kammer. Nach etwa

2,5 h war der Prozess abgeschlossen und die Proteine im Muster der elektrophoretischen Auftrennung durch hydrophobe Wechselwirkungen auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für einige Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch 5 % Trockenmilch/TBS-T für 1 h bei RT geblockt. Die Inkubation im Primärantikörper erfolgte über Nacht auf einem Taumel-Rollenmischer bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde ein erneuter Waschvorgang mit TBS-T durchgeführt. Die Membranen wurden nun dreimal für jeweils 10 min gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte für 2 h bei RT die Inkubation der Membranen im Sekundärantikörper, welcher aufgrund seiner Fluoreszenzmarkierung für die spätere Detektion der Proteine notwendig ist. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit TBS-T für jeweils 10 min in abgedunkelten Waschschalen wurden die Proteinbanden mithilfe des Odyssey®-Infrared Imaging Systems detektiert.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Technologie der Durchflusszytometrie ermöglicht eine multiparametrische Untersuchung von Zellen in einer Lösung durch die Anwendung von Laserstrahlung. Einzelne Zellen oder Partikel werden analysiert, indem sie einen oder mehrere Laserstrahlen passieren (McKinnon 2018). Zuvor ist es wichtig, die Zellen im System durch hydrodynamische Fokussierung so zu trennen, dass der Laser jede Zelle einzeln mit einer konstanten Menge an Licht anregen kann (Buscher 2019). Die Zellen werden im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung zum einen auf sichtbare Lichtstreuung, aber auch auf Lichtsignale hin untersucht.

Die Streuung des sichtbaren Lichts findet abhängig von der relativen Größe der Zelle (*forward scatter*, FSC) und deren Granularität (*side scatter*, SCC) statt (McKinnon 2018). Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, kommt es zu einer Brechung des Laserlichts, wobei die Intensität des gebrochenen Lichts direkt proportional zum Volumen der Zelle ist. Der Detektor für das Vorwärtsstreulicht liegt hierbei direkt in einer Linie mit dem Laserstrahl. Der die Seitwärtsstreuung messende Lichtsensor hingegen ist im 90°-Winkel zum Anregungslaserstrahl platziert. Es besteht auch hier eine direkte Proportionalität von der gestreuten Lichtmenge zur Granularität der Zelle (Delude 2005).

Mithilfe von bestimmten Antikörpern, Rezeptoren oder Streptavidin können Proben fluoreszenzmarkiert werden und somit durch die Erzeugung von fluoreszierenden Lichtsignalen Auskunft über gewisse Eigenschaften der Zellen liefern (Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz 2020). Durch den Laserstrahl wird der Farbstoff angeregt und das emittierte Licht kann mithilfe eines Sensors detektiert werden (Delude 2005).

Die durchflusszytometrischen Messungen im Rahmen dieser Dissertation wurden am FACS Calibur durchgeführt. Aufgrund kurzzeitiger technischer Störungen fanden einzelne Messungen am FACS Canto II statt.

3.2.3.1 Analyse der Zellzyklusverteilung (SubG1-Messung)

Mithilfe der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Dies dient zum einen der Analyse der Zellverteilung in den Hauptphasen des Zellzyklus, zum anderen kann der Anteil an apoptotischen Zellen mit fraktionierter DNA auf diese Weise ermittelt werden (Darzynkiewicz, Huang, and Zhao 2017).

Zur Färbung der Zelle findet der Nukleinsäureninterkalator Propidiumiodid (PI) Anwendung. Da PI sehr basisch ist, kann es gut in den sauren Zellkern eindringen und sich dort an die DNA der Zelle anlagern. Der fluoreszierende Farbstoff wird durch den Laserstrahl angeregt, wobei die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zum DNA-Gehalt der jeweiligen Zelle ist. Nachdem die Zelle während der G1-Phase noch einen einfachen Chromosomensatz ($2n$) besitzt, kommt es im Rahmen der S-Phase zur DNA-Replikation, weshalb die DNA in der G2-Phase als doppelter Chromosomensatz ($4n$) vorliegt. Die SubG1-Phase ist charakterisiert durch das Auftreten von apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA (Gstraunthaler and Lindl 2013).

Im Rahmen der SubG1-Messung erfolgte die Aussaat der Zellen auf 6-Well-Platten. Nach Ablösen der Zellen wurde die gesamte Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 1300 rpm. Der entstandene Überstand wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die entstandenen Zellpellets mit jeweils 1 mL PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 min wurde nochmals der Überstand verworfen und die Zellpellets in 100 μ L PBS resuspendiert.

Um dem Farbstoff Zugang zur DNA im Zellkern zu ermöglichen, wurden die Zellen anschließend unter Vortexen mit 2 mL eiskaltem 80 %igem Ethanol fixiert und permeabilisiert (Darzynkiewicz, Huang, and Zhao 2017). Es folgte die Lagerung der Zellen über Nacht bei -20 °C.

Am nächsten Tag wurden die Proben nochmals bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und das Ethanol verworfen. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet in 330 µL RNase-Lösung (0,1 mg/mL in PBS) resuspendiert. Dieser Schritt ist notwendig, da PI nicht nur mit der DNA einer Zelle, sondern auch mit deren RNA interkaliert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde die Färbung mit 165 µL PI (50 µg/mL in PBS) pro Probe durchgeführt und die Proben durchflusszytometrisch gemessen.

3.2.3.2 Bestimmung der Apoptoserate

Über Veränderungen in der Membranintegrität und -permeabilität können durch Doppelfärbungen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) die Anteile an apoptotischen sowie nekrotischen Zellen in einer Population bestimmt werden (Rieger et al. 2011).

Annexin V, welches an das Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, wird genutzt, um die Menge an apoptotischen Zellen ermitteln zu können. Sobald Zellen apoptotisch werden, kommt es zu einer Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran. PS befindet sich somit auf der Zelloberfläche und Annexin V, welches eine hohe Affinität zu PS aufweist, kann an dieses binden. Diese Eigenschaft kann zur Identifizierung von apoptotischen Zellen in einer Population genutzt werden (Kabakov and Gabai 2018). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Annexin V sowohl bei apoptotischen als auch nekrotischen Populationsanteilen zu detektieren ist.

Zur weiteren Unterscheidung zwischen früh apoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen wird deshalb der in Nukleinsäuren interkalierende Farbstoff PI angewendet. Während apoptotische Zellen eine noch intakte Plasmamembran besitzen, ist die Membran nekrotischer Zellen für PI durchlässig. PI kann somit mit der doppelsträngigen DNA der Zelle interkalieren (Kabakov and Gabai 2018). Aufgrund dessen ist mithilfe dieser Methode eine Einteilung in vitale (FITC-/PI-), apoptotische (FITC+/PI-), und nekrotische (FITC+/PI+) Zellen einer Population möglich (Vermees et al. 1995).

Die notwendigen Arbeitsschritte liefen bis zur zweiten Zentrifugation analog zur SubG1-Messung ab (vgl. 3.2.3.1). Im Anschluss an das Absaugen des PBS-Überstandes wurde unter Lichtausschluss die Färbung mit jeweils 2,5 μL Annexin V + 50 μL Bindepuffer pro Probe durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT folgte schließlich die PI-Färbung mit je 10 μL PI + 430 μL Bindepuffer pro Probe. Unmittelbar darauf fand die durchflusszytometrische Messung statt.

4 Ergebnisse

Eine Dysregulation von PP2A ist ein im Rahmen von Krebserkrankungen häufig beobachtetes Phänomen, weshalb PP2A-gerichtete Therapiekonzepte immer weiter in den Fokus aktueller Forschung rücken (O'Connor et al. 2018).

Im Rahmen dieser Dissertation soll die pharmakologische Bedeutung von PP2A in Pankreaskarzinomzellen untersucht werden. Dafür wurden verschiedene murine sowie humane PDAC-Zelllinien mit den Inhibitoren PD, HU und MK behandelt und deren Effekte mittels durchflusszytometrischer Messungen sowie Western Blot-Analysen ermittelt.

Wenn durch die Behandlung eine Gesamtapoptose von nahezu 100 % erreicht wurde, erfolgte im Rahmen der Annexin-Messungen zudem die Bestimmung des jeweiligen IC_{50} -Werts des Inhibitors. Dieser gibt an, welche Konzentration eines Inhibitors benötigt wird, um die Enzymaktivität um die Hälfte zu reduzieren (Georgakis et al. 2020). Die statistischen Signifikanzen wurden zur Einschätzung der vorliegenden Ergebnisse mithilfe des Programms GraphPad Prism 8 bestimmt. Sie beziehen sich stets auf den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle (con). Ein Stern (*) bedeutet dabei signifikant, zwei Sterne (**) sehr signifikant, drei Sterne (***) hoch signifikant und vier Sterne (****) sehr hoch signifikant.

4.1 Konzentrationsabhängige Effekte einer PD-Behandlung auf murine PDAC-Zellen

4.1.1 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate muriner PDAC-Zellen

Um zu untersuchen, wie sich eine Behandlung mit PD auf die Apoptoserate verschiedener muriner PDAC-Zelllinien auswirkt, wurden die Zellen für 24 bzw. 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors behandelt und die Effekte nach Annexin/PI-Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Diese Versuchsreihe diente zudem der Ermittlung der für eine effektive Behandlung benötigten Dosis, welche für die Durchführung späterer Experimente erforderlich war.

4.1.1.1 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinien 9591 und 3250

In Bezug auf die oben genannte Fragestellung erfolgte zunächst die Behandlung der Zelllinien 9591 und 3250 mit Konzentrationen von 1, 2, 3, 5 und 10 μM PD. Die Färbung der Proben sowie die anschließende durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung der Apoptoserate erfolgten 24 h bzw. 48 h nach der Behandlung. Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abb. 2 dargestellt.

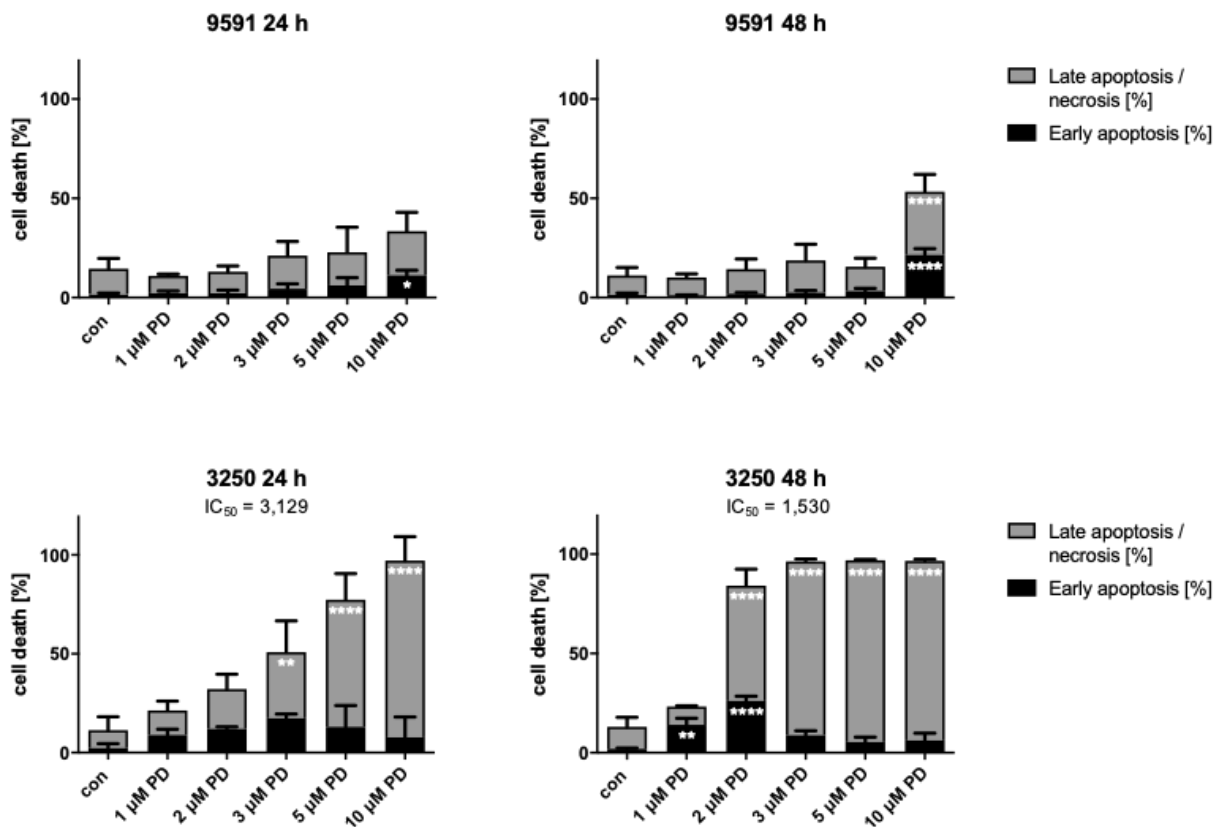


Abbildung 2: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinien 9591 und 3259 nach 24 h und 48 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 μM PD. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. Two way ANOVA; $p < 0,05$; MW aus $n = 3-6 + \text{SD}$, Bonferroni's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz sowie die IC₅₀-Werte wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet.

Nach Behandlung mit PD konnte in beiden Zelllinien ein dosisabhängiger Anstieg an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Vergleicht man die Intensität der Zunahme, fällt auf, dass die Einzelbehandlung bei den 9591-Zellen insgesamt einen deutlich flacheren Anstieg der Apoptoserate zur Folge hat als bei den 3250-Zellen. So führt selbst eine Behandlung mit der verwendeten Höchstdosis von 10 μM PD lediglich

zu einer Zunahme an apoptotischen Zellen von ca. 15 % in der Kontrolle auf ca. 33 %. Erst bei dieser Dosis ist eine signifikante (* $p < 0,05$) Zunahme an Zellen in der Frühapoptose zu registrieren.

Die 3250-Zellen zeigen bereits bei einer Behandlung mit 1 μM PD einen leichten Anstieg an apoptotischen Zellen, welcher mit zunehmender Dosis immer deutlicher wird. So steigt die prozentuelle Gesamtapoptose von ca. 11 % in der Kontrolle auf etwa 21 % (1 μM PD), 32 % (2 μM PD), 51 % (3 μM PD), 77 % (5 μM PD) bzw. 97 % (10 μM PD). Zudem zeigen sich signifikante Veränderungen in Bezug auf den Anteil der Zellen in der späten Apoptose ab einer Dosis von 3 μM PD. Während dieser Anteil in der Kontrolle etwa 9 % beträgt, steigt er bei der genannten Dosis auf ca. 33 % (** $p < 0,01$). Durch Erhöhung der Konzentration nimmt der Anteil weiter auf ca. 64 % (5 μM PD; **** $p < 0,0001$) bzw. 89 % (10 μM PD; **** $p < 0,0001$) zu.

Analog zu den 24 h-Werten verzeichnet die 9591-Zelllinie auch nach 48 h geringere Apoptoseraten als die 3250-Zellen. Ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate lässt sich erst bei einer Konzentration von 10 μM PD beobachten. Bei dieser Dosis befinden sich etwa 53 % der Gesamtpopulation in Apoptose. Sowohl in Bezug auf die Zellen in der frühen als auch in der späten Apoptose lassen sich bei der genannten Konzentration sehr hoch signifikante (**** $p < 0,0001$) Veränderungen feststellen.

In Bezug auf die 3250-Zellen lässt sich bereits ab einer Dosis von 1 μM PD eine sehr signifikante (** $p < 0,01$) Zunahme der Zellen in der frühen Apoptose nachweisen. Verglichen mit der Kontrolle kommt es bei der genannten Konzentration zu einer Zunahme der Frühapoptose von ca. 2 % auf ca. 14 %, die Gesamtapoptose steigt von ca. 13 % auf ca. 23 %. Eine Behandlung mit 2 μM PD sorgt für eine Sterblichkeit von ca. 84 % und liefert sehr hoch signifikante (**** $p < 0,0001$) Ergebnisse in Bezug auf den Anteil an Zellen in der Früh- und Spätapoptose. Ab einer Konzentration von 3 μM PD befinden sich schließlich insgesamt über 96% der Zellen in Apoptose. Die Zunahmen der Zellen in der frühen Apoptose sind auch hier statistisch als sehr hoch signifikant (**** $p < 0,0001$) einzuordnen.

Insgesamt fällt auf, dass sich bei beiden Zelllinien die überwiegende Mehrheit der toten Zellen in der Spätapoptose befindet. Eine Ausnahme bildet lediglich die 3250-Zelllinie nach einer Behandlung mit 1 μM PD für 48 h.

Für die Zelllinie 3250 konnten zudem die IC_{50} -Werte ermittelt werden. Während nach 24 h bei einer Konzentration von etwa 3,129 μM PD die Hälfte der Zellen apoptotisch ist, liegt der IC_{50} -Wert nach 48 h auf ca. 1,530 μM .

Zusammengefasst zeigt dieses Experiment, dass die 3250-Zellen im Gegensatz zu den 9591-Zellen bereits bei geringen Konzentrationen einen Anstieg der Apoptoserate verzeichnen, weshalb die 3250-Zellen als sensitiv, die 9591-Zellen hingegen als resistent gegenüber PD einzuordnen sind.

4.1.1.2 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinie 5436

Entsprechend des oben beschriebenen Versuchsaufbaus wurde dieses Experiment anschließend mit der p53-mutierten Zelllinie 5436 durchgeführt. Diese weisen die in Tumoren häufig auftretende p53R172H-Mutation auf, welche das Wachstum von Krebszellen fördert (Schafer et al. 2017; Schneider et al. 2010). Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 3 dargestellt.

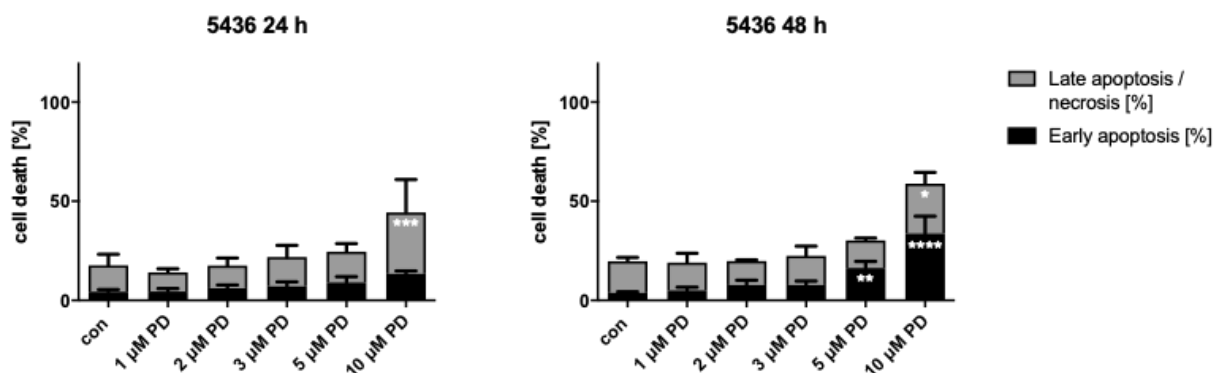


Abbildung 3: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinie 5436 nach 24 h und 48 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 μM PD. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. Two way ANOVA; $p < 0,05$; MW aus $n = 3 + SD$, Bonferroni's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet.

Die Zellen zeigen nach 24 h, ähnlich wie die 9591-Zellen, erst bei der Behandlung mit 10 μM PD signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Gesamtapoptose steigt von ca. 18 % (con) auf ca. 44 % (10 μM PD) und es kommt zu einer hoch signifikanten (** $p < 0,001$) Zunahme an Zellen in der späten Apoptose von ca. 13 % (con) auf ca. 31 % (10 μM PD). Nach 48 h lässt sich bei einer Behandlung mit 5 μM PD eine sehr signifikante (** $p < 0,01$) Zunahme an Zellen in der frühen Apoptose registrieren. Insgesamt verursachen Inhibitorkonzentrationen von 1 bis 5 μM

allerdings Apoptoseraten, die die der unbehandelten Zellen kaum übersteigen. Erst die Behandlung mit 10 μM PD bewirkt eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen auf insgesamt ca. 58 %. Bei der genannten Dosis lassen sich zudem eine sehr hoch signifikante (**** $p < 0,0001$) Zunahme an Zellen in der Früh- sowie eine signifikante (* $p < 0,05$) Zunahme an Zellen in der Spätapoptose registrieren.

Während sich die Mehrheit der Zellen nach 24 h unabhängig von der genutzten Dosis in der Spätapoptose befindet, gilt dies nach 48 h nur für die mit maximal 3 μM PD behandelten Zellen. Höhere Dosen hingegen sorgen dafür, dass sich die Zellen überwiegend in der Frühapoptose befinden.

Die Reaktion der 5436-Zelllinie sind somit mit der der 9591-Zellen zu vergleichen, weshalb diese Zelllinie ebenfalls als unempfindlich gegenüber PD einzuordnen ist.

4.1.1.3 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der murinen PDAC-Zelllinie W22

Ferner wurden die Effekte von PD auf die Zelllinie W22, welche eine homozygote Deletion von p53 aufweist, getestet (Schneider et al. 2010). Anhand dieser Zellen soll somit zusätzlich überprüft werden, ob p53 ein für den Zelltod durch PD essentielles Protein darstellt. Die PD-induzierte Zytotoxizität wurde 24 h nach der Behandlung gemessen.

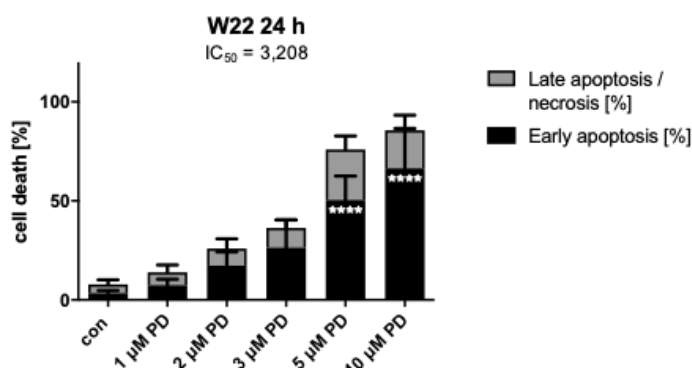


Abbildung 4: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinie W22 nach 24 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 μM PD. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. Two way ANOVA; $p < 0,05$; MW aus $n = 3 + \text{SD}$, Bonferroni's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz sowie die IC₅₀-Werte wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet.

Die in Abb. 4 aufgeführten Ergebnisse zeigen einen kontinuierlichen Anstieg an apoptotischen Zellen mit steigender Inhibitorkonzentration. Ausgehend von der Kontrolle, welche eine Hintergrundapoptose von ca. 8 % aufweist, nimmt die Apoptoserate mit Werten von etwa 14 % (1 μ M PD), 26 % (2 μ M PD), 36 % (3 μ M PD), 76 % (5 μ M PD) bzw. 86 % (10 μ M PD) stetig zu. Konzentrationen von 5 und 10 μ M PD generieren dabei eine sehr hoch signifikante (**** $p < 0,0001$) Zunahme an Zellen in der frühen Apoptose.

Auffällig ist zudem, dass sich die Mehrheit der apoptotischen W22-Zellen in der Frühapoptose befindet.

Der IC_{50} -Wert des Inhibitors ergab, dass bei einer Konzentration von etwa 3,208 μ M PD die Hälfte der Zellpopulation apoptotisch ist, was in etwa dem Wert der 3250-Zellen nach 24 h entspricht.

Es wird somit insgesamt deutlich, dass trotz der p53-Mutation dieser Zelllinie bereits geringe Konzentrationen ausreichen, um einen Anstieg der Apoptoserate hervorzurufen. Die Zellen reagieren sensitiv gegenüber PD.

4.1.2 Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach PD-Behandlung muriner PDAC-Zellen

Es konnte bisher gezeigt werden, dass die beiden murinen Zelllinien 9591 und 3250 mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf eine Behandlung mit PD reagieren (s. 4.1.1.1). Auf Basis dieser Erkenntnis wurde der Einfluss der Behandlung auf die Zellzyklusverteilung durchflusszytometrisch gemessen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen erneut für 24 h bzw. 48 h mit Konzentrationen zwischen 1 und 10 μ M PD behandelt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 5 dargestellt.

Die Zellzyklusanalyse der 9591-Zellen zeigt nach 24 h mit steigender Dosis eine deutliche Abnahme der G1-Population. Diese sinkt von ca. 58 % in der Kontrolle auf ca. 33 % nach einer Behandlung mit 10 μ M PD. Gleichzeitig kommt es durch die Behandlung zu einer Zunahme der G2-Population von ca. 22 % (con) auf ca. 42 % (10 μ M PD). Der durch die Behandlung generierte Anteil an Zellen in SubG1 liegt auch nach 10 μ M PD bei lediglich ca. 2 %.

Ähnliche Resultate konnten auch nach einer Behandlungsdauer von 48 h erzielt werden. Die PD-Behandlung hat erneut eine Abnahme der G1-Population von ca. 64 % in der Kontrolle auf ca. 32 % nach der Behandlung mit 10 μ M PD zur Folge. Die Zunahme der G2-Population hingegen fällt nach 48 h weniger deutlich aus als

nach 24 h. So führt die Behandlung mit 10 μM PD lediglich zu einem Anteil von ca. 23 % der Zellen in G2, während dieser in der Kontrolle ca. 19 % beträgt. Zudem lässt sich bei der genannten Dosis eine SubG1-Population von ca. 14 % verzeichnen, geringere Konzentrationen hingegen generieren keine SubG1-Fraktion.

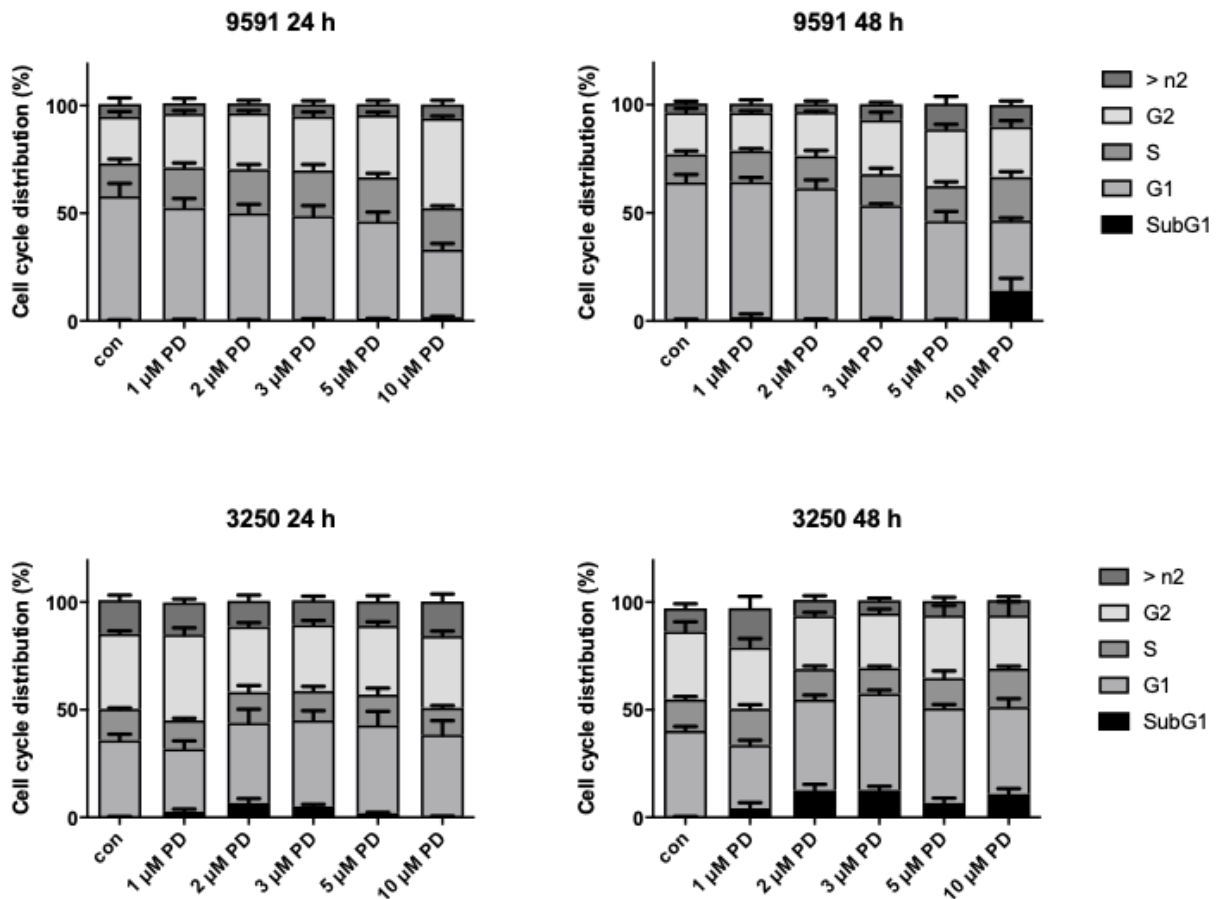


Abbildung 5: PD-induzierte Zellzyklusverteilung der Zelllinien 9591 und 3250 nach 24 und 48 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 1, 2, 3, 5 und 10 μM PD. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. (n=3)

In Bezug auf die 3250-Zelllinie fallen die Resultate weniger eindeutig aus. Bei der Analyse der 24 h-Messung unterscheidet sich die Zellzyklusanalyse nach 10 μM PD nur um wenige Prozentpunkte von der Kontrolle. So kommt es zwar durch die Behandlung mit 1 μM PD zunächst zu einer leichten Zunahme der G2-Fraktion von ca. 35 % (con) auf ca. 40 %, steigende Konzentrationen kehren diesen Effekt allerdings wieder um.

Ebenso wenig lässt sich nach 48 h ein eindeutiges Muster in der Wirkung auf den Zellzyklus feststellen. Nachdem bei der Behandlung mit 1 μ M PD zunächst eine Abnahme der G1-Fraktion von ca. 40 % (con) auf ca. 29 % zu verzeichnen ist, nimmt der prozentuale Anteil an Zellen in der G1-Phase bei steigender Dosis erneut zu. Zwar kommt es insgesamt zu einer leichten Zunahme der SubG1-Population auf bis zu ca. 13 %, die Anteile der übrigen Zellzyklusphasen unterscheiden sich jedoch erneut nur um wenige Prozentpunkte von der Kontrolle.

Es ist somit festzuhalten, dass der untersuchte Inhibitor in Bezug auf die weniger PD-sensitive 9591-Zelllinie eine generelle Zunahme an Zellen in der G2-Phase und somit eindeutige Veränderungen auf den Zellzyklus hervorruft. Die PD-sensitiven 3250-Zellen hingegen zeigen kein derart eindeutiges Muster. Nachdem nach einer Behandlungsdauer von 24 h ebenfalls zunächst ein leichter G2-Block zu registrieren ist, wird dieser mit steigenden Konzentrationen wieder aufgehoben.

4.1.3 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung muriner PDAC-Zellen

Die Ergebnisse aus 4.1.1 konnten bereits zeigen, dass murine PDAC-Zellen abhängig von der jeweiligen Zelllinie grundsätzlich sensitiv gegenüber PD reagieren können. Um die durch die PD-Behandlung hervorgerufenen Effekte auf Proteinebene nun genauer untersuchen zu können, wurden Western Blot-Analysen der Dosisreihen durchgeführt. Die in 4.1.1 und 4.1.2 erzielten Ergebnisse sollten dadurch bestätigt und deren Mechanismus genauer analysiert werden. Dabei wurde der Fokus insbesondere auf Schlüsselproteine der DDR (s. 1.3) gelegt.

Veränderungen der Bandenintensität innerhalb dieser sowie aller folgenden Western Blots wurden visuell eingeschätzt. Um geringe Unterschiede genauer beurteilen zu können, wurden einzelne Proteinbanden zudem mit Hilfe des Programms Image Studio Lite ausgemessen. Zur Quantifizierung wurde die jeweilige Intensität der Bande zunächst mit der entsprechenden Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt, wobei die Ladekontrolle auf 1 normiert wurde. Um die einzelnen Werte untereinander vergleichen zu können, wurden diese anschließend mit der Kontrolle des Versuchs ins Verhältnis gesetzt.

Alle in den Abbildungen aufgeführten Proteinnamen entsprechen der englischen Schreibweise.

4.1.3.1 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinien 9591 und 3250

Um die Auswirkungen der PD-Behandlung genauer zu untersuchen, wurden die Zelllinien 9591 und 3250 für 24 h mit den in 4.1 aufgeführten Konzentrationen behandelt. Beim Auftragen der Proben auf die SDS-Gele wurde bei der 3250-Zelllinie auf die 10 μM PD-Probe verzichtet, da diese nach der Behandlung keinen ausreichenden Proteingehalt aufwies. Dies lässt sich damit begründen, dass bei dieser Konzentration nahezu die gesamte Zellpopulation apoptotisch ist (s. 4.1.1.1). Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abb. 6 dargestellt.

Vergleicht man zunächst die PR130-Level beider Zelllinien, fällt auf, dass die 9591-Zellen basal einen deutlich geringeren Gehalt an PR130 aufweisen als die 3250-Zellen. Zudem ist bei dieser Zelllinie erst bei der Behandlung mit 10 μM PD eine leichte Intensitätsabnahme der PR130-Bande zu registrieren. Das PR130-Level der 3250-Zellen hingegen nimmt schon ab einer Konzentration von 1 μM PD kontinuierlich ab.

Um die Zelllinien genauer klassifizieren zu können, erfolgte außerdem der Nachweis von E-Cadherin. Cadherine sind essenziell für die Embryonalentwicklung sowie die Homöostase des adulten Gewebes, wobei E-Cadherin im Speziellen dem epithelialen Phänotyp zuzuordnen ist (Mendonsa, Na, and Gumbiner 2018). Es dient im Rahmen dieser Arbeit daher als Nachweis für Zelllinien epithelialen Ursprungs. Während E-Cadherin bei der 9591-Zelllinie in jeder Probe nachgewiesen werden konnte, blieb dieser Nachweis bei den 3250-Zellen aus. Es ist somit davon auszugehen, dass die 9591-Zelllinie epithelialen, die 3250-Zelllinie hingegen mesenchymalen Ursprungs ist. Des Weiteren wurden Veränderungen in den Proteinen der DDR analysiert.

Die ATM-Bande in der Kontrolle der 9591-Zellen ist zunächst nur sehr schwach erkennbar, nimmt im Laufe der Behandlung jedoch an Intensität zu. Im Vergleich dazu weisen die 3250-Zellen ein deutlich höheres ATM-Grundlevel auf. Durch die Behandlung kommt es hier zu einer kontinuierlichen Abnahme der ATM-Expression.

Als Reaktion auf DNA-Schäden kann KAP1 durch ATM direkt phosphoryliert werden (White et al. 2012). Das führt zur Derepression von KAP1-Zielgenen, die an der Förderung von Zellzyklusstillstand und Apoptose beteiligt sind (Iyengar and Farnham 2011). Eine leichte Aktivierung von pKAP1 ist bei den 9591-Zellen erstmals bei einer Behandlung mit 5 μM PD zu registrieren. Wird die Konzentration auf 10 μM PD erhöht,

verstärkt sich das Signal zusätzlich. 3250-Zellen hingegen zeigen schon bei 1 μM PD eine deutliche Aktivierung. Die Bandenintensität nimmt mit steigender PD-Konzentration kontinuierlich zu und fällt insgesamt höher aus als bei den 9591-Zellen.

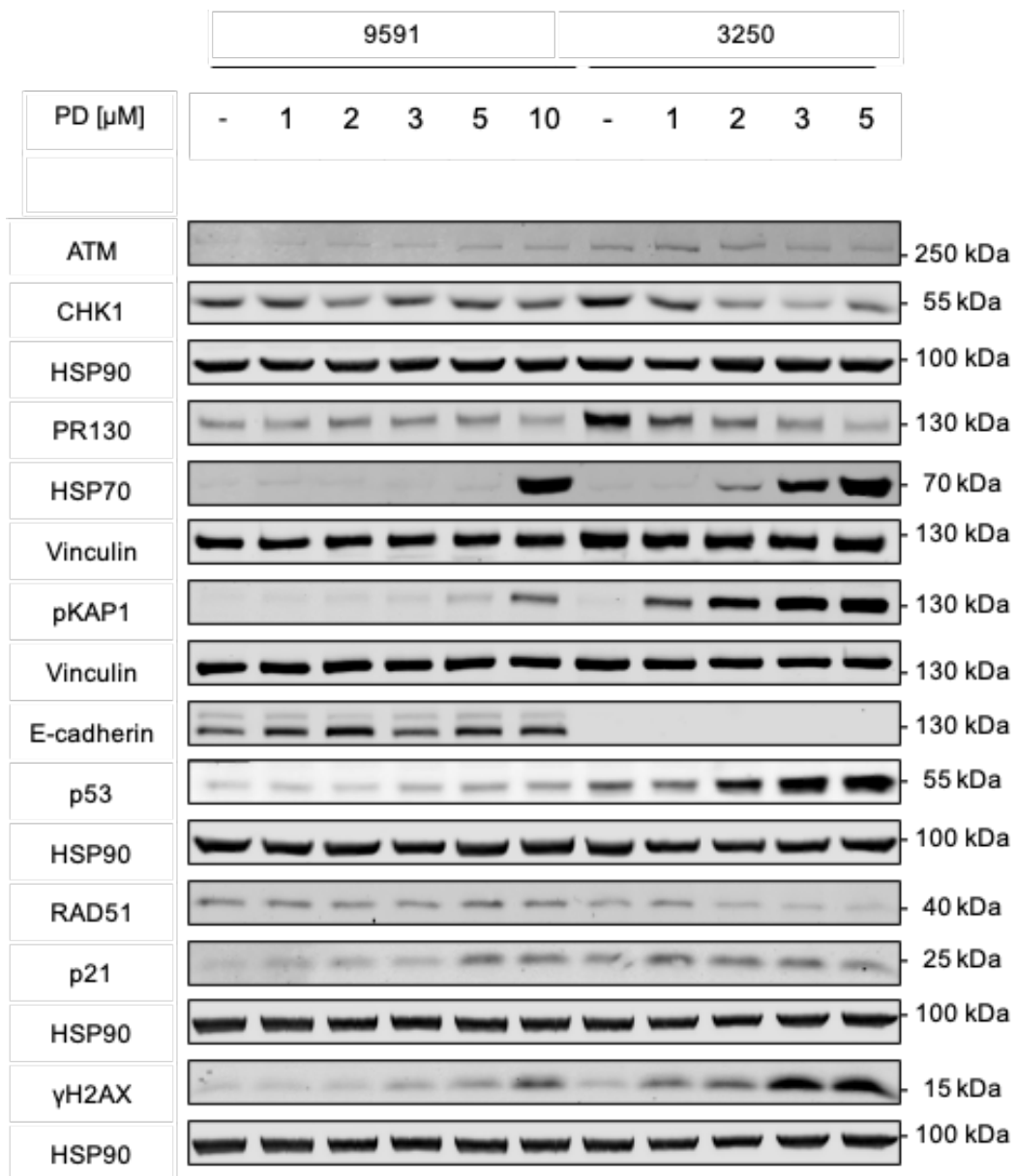


Abbildung 6: Western Blot-Analyse der Zelllinien 3250 und 9591 nach 24 h Behandlung mit PD

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle dienten HSP90 und Vinculin. (n=2)

Ein weiteres Zielprotein von ATM stellt H2AX dar (s. 1.3). Sowohl die 9591- als auch die 3250-Zellen zeigen im Laufe der Behandlung eine kontinuierliche Zunahme des

Schadensmarkers γ H2AX, wobei sich diese bei 3250 intensiver darstellt. Während die 9591-Zelllinie eine Phosphorylierung von H2AX erst ab einer Konzentration von 3 μ M PD aufweist, wird das Signal bei der 3250-Zelllinie bereits bei 1 μ M PD vergleichsweise deutlich stärker induziert.

Ebenfalls eine entscheidende Rolle im Rahmen der DDR spielt CHK1 (s. 1.3). Im Vergleich zur Kontrolle kommt es bei der 9591-Zelllinie zu keiner Veränderung der CHK1-Bandenintensität, während die 3250-Zelllinie eine klare Abnahme von CHK1 durch PD verzeichnet.

Nach seiner Aktivierung sorgt CHK1 unter anderem für die Rekrutierung von RAD51 (s. 1.3). RAD51 ist essenziell für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen, da es im Rahmen der HR den Strangtransfer zwischen der gebrochenen DNA-Sequenz und dem als Vorlage dienenden Schwesterchromatid katalysiert (Thacker 2005). Trotz der PD-Behandlung zeigt RAD51 bei den 9591-Zellen keine Veränderung. Bei der 3250-Zelllinie kommt es hingegen zu einer Abnahme der Bandenintensität, welche insbesondere ab einer Behandlung mit 3 μ M PD zu verzeichnen ist.

Als Reaktion auf DNA-Schädigung kommt es außerdem zur Aktivierung von p53 (s. 1.3). Das führt zu steigenden p53-Leveln und p53 kann so als Transkriptionsfaktor Gene regulieren, deren Produkte Zellzyklusarrest, Apoptose und DNA-Reparatur fördern (Lakin and Jackson 1999). Vergleicht man die p53-Grundlevel beider Zelllinien, fällt auf, dass das der 9591-Zelllinie deutlich geringer ausfällt. Zudem sorgt die PD-Behandlung hier mit steigender Dosis nur für eine leichte Zunahme der p53-Gesamtmenge. Bei der 3250-Zelllinie fällt die durch die Behandlung hervorgerufene Induktion des p53-Signals vergleichsweise deutlich stärker aus.

Aktiviertes p53 ist in der Lage, den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor (CKI) p21 zu aktivieren, wodurch Zellzyklusstillstand, Seneszenz oder Apoptose vermittelt werden können (Georgakilas, Martin, and Bonner 2017). Im Western Blot fällt auf, dass die 9591-Zelllinie in der Kontrolle kaum p21 exprimiert, es jedoch mit steigender Dosis zu einer Zunahme an p21 kommt. Das p21-Level der 3250-Zelllinie hingegen ist bereits in der Kontrolle vergleichsweise hoch und weist mit steigender Konzentration keine weitere Induktion des Signals auf.

Des Weiteren wurde das Verhalten des Hitzeschockprotein 70 (HSP70) als Reaktion auf die PD-Behandlung untersucht. Hitzeschockproteine stellen im Allgemeinen ein Abwehrsystem dar, indem sie als molekulare Chaperone an Proteinfaltungs- und -rückfaltungsprozessen beteiligt sind und die Beseitigung alter und geschädigter

Zellen unterstützen (Kumar et al. 2016). Eine deutliche Aktivierung von HSP70 lässt sich bei den 9591-Zellen erst bei der Behandlung mit einer Konzentration von 10 μ M PD feststellen. Die 3250-Zellen hingegen zeigen schon bei der Behandlung mit 2 μ M eine leichte Aktivierung von HSP70, welche sich mit zunehmender Dosis kontinuierlich steigert.

Die Daten der vorliegenden Western Blot-Analyse zeigen somit, dass die 3250-Zellen im Vergleich zu den 9591-Zellen insgesamt deutlich früher und stärker mit der Aktivierung von DDR-Schlüsselproteinen auf die PD-Behandlung reagieren. Dies bestätigt die in 4.1.1.1 bereits beschriebene höhere Sensitivität der 3250-Zellen gegenüber PD.

4.1.3.2 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinie 5436

Um die p53-mutierte Zelllinie 5436 genauer zu charakterisieren und Aufschluss über die Relevanz des Proteins p53 im Rahmen der PD-Behandlung zu erhalten, wurde eine Western Blot-Analyse der Dosisreihe mit Konzentrationen zwischen 1 und 10 μ M PD angefertigt. Die Behandlungsdauer betrug dabei 24 h.

Die in Abb. 7 dargestellten Ergebnisse zeigen, PR130 im Laufe der PD-Behandlung nur leicht abnimmt und die Abnahme erst bei der verwendeten Höchstdosis von 10 μ M PD deutlich wird.

Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinie konnte E-Cadherin in allen sechs Proben nachgewiesen werden, wodurch die Zuordnung zu einer Zelllinie epithelialen Ursprungs belegt wird (s. 4.1.1.1).

In Bezug auf die Proteine der DDR konnten zum einen ATM (s. 1.3) und CHK1 (s. 4.1.1.1) nachgewiesen werden. Es ließen sich keine durch die Behandlung hervorgerufenen Veränderungen in der Bandenintensität verglichen mit der Kontrolle feststellen. Phosphoryliertes KAP1 hingegen, welches ebenfalls ein Protein der DDR darstellt (s. 4.1.1.1), wird durch die Behandlung deutlich aktiviert. Eine leichte Zunahme der Bandenintensität tritt erstmals bei einer Konzentration von 5 μ M auf und fällt bei 10 μ M PD schließlich wesentlich intensiver aus. Phosphoryliertes H2AX verhält sich ähnlich, auch hier lässt sich eine Aktivierung durch die Behandlung verzeichnen, wobei sich diese ebenfalls erst bei einer Dosis von 10 μ M PD intensiv darstellt. RAD51 zeigt als weiteres Protein der Schadensantwort (s. 1.3, 4.1.3.1) ebenfalls nur eine sehr geringe Zunahme im Laufe der PD-Behandlung. Da es sich bei den 5436-Zellen, wie

bereits erwähnt, um eine p53-mutierte Zelllinie handelt, war die p53-Detektion von großem Interesse. Bereits in der Kontrolle ist eine starke Expression von p53 nachzuweisen, welche im Laufe der Behandlung konstant erhalten bleibt. Auffällig ist zudem, dass trotz der dauerhaften Aktivierung von p53 die Aktivierung von p21 als direktes p53-Targetprotein (s. 4.1.3.1) ausbleibt.

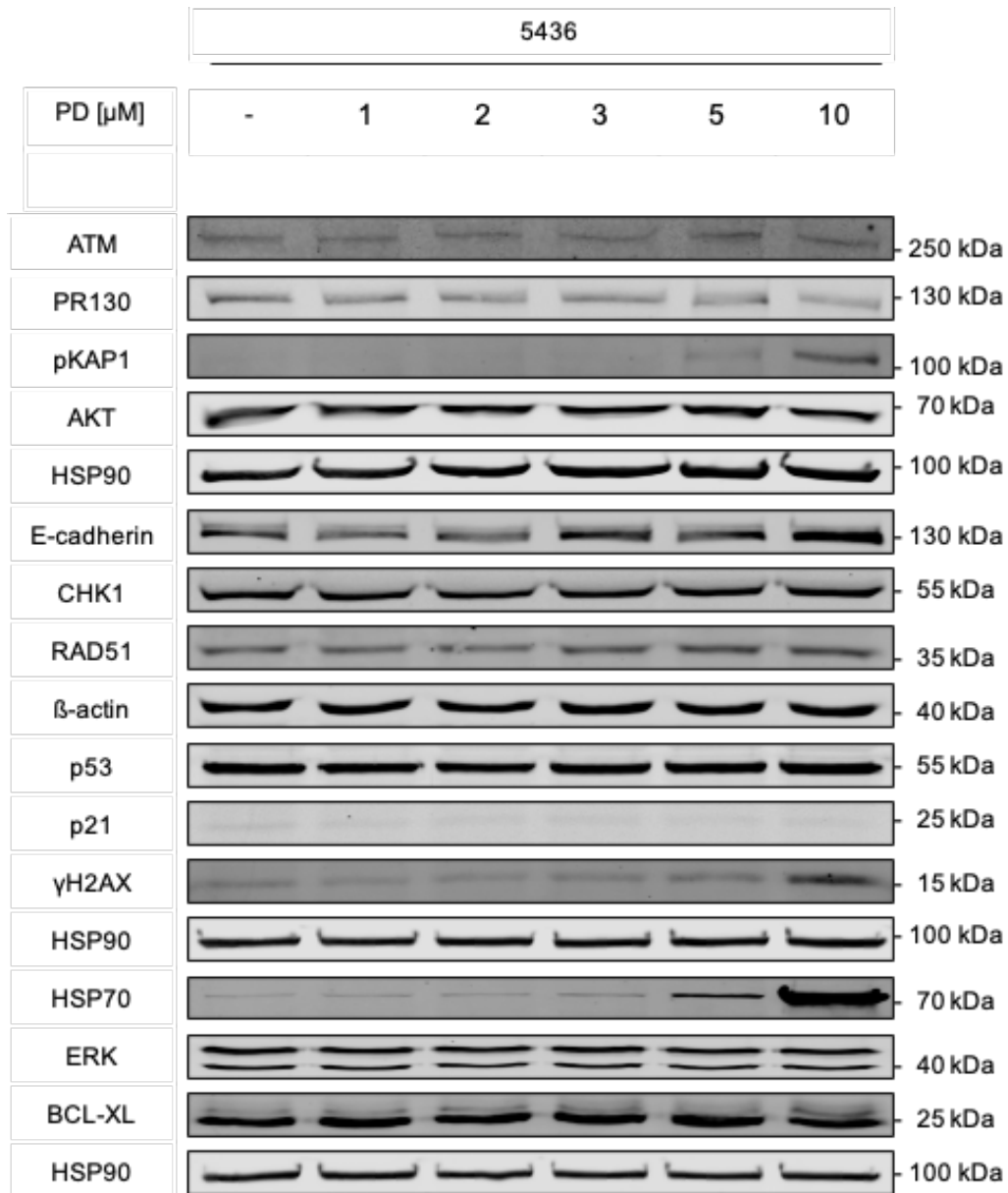


Abbildung 7: Western Blot-Analyse der Zelllinie 5436 nach 24 h Behandlung mit PD
 Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrarot Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle dienen HSP90 und β -actin. (n=1)

Des Weiteren erfolgte der Nachweis von HSP70. Dessen Aktivierung wird ab einer Konzentration von 5 μM PD deutlich und steigerte sich bei Erhöhung der Dosis auf 10 μM PD merklich.

Zudem wurden die Proteine *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-XL) detektiert.

Bei AKT handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, welche durch diverse Wachstumsfaktoren, Entzündungen und DNA-Schäden aktiviert wird. Durch Phosphorylierung wird die katalytische Aktivität von AKT stimuliert und pAKT kann Proteine beeinflussen, welche unter anderem Funktionen wie Zellproliferation, Migration, Stoffwechsel und Angiogenese vermitteln und auf das Überleben der Zelle konzentriert sind (Revathidevi and Munirajan 2019; Song et al. 2019; Cantley 2002).

Der RAS/RAF/ERK-Signalweg ist an der Regulation diverser Zellfunktionen beteiligt. So kann die ERK-Aktivität verschiedene antiproliferative Ereignisse wie Apoptose, Autophagie und Seneszenz fördert.

Bei BCL-XL handelt es sich um ein mitochondriales anti-apoptotisches Protein der BCL-2-Familie. Seine anti-apoptotische Funktion erhält es, indem es die Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine BAX und BAK verhindert, die Freisetzung von Cytochrom c reduziert und die Caspase-Aktivität reguliert (Park and Jonas 2017).

Alle der drei oben genannten Proteine zeigen im Laufe der PD-Behandlung keine Veränderung in ihrer Bandenintensität.

Damit lässt sich festhalten, dass ein Großteil der untersuchten Proteine durch PD keine oder nur wenig Änderung in ihrem Aktivitätsstatus verzeichnet. Vereinzelt zeigen sich Veränderungen auf Proteinebene bei höheren Konzentrationen von 5 bzw. 10 μM . Dies unterstützt die in 4.2 bereits aufgeführte Annahme, dass die 5436-Zellen relativ unempfindlich gegenüber PD reagieren. In Bezug auf die p53-Mutation konnte zudem erkannt werden, dass sich diese in einer dauerhaften Aktivierung von p53 äußert.

4.1.3.3 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung der murinen PDAC-Zelllinie W22

Nachdem in 4.1.3.2 bereits die Auswirkungen einer p53-Mutation auf die PD-Behandlung genauer analysiert wurden, soll der folgende Versuch u. a. Aufschluss über die Folgen einer vollständigen p53-Deletion geben. Für die Western Blot-Analyse der p53-negativen Zelllinie W22 wurden die Zellen für 24h mit Konzentrationen von 1, 2, 3 und 5 μM PD behandelt.

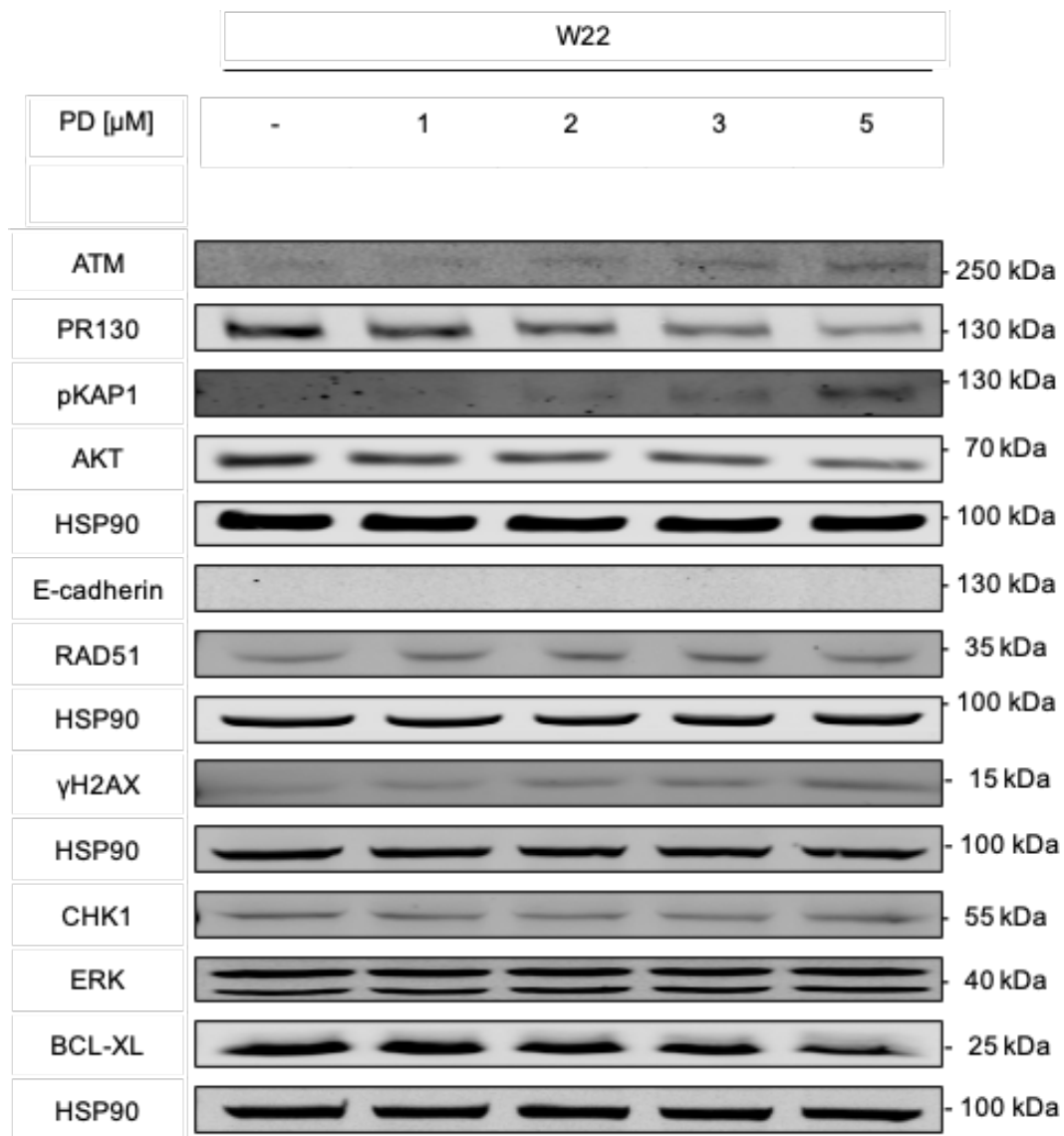


Abbildung 8: Western Blot-Analyse der Zelllinie W22 nach 24 h Behandlung mit PD
Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle diente HSP90. (n=2)

Betrachtet man den PR130-Status, fällt auf, dass PR130 in der Kontrolle stark exprimiert wird und durch die PD-Behandlung bereits ab einer Konzentration von 1 μM kontinuierlich abnimmt.

Um identifizieren zu können, ob es sich bei W22 um Zellen epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs handelt, wurde E-Cadherin getestet. Da dieser Nachweis ausblieb, kann hier von einer mesenchymalen Zelllinie ausgegangen werden.

Zudem erfolgte die Detektion diverser Schlüsselproteine der DDR. ATM ist in der Kontrolle kaum nachweisbar, zeigt durch die Behandlung allerdings eine deutliche Zunahme. Als Zielprotein von ATM weist pKAP1 ein ähnliches Muster auf und stellt sich erst ab einer Behandlung mit 3 bzw. 5 μM PD zunehmend intensiver dar. Ebenso lässt sich γH2AX , ein weiteres Targetprotein von ATM, in der Kontrolle kaum detektieren, zeigt jedoch mit steigender Dosis eine Induktion des Signals. Des Weiteren erfolgte der Nachweis von CHK1 und RAD51. Beide Proteine lassen sich bereits in der Kontrolle nachweisen und zeigen durch die PD-Behandlung keine Veränderungen in ihrer Bandenintensität.

Bezüglich der AKT-Expression ist nach intensivem Nachweis in der Kontrolle eine Abnahme durch die PD-Behandlung zu verzeichnen. Auch ERK ist in allen Proben detektierbar und zeigt keine Änderungen in seiner Bandenintensität hervorgerufen durch die PD-Behandlung. Bezüglich BCL-XL fällt ein leichter Rückgang der Banden bei der Behandlung mit 5 μM PD auf.

Die durch die PD-Behandlung hervorgerufenen Effekte auf die untersuchten Proteine fallen somit insgesamt eher gering aus und bestätigen die Resistenz der Zelllinie gegenüber dem Inhibitor.

4.2 Morphologische Unterschiede muriner PDAC-Zellen

Im Folgenden wurden digitalmikroskopische Aufnahmen der 9591- und 3250-Zellen angefertigt, um morphologische Unterschiede zwischen beiden Zelllinien analysieren zu können. Außerdem wurde aus den Ergebnissen der Dosisreihe (s. 4.1.1) geschlossen, dass eine Behandlung mit 10 μM PD für 24 h sinnvoll ist, um zudem die Auswirkungen der Behandlung auf das Erscheinungsbild beider Zelllinien festzuhalten. Die Aufnahmen sind in Abb. 9 dargestellt.

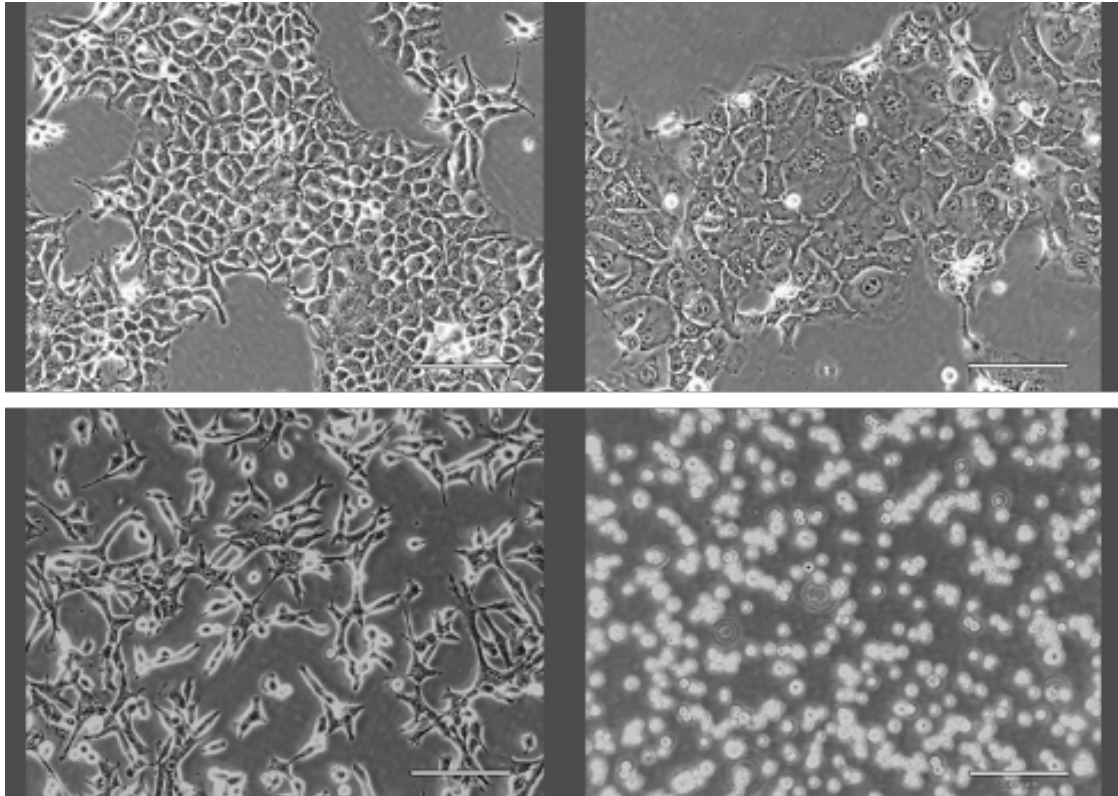


Abbildung 9: Digitalmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien 9591 (oben) und 3250 (unten) Gezeigt sind die unbehandelten (links) und mit 10 μM PD behandelten (rechts) Zellen. Die Aufnahmen wurden mit dem Echo Rebel Mikroskop angefertigt.

Die unbehandelten 9591-Zellen stellen sich größtenteils in kompakten Formen mit klar vom Cytoplasma abgrenzbarem Zellkern dar. Dieser nimmt in der Regel einen Großteil der Zelle ein. Auffällig ist zudem, dass die Zellen sich in dichten, klar definierten Zellnestern mit teils spitzen Ausläufern zusammenfinden.

Nach der PD-Behandlung wirkt das Cytoplasma deutlich aufgequollener und der Zellkern nimmt verhältnismäßig weniger Platz in der Zelle ein. Das führt dazu, dass die Zellnester im Vergleich zur Kontrolle weniger dicht erscheinen. Vereinzelt lassen sich zudem rundliche, im Medium schwimmende Zellen nachweisen.

Die 3250-Zellen hingegen zeichnen sich in der Kontrolle durch einen länglichen, spindelförmigen Aufbau mit teils spitzen Ausläufern aus. Im Gegensatz zur 9591-Zelllinie finden sich die 3250-Zellen nicht in dichten, klar abgrenzbaren Zellnestern, sondern in vergleichsweise lockeren Zellverbänden zusammen.

Die PD-Behandlung hat ein Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zur Folge. Morphologisch stellen diese sich nun deutlich kleiner und rundlich dar.

4.3 PD-induzierte Zelltoxizität muriner PDAC-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

Nachdem in 4.1 bereits ausführlich auf die konzentrationsabhängigen Effekte einer PD-Behandlung eingegangen wurde, soll im Folgenden die Sterblichkeit der Zellen in Abhängigkeit zur Behandlungsdauer bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Zeitreihe mit den in Abb. 10 aufgeführten Zeitwerten erhoben und die Apoptoseraten der Zellen anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Die Versuche aus 4.1.1 konnten zeigen, dass eine InhibitorKonzentration von 10 μM eine geeignete Dosis für eine effektive Behandlung darstellt. Diese Konzentration wurde daher für die Behandlung der Zellen im Rahmen dieses Experiments gewählt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 10 dargestellt.

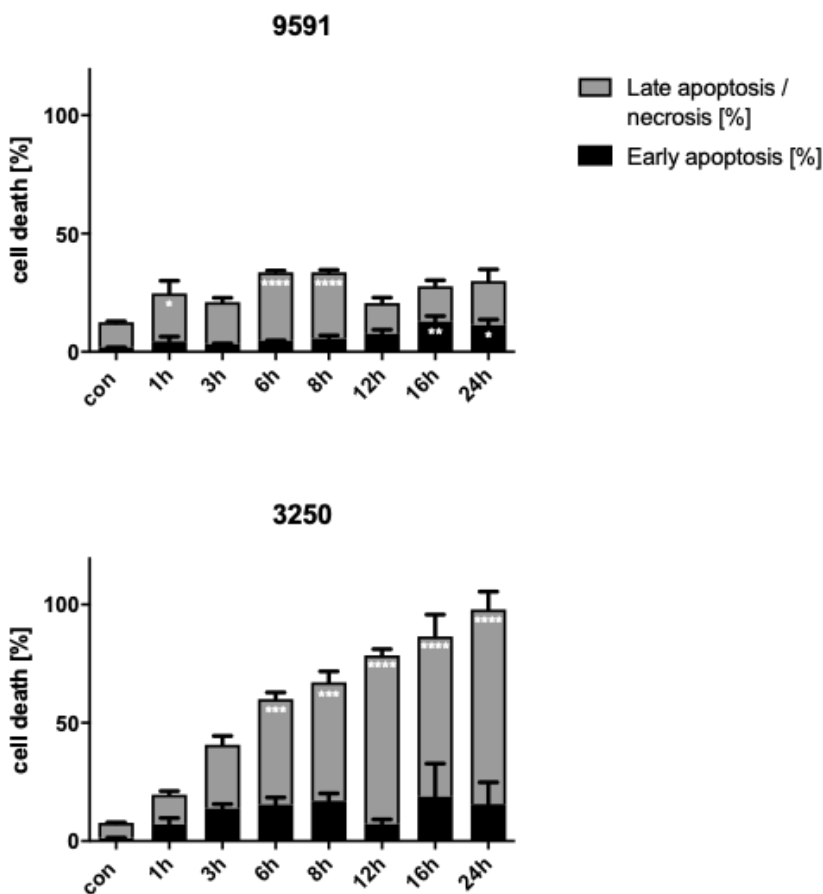


Abbildung 10: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinien 9591 (oben) und 3250 (unten) in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 10 μM PD über einen Zeitraum von 1, 3, 6, 8, 12 und 24 h. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. Two way ANOVA; $p < 0,05$; MW aus $n = 2 + \text{SD}$, Bonferroni's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet.

Die Daten bestätigen die in 4.1.1.1 bereits demonstrierten Unterschiede in der Sensitivität beider Zelllinien gegenüber PD. Die 9591-Zellen zeigen keinen zeitabhängigen Anstieg der zellulären Sterberate. Zwar lässt sich durch die Behandlung eine generelle Zunahme der Apoptoserate registrieren, diese verläuft jedoch nicht linear. Vielmehr steigt die Apoptoserate bereits 1 h nach Behandlung von ca. 13 % in der Kontrolle auf ca. 24 %, zeigt dann mit zunehmenden Zeitwerten Schwankungen zwischen etwa 21 % und 34 %, und erreicht nach 24 h schließlich einen Wert von ca. 30 %.

Die 3250-Zellen hingegen weisen eine deutliche zeitabhängige Steigerung der Apoptoserate auf. Ab einer Behandlungsdauer von 6 h lassen sich hoch (***) bzw. sehr hoch signifikante (**** $p < 0,0001$) Zunahmen von Zellen in der späten Apoptose beobachten. Auch diese Zelllinie zeigt bereits nach 1 h einen Anstieg von ca. 8 % in der Kontrolle auf ca. 20 %. Mit steigenden Zeitwerten wächst der Anteil der Zellen in Apoptose stetig, sodass dieser nach 8 h etwa 67 % erreicht hat und nach 24 h schließlich ca. 98 % beträgt. Analog zu den Beobachtungen aus Versuch 4.1 befindet sich auch hier bei beiden Zelllinien die Mehrheit der apoptotischen Zellen in der Spätapoptose. So beträgt der Anteil der 3250-Zellen in der Frühapoptose nach 24 h lediglich 16 %.

4.4 Reaktion verschiedener muriner PDAC-Zelllinien auf PD im Vergleich

Der folgende Versuch soll eine vergleichende Übersicht über die Reaktionen verschiedener muriner PDAC-Zelllinien auf eine Behandlung mit PD liefern. Anhand der Western Blot-Analysen aus 4.1.3 wurde die Behandlung mit 2 μM PD für 24 h als für den Versuch sinnvoll erachtet, da sensitive Zelllinien bei dieser Dosis bereits eine Aktivierung diverser DDR-Proteine aufweisen, bei resistenten Zelllinien hingegen noch keine Effekte hervorgerufen werden.

Die Durchführung dieses Experiments fand in Zusammenarbeit mit _____ statt. Mithilfe der Erkenntnisse vorangegangener Forschungsarbeit konnten die Zelllinien zunächst in C1- und C2-Cluster eingeteilt werden. Dabei zeichnen sich die C1-Cluster-Zellen dadurch aus, dass sie mesenchymalen Ursprungs, die C2-Cluster-Zellen hingegen epithelialen Ursprung sind. Zum C1-Cluster gehören neben der Zelllinie 3250 die Zelllinien S411 sowie 8248. Dem C2-Cluster sind die Zelllinien 9591, S821 und 8296 zuzuordnen. Zudem angegeben ist die durch eine Behandlung mit 2 μM PD

hervorgerufene Gesamtapoptose der Zelllinien, welche mittels entsprechender durchflusszytometrischer Messungen zuvor ermittelt wurde.

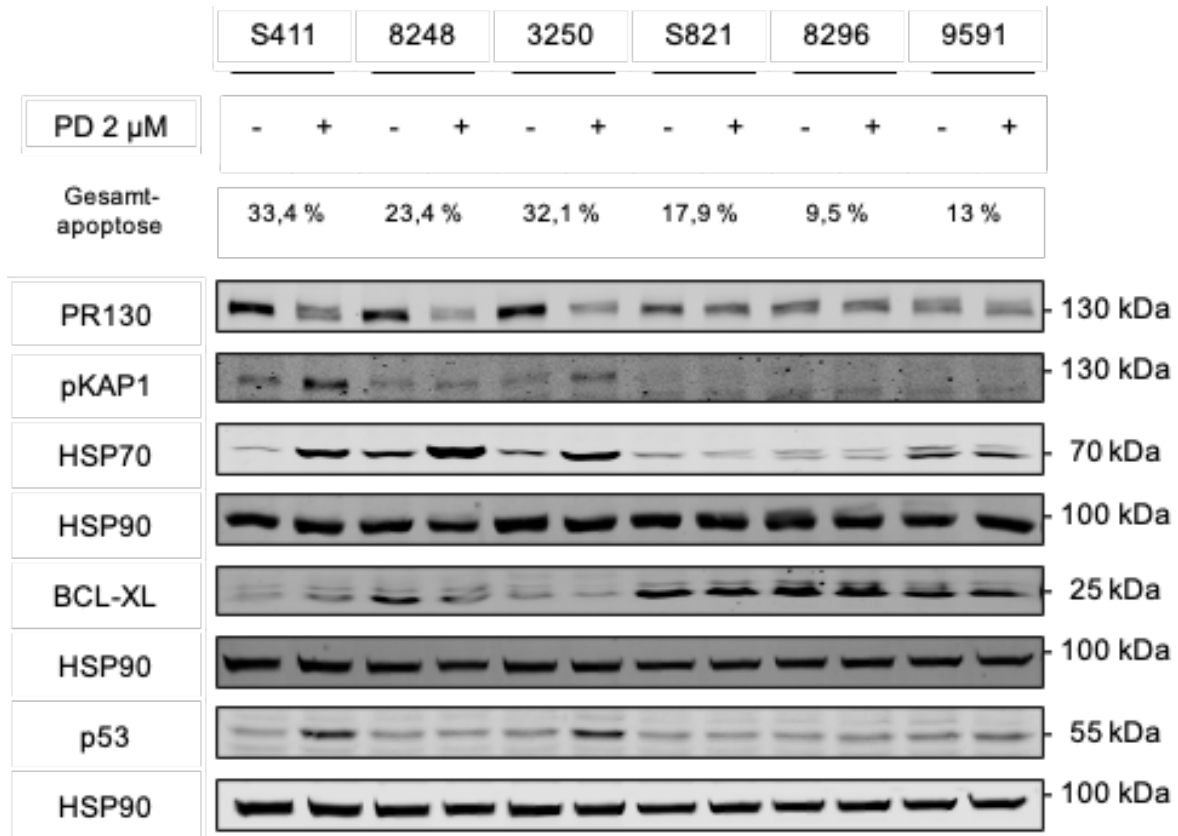


Abbildung 11: Western Blot-Analyse der Zelllinien S411, 8248, 3250, S821, 8296 und 9591 nach 24 h Behandlung mit PD

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle diente HSP90. Zusätzlich angegeben ist die prozentuale Gesamtapoptose nach Behandlung mit 2 μ M PD. Die Daten der Zelllinien S411, 8248, S821 und 8248 wurden von [Name] zur Verfügung gestellt. (n=2)

Die prozentualen Werte der Gesamtapoptose zeigen, dass PD in Bezug auf die mesenchymalen C1-Cluster-Zellen insgesamt höhere Apoptoseraten verursacht als bei den epithelialen C2-Cluster-Zellen. Mit einer Empfindlichkeit von 23,4 % weisen die 8248-Zellen innerhalb des C1-Clusters die niedrigste Empfindlichkeit gegenüber PD auf. Die S411- und 3250-Zellen zeigen Werte von 33,4 % und 32,1 % und reagieren demnach mit etwa der gleichen Sensitivität auf den Inhibitor. Innerhalb des C2-Clusters weist die S821-Zelllinie mit einer Gesamtapoptose von 17,9 % die höchste, die 8296-Zelllinie mit einem Wert von 9,5% die niedrigste Empfindlichkeit gegenüber PD auf.

In Bezug auf PR130 wird außerdem deutlich, dass dieses Protein bei den C1-Cluster-Zelllinien deutlich stärker exprimiert wird als bei den C2-Cluster-Zelllinien. Zudem lässt sich bei den mesenchymalen Zelllinien durch die PD-Behandlung eine deutliche Abnahme der PR130-Bande im Vergleich zur Kontrolle verzeichnen, während die Intensität der Banden bei den epithelialen Zelllinien etwa gleich bleibt. Es erfolgte außerdem der Nachweis der DDR-Proteine pKAP1 und p53. Diese zeigen bei den Zelllinien S411 und 3250 eine deutliche Aktivierung durch die Behandlung; bei den übrigen Zelllinien ist keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. HSP70 wird durch PD in den C1-Cluster-Zelllinien deutlich aktiviert. Es fällt weiter auf, dass die 8248- und die 3250-Zellen bereits in der Kontrolle eine leichte Aktivierung von HSP70 zeigen. In Bezug auf die C2-Cluster-Zelllinien löst PD keine Veränderungen in der Bandintensität aus.

Zudem wurde das anti-apoptotische Protein BCL-XL (s. 4.1.3.2) detektiert. Es kann ebenfalls vorwiegend in allen Proben der C2-Cluster-Zelllinien nachgewiesen werden. Exprimiert wird es außerdem in der Kontrollprobe der 8248-Zelllinie, wobei die PD-Behandlung eine leichte Abnahme des Signals zur Folge hat.

Analog zu den Ergebnissen aus 4.1.3 lassen sich somit generelle Unterschiede in der Reaktion mesenchymaler und epithelialer PDAC-Zellen feststellen. Dabei fällt auf, dass sich die 8248-Zellen, welche innerhalb des C1-Clusters die geringste Gesamtapoptose aufweisen, in Bezug auf die DDR-Aktivierung und die BCL-XL-Expression ein ähnliches Verhalten wie die Zellen des C2-Clusters aufweisen.

4.5 Konzentrationsabhängige Effekte einer PD-Behandlung auf humane PDAC-Zellen

4.5.1 Einfluss einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate der humanen Zelllinie MIA PaCa-2

Nachdem in 4.1 die Effekte von PD auf murine PDAC-Zellen getestet wurden, wurde im Folgenden untersucht, ob auch humane PDAC-Zellen auf den Inhibitor reagieren. Es wurde daher eine Dosisreihe mit Konzentrationen von 1 μ M, 3 μ M und 5 μ M PD angefertigt und die Sterblichkeit der Zellen nach 24 bzw. 48 h durchflusszytometrisch gemessen. Als humane Zelllinie wurde MIA PaCa-2 untersucht, wobei der Versuch sowohl an MIA PaCa-2-Wildtyp- als auch an MIA PaCa-2 NOXA KO-Zellen durchgeführt wurde. Bei NOXA handelt es sich um ein Protein der BCL-2-Familie, das

mit Proteinen des Apoptosewegs interagiert und über p53-abhängige sowie -unabhängige Wege eine pro-apoptotische Wirkung besitzt (Morsi et al. 2018).

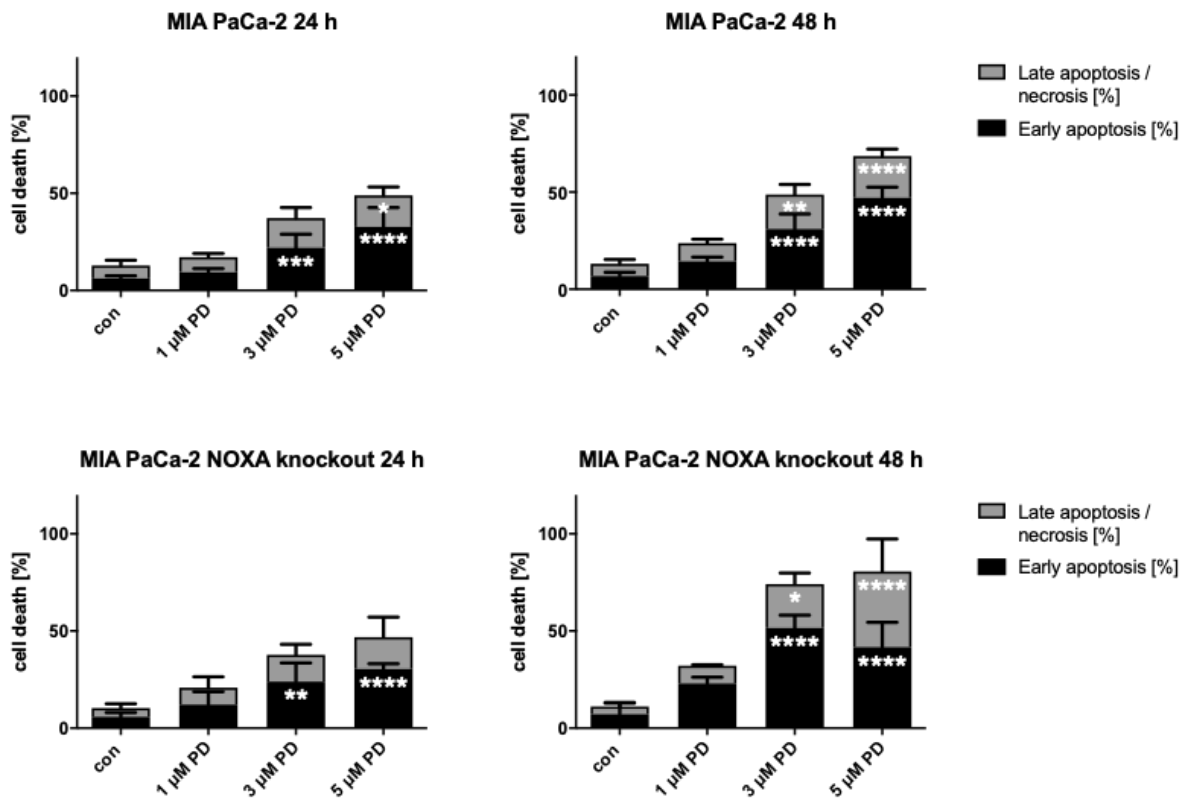


Abbildung 12: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinien MIA PaCa-2 und MIA PaCa-2 NOXA KO nach 24 h und 48 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con) und die Behandlungen mit 1, 3 und 5 μM PD. Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. Vereinzelt Messungen fanden am FACS Canto II statt. Two way ANOVA; $p < 0,05$; MW aus $n = 3 + \text{SD}$, Bonferroni's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 8 berechnet.

Beide Zelllinien zeigen sowohl nach 24 als auch nach 48 h einen Anstieg des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wobei sich statistisch signifikante Ergebnisse in Bezug auf den Anteil der Zellen in der frühen bzw. späten Apoptose ab einer Konzentration von 3 μM PD registrieren lassen.

So weisen die Wildtyp-Zellen nach 24 h ab einer Behandlung mit 3 μM PD eine deutliche Zunahme der Apoptoserate von ca. 13 % (con) auf ca. 37 % (3 μM PD) auf. Durch die Erhöhung der Dosis auf 5 μM wächst der prozentuale Anteil der Zellen in Apoptose weiter auf etwa 49 %. Auch nach einer Behandlungsdauer von 48 h lässt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Sterblichkeit feststellen. Während

sie bei einer Konzentration von 1 μM PD etwa 24 % beträgt, erreicht sie durch eine Dosiserhöhung auf 5 μM PD einen Wert von ca. 69 %.

Analog zeigt die NOXA KO-Zelllinie ebenfalls sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine dosisabhängigen Zunahme der Apoptoserate. Diese steigt nach 24 h von ca. 10 % (con) auf ca. 21 % (1 μM PD), 38 % (3 μM PD) bzw. 47 % (5 μM PD). Nach 48 h lassen sich Zunahmen auf ca. 23 % (1 μM PD), 74 % (3 μM PD) bzw. 80 % (5 μM PD) verzeichnen. Die Apoptoserate der NOXA KO-Zelllinie übersteigt somit nach einer Behandlung mit der Höchstdosis von 5 μM PD für 48 h die des Wildtyps um etwa 11 %.

Auffällig ist außerdem, dass sich bei der genannten Konzentration die Mehrheit der Wildtypzellen in der Frühapoptose befindet, während die NOXA KO-Zelllinie einen vergleichsweise deutlich höheren Anteil an Zellen in der späten Apoptose aufweist.

Es ist somit festzuhalten, dass auch humane Zelllinien sensitiv gegenüber PD reagieren können. Während sich beide Zelllinien dabei in nach einer Behandlungsdauer von 24 h in ihrer Reaktion kaum unterscheiden, weisen die NOXA KO-Zellen nach 48 h vergleichsweise etwas höhere Apoptoseraten auf als der Wildtyp.

4.5.2 Western Blot-Analyse zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte einer PD-Behandlung humaner PDAC-Zelllinien

Zur Darstellung möglicher Unterschiede in den durch die PD-Behandlung auf Proteinebene hervorgerufenen Effekten zwischen MIA PaCa-2 Wildtyp- und MIA PaCa-2 NOXA KO-Zelllinie, wurde zudem eine entsprechende Western Blot-Analyse durchgeführt. Beide Zelllinien wurden dafür mit Konzentrationen von 1, 3 und 5 μM PD für 24 h behandelt. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 13 aufgeführt.

In Bezug auf den PR130-Status beider Zelllinien fällt auf, dass die Wildtyp-Zellen ein um das 2,4-fach geringere PR130-Grundlevel aufweisen als die NOXA KO-Zelllinie. Der Wildtyp zeigt zudem keine durch die PD-Behandlung hervorgerufene Abnahme der Bandenintensität, während bei der NOXA KO-Zelllinie ab 5 μM PD ein Rückgang des Signals zu registrieren ist.

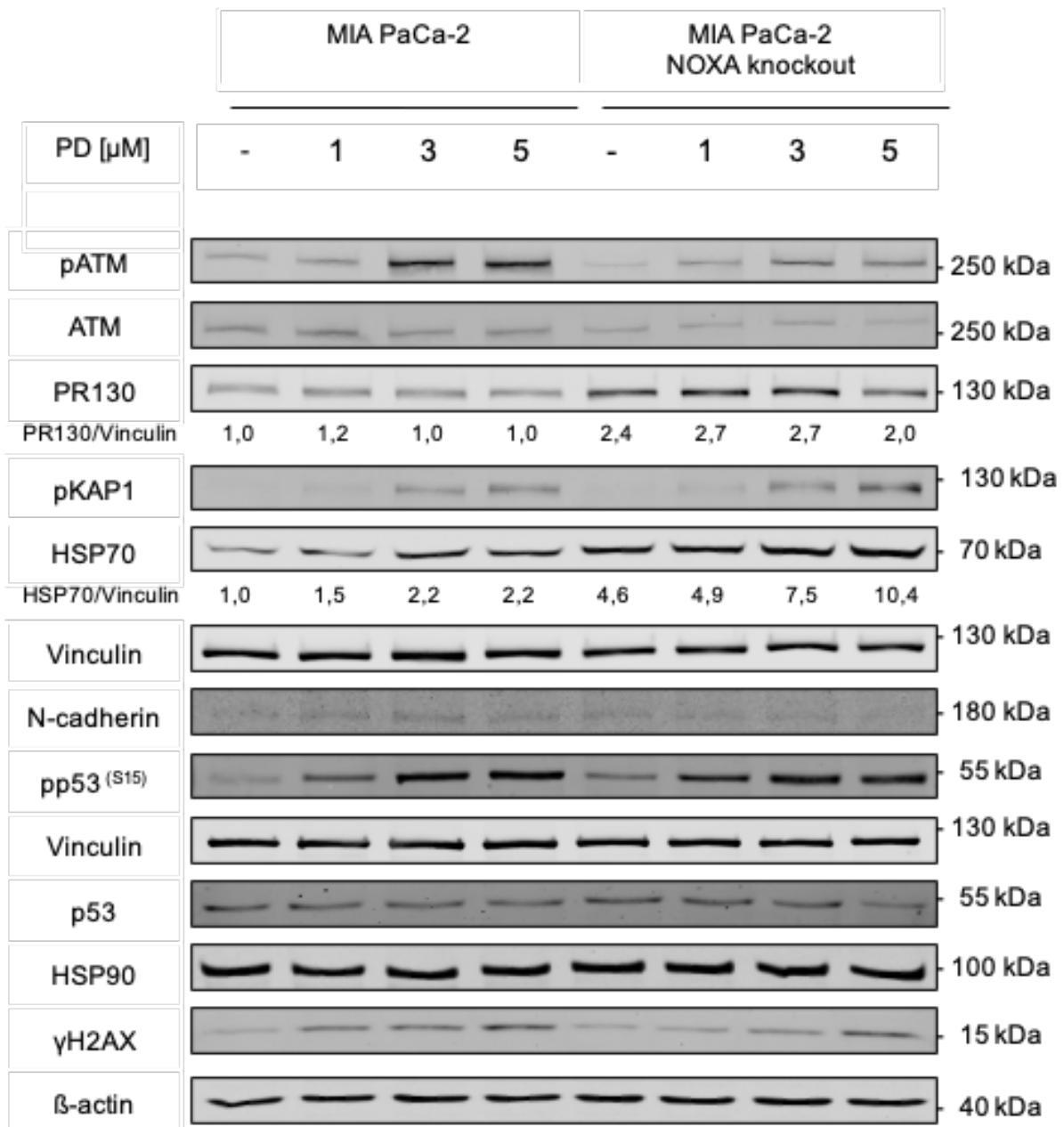


Abbildung 13: Western Blot-Analyse der Zelllinien MIA PaCa-2 und MIA PaCa-2 NOXA KO nach 24 h Behandlung mit PD

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle dienten HSP90, Vinculin und β -actin. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mittels Image Studio Lite. (n=2)

Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinien erfolgte zudem der Nachweis von N-Cadherin in allen acht Proben. Im Gegensatz zu E-Cadherin, welches von epithelialen Zellen exprimiert wird (s. 4.1.3.1), kann N-Cadherin als Nachweis für Zellen mesenchymalen Ursprungs gesehen werden (Rai and Ahmed 2019).

Hinsichtlich der DDR erfolgte außerdem die Detektion von ATM sowie pATM.

Vergleicht man das ATM-Grundlevel beider Zelllinien, fällt dieses beim Wildtyp etwas höher aus. Ausgelöst durch die PD-Behandlung kommt es dann bei beiden Zelllinien zu einer minimalen Intensitätsabnahme der ATM-Bande.

Auch in Bezug auf die phosphorylierte Form von ATM zeigt sich die Bande in der Kontrolle merklich intensiver als bei den NOXA KO-Zellen. Während Konzentrationen von 3 und 5 μM für eine starke Phosphorylierung von ATM bei den MIA PaCa-2-Zellen sorgen, weist die NOXA KO-Zelllinie schon bei der Behandlung mit 1 μM PD eine Aktivierung auf, welche sich mit zunehmender Dosis steigert. Insgesamt fällt die Induktion des Signals bei den Wildtyp-Zellen allerdings deutlich intensiver aus.

Die Western Blot-Analyse zeigte außerdem, dass die Behandlung bei beiden Zelllinien eine Aktivierung von γH2AX zur Folge hat. Diese setzt bei den Wildtyp-Zellen bereits nach 1 μM PD ein, bei der NOXA KO-Zelllinie in vergleichbarem Ausmaß hingegen erst bei 3 μM PD. Nach einer Behandlung mit 5 μM PD unterscheidet sich die Intensität der γH2AX -Bande beider Zelllinien nicht mehr.

Die p53-Expression zeigt im Laufe der PD-Behandlung kaum Veränderungen. Lediglich zeigt die NOXA KO-Zelllinie eine leichte Abnahme der Bandenintensität bei der Behandlung mit 5 μM PD. Durch die Phosphorylierung von p53 an S15 als Reaktion auf DNA-Schäden kann p53 aktiviert werden (Canman et al. 1998) und seine Funktion als Transkriptionsfaktor aufnehmen (Lakin and Jackson 1999). Phosphoryliertes (p)p53 (S15) weist in beiden Zelllinien ein vergleichbares Verhalten auf. In der Kontrolle noch kaum detektierbar, initiiert bereits die Behandlung mit 1 μM PD die Induktion eines Signals, welches mit steigender Dosis zunehmend verstärkt wird. Bei Erhöhung der Konzentration von 3 auf 5 μM ist keine weitere Verstärkung der Bande zu registrieren, nachdem diese sich bereits bei 3 μM sehr intensiv darstellt.

In Bezug auf das Hitzeschockprotein HSP70 fällt auf, dass dieses bereits in der Kontrolle der NOXA KO-Zellen eine deutliche Aktivierung zeigt, während es in den Wildtyp-Zellen kaum aktiviert ist. Das HSP70-Level der NOXA KO-Zelllinie ist dabei um das 4,6-fach höher als das des Wildtyps. Ausgelöst durch die PD-Behandlung nimmt HSP70 zwar sowohl bei den Wildtyp- als auch den NOXA KO-Zellen zu, diese Zunahme fällt beim Wildtyp allerdings insgesamt schwächer aus. Diese Beobachtung kann durch die Quantifizierung der Proteinbanden zusätzlich verdeutlicht werden.

Beide Zelllinien zeigen somit eine deutliche Aktivierung von DDR-Proteinen, wodurch die in 4.5.1 aufgeführten Ergebnisse, welche eine hohe Empfindlichkeit der Zellen gegenüber PD zeigen, unterstützt werden.

4.6 Reaktion verschiedener muriner PDAC-Zelllinien auf Replikationsstress im Vergleich

Nachdem die vorangegangenen Versuche aus 4.1 bis 4.4 deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener muriner PDAC-Zellen gegenüber PD zeigen konnten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Unterschiede auf generellen Defekten der sensitiven Zelllinien beruhen.

In Zusammenarbeit mit [Name] wurden die in 4.4 bereits aufgeführten PDAC-Zelllinien mit den Inhibitoren HU und MK behandelt. Beide Inhibitoren sind in der Lage über jeweils verschiedene Wege replikativen Stress zu verursachen (Vesela et al. 2017; Ha et al. 2020)

Ziel war es daher zu analysieren, ob sich generelle Unterschiede in der Reaktion von C1- und C2-Cluster-Zelllinien auf den durch die Behandlungen ausgelösten Replikationsstress identifizieren lassen.

4.6.1 Effekte einer Behandlung mit Hydroxyurea auf murine PDAC-Zelllinien

Um die Effekte einer Behandlung mit Hydroxyurea (HU) auf Pankreaskarzinomzellen mit den Effekten der PD-Behandlung vergleichen und mögliche Unterschiede zwischen C1- und C2-Cluster-Zellen definieren zu können, erfolgte die Behandlung der Zelllinien mit 1 mM HU über einen Zeitraum von 24 h.

HU beeinflusst die Ribonukleotidreduktase, welche die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert (Elford 1968; Adams and Lindsay 1967; Timson 1975; Boyd and Neldner 1991). Das Enzym Ribonukleotidreduktase besteht aus einer M1 und einer M2-Untereinheit, wobei die enzymatische Aktivität wahrscheinlich von dem zellulären M2-Level abhängig ist (Engstrom et al. 1985; Boyd and Neldner 1991). HU kann nun an das M2-Protein binden und dieses inaktivieren, was den Tod von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zur Folge hat (Boyd and Neldner 1991).

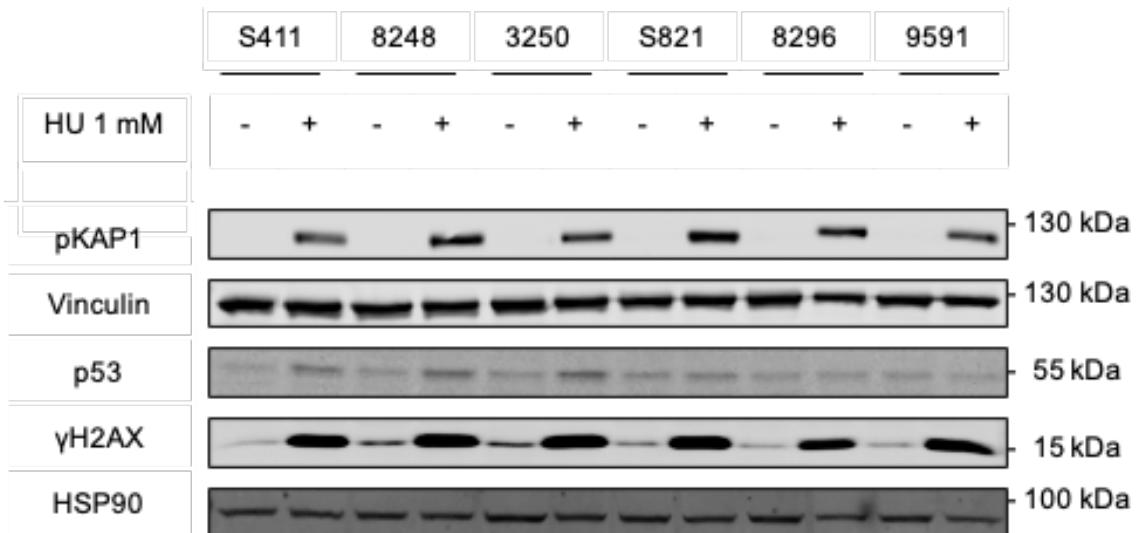


Abbildung 14: Western Blot-Analyse der Zelllinien S411, 8248, 3250, S821, 8296 und 9591 nach 24 h Behandlung mit HU

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle dienten Vinculin und HSP90. (n=2)

Die Western Blot-Analyse zeigt, dass pKAP1 ausnahmslos in allen sechs aufgetragenen Zelllinien durch die Behandlung deutlich aktiviert wird. Die Intensität der Signalinduktion fällt bei den Zelllinien 8248 und S821 am stärksten aus.

In Bezug auf γH2AX ist ebenfalls in allen Zelllinien eine deutliche Aktivierung durch HU zu verzeichnen. Diese unterscheidet sich innerhalb der Zelllinien in ihrer Intensität kaum. Lediglich zeigen die 8248- sowie die 3250-Zellen bereits in der Kontrolle eine etwas stärkere Phosphorylierung verglichen mit den anderen vier Zelllinien.

P53 wird ebenfalls durch die HU-Behandlung aktiviert. Dies zeigt sich vor allem bei den C1-Cluster Zelllinien, während die C2-Cluster-Zellen keine Aktivierung von p53 im Vergleich zur Kontrolle aufweisen.

4.6.2 Effekte einer Behandlung mit MK-1775 auf murine PDAC-Zelllinien

Zudem wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit 500 nM MK für 24 h auf die verschiedenen Zelllinien untersucht.

Bei MK-1775 (MK) handelt es sich um einen selektiven *small molecule inhibitor* von WEE1 (Hirai et al. 2009; Hirai et al. 2010). WEE1 ist eine Tyrosinkinase, welche vor allem dafür bekannt ist, den G2/M-Übergang im Zellzyklus zu regulieren. Dies geschieht, indem WEE1 eine inhibitorische Phosphatgruppe auf den CDK1/Cyclin-B-

Komplex, welcher den Eintritt in die Mitose vermittelt, überträgt (Elbaek, Petrosius, and Sorensen 2020). MK ist in der Lage, die WEE1-vermittelte Phosphorylierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes zu reduzieren (Rajeshkumar et al. 2011). Es kommt zur Aufhebung des G2/M-Kontrollpunktes (Duan et al. 2018) und Krebszellen mit geschädigter DNA werden dazu gezwungen, vorzeitig in die Mitose einzutreten. Dies führt zu einer mitotischen Katastrophe und hat letztendlich den Zelltod zur Folge (De Witt Hamer et al. 2011; Ebeid, Ho, and Salem 2017).

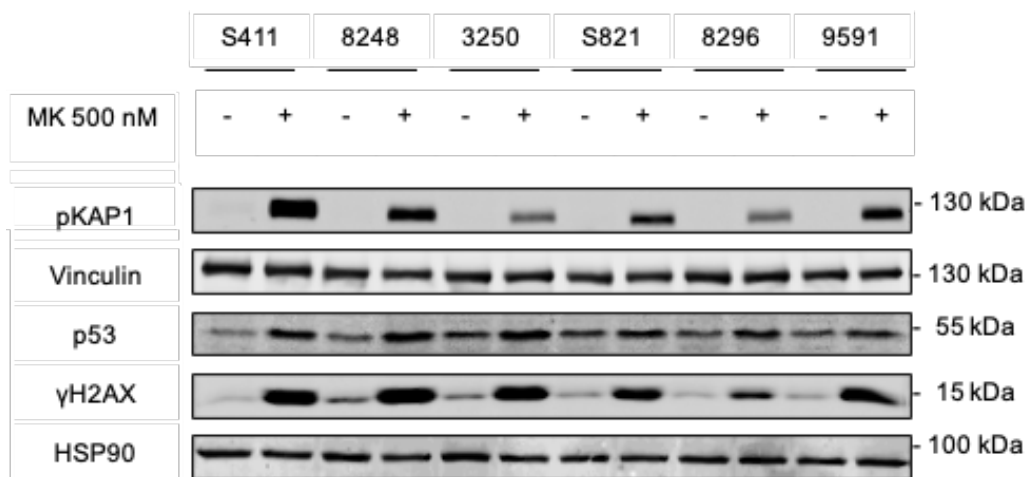


Abbildung 15: Western Blot-Analyse der Zelllinien S411, 8248, 3250, S821, 8296 und 9591 nach 24 h Behandlung mit MK

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle dienen Vinculin und HSP90. (n=2)

Auch eine Behandlung mit MK hat in allen sechs aufgetragenen Zelllinien die Phosphorylierung von KAP1 zur Folge. Am stärksten fällt die Aktivierung bei der C1-Cluster-Zelllinie S411 aus, am schwächsten hingegen bei den Zelllinien 3250 sowie 8296.

γH2AX wird durch MK ebenfalls in allen Zelllinien aktiviert. Analog zu den Beobachtungen aus 4.6.1 sind die basalen γH2AX-Level der Zelllinien 8248 und 3250 erneut vergleichsweise leicht erhöht.

In Bezug auf p53 führt die Behandlung in allen Zelllinien zu einer leicht verstärkten Expression im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Mesenchymale Zelllinien erhalten mehr PR130 und sind PD-sensitiv

Diese Arbeit konnte aufzeigen, dass verschiedene murine PDAC-Zellen mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten auf PD reagieren (s. Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4).

Exemplarisch kann dieses Phänomen zunächst durch den Vergleich der beiden Zelllinien 9591 und 3250 dargestellt werden. Während die 9591-Zellen nach 24 h erst bei der Behandlung mit der Höchstdosis von 10 μM PD einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate auf unter 50 % verzeichnen, weisen die 3250-Zellen eine dosisabhängige Zunahme an apoptotischen Zellen auf, welche nach der Behandlung mit 10 μM PD nahezu 100 % beträgt. Nach 48 h stellt sich dieser Unterschied noch wesentlich deutlicher dar.

Mithilfe der entsprechenden Western Blot-Analysen können grundlegende Unterschiede zwischen beiden Zelllinien auf Proteinebene definiert werden. So wird zunächst deutlich, dass der PR130-Gehalt der 3250-Zellen den der 9591-Zellen um ein Vielfaches übersteigt. Zudem hat die PD-Behandlung bei der 9591-Zelllinie im Vergleich zur 3250-Zelllinie nur eine geringe Abnahme von PR130 zur Folge.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Zelllinien wird durch den Nachweis von E-Cadherin verdeutlicht. Während die 9591-Zellen dieses Protein exprimieren und somit als Zellen epithelialen Phänotyps klassifiziert werden können, bleibt dieser Nachweis bei den 3250-Zellen aus. Dies deutet darauf hin, dass die 3250-Zellen mesenchymalen Ursprungs sind. Um einen eindeutigen Nachweis für den embryonalen Ursprung der 3250-Zellen zu erhalten, wäre die zusätzliche Detektion von N-Cadherin sinnvoll.

Die Western Blot-Analysen können zudem zeigen, dass PD die Einleitung der DDR auslöst, diese jedoch bei den 9591-Zellen insgesamt deutlich schwächer ausfällt als bei den 3250-Zellen. Initial stellt sich diese Beobachtung durch die Abnahme der ATM- sowie CHK1-Banden bei der 3250-Zelllinie, welche durch die Zunahme der aktivierten, phosphorylierten Formen erklärt werden kann, dar. Zur sicheren Bestätigung dieser Hypothese wäre zudem der Nachweis von pATM und pCHK1 interessant. Auch RAD51 verzeichnet eine merkliche Abnahme. Diese kann dadurch erklärt werden, dass Caspase 3 RAD51 im Rahmen der Apoptose spaltet, was die durch DNA-Schäden ausgelöste Zelltodreaktion unterstützt (Huang et al. 1999). Die deutlich frühere Aktivierung der Proteine pKAP1 und γH2AX bei den 3250-Zellen bestätigt

zusätzlich die unterschiedlich schnelle Einleitung der DDR. Zudem kommt es zu einer Zunahme der p53-Level, was eine typische Reaktion auf zelluläre Stresssignale darstellt (Meek 2015). Ergänzend könnte hier der Nachweis der phosphorylierten, aktivierten Form von p53 durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung stand jedoch kein entsprechender Antikörper für murine Zellen zur Verfügung. Analog zu den steigenden p53-Leveln wäre eine Zunahme der p21-Expression zu erwarten, diese lässt sich allerdings nur bei 9591 feststellen. Das Grundlevel an p21 ist bei 3250 deutlich höher und zeigt keine Zunahme durch die Behandlung, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass p21 bei 3250 bereits in der Kontrolle maximal aktiviert ist.

In der Western Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden konnten die Proteine *cleaved* Caspase 3 (cl. Casp. 3) sowie *cleaved* Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (cl. PARP), welche im Rahmen der Apoptose typischerweise exprimiert werden (Crowley and Waterhouse 2016; Bressenot et al. 2009). Um genauere Rückschlüsse über den Mechanismus, durch den PD zum Zelltod führt, zu erhalten, könnte daher zum einen mit dem Caspase-Inhibitor z-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluormethylketon (zVAD) gearbeitet werden. Falls die Zellen den Weg der Apoptose durchlaufen, kann eine Vorbehandlung mit zVAD deren Sterben verhindern (Forterre, Zurbriggen, and Spreng 2011). Zum anderen können Vorbehandlungen mit Necrostatin-1 und Ferrostatin-1 Auskunft darüber geben, ob der Zelltod alternativ über die Wege der Ferroptose oder Nekroptose erfolgt (Fontecha-Barriuso et al. 2020). Beide Mechanismen beschreiben eine Form des regulierten Zelltods. Während dieser sich bei der Ferroptose durch den Verlust der Aktivität des Lipidreparaturenzyms Glutathionperoxidase 4 (GPX4) auszeichnet, ist der Weg der Nekroptose *receptor-interacting protein kinase-3* (RIPK3)-abhängig (Yang and Stockwell 2016; Khoury et al. 2020). Es bedarf dahingehend somit weiterer Untersuchungen.

Die Unterschiede in der Empfindlichkeit beider Zelllinien gegenüber PD werden zusätzlich durch die Ergebnisse der PD-Zeitreihe (s. Abb. 10) bestätigt. Während die 3250-Zellen bereits nach 1 h mit zunehmender Behandlungsdauer einen Anstieg der Apoptoserate verzeichnen, welcher nach 24 h schließlich einen Wert von 98 % erreicht, kann bei den 9591-Zellen keine deutlich zeitabhängige Zunahme an apoptotischen Zellen registriert werden.

Zudem können digitalmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit 10 µM PD behandelten 3250- und 9591-Zellen die unterschiedlichen Empfindlichkeiten

beider Zelllinien bestätigen (s. Abb. 9). Nach der Behandlung schwimmen spindelförmige, adhärente 3250-Zellen ausnahmslos als rundliche, tote Zellen im Medium. Bei den 9591-Zellen hingegen sind nur vereinzelt vom Boden der Zellkulturflasche abgelöste Zellen zu registrieren. Die übrigen Zellen befinden sich noch immer in den in 4.2 beschriebenen Zellnestern, wobei das Zytoplasma dieser Zellen nach der Behandlung deutlich aufgequollener und flächiger erscheint. Dies kann als Hinweis auf zelluläre Seneszenz gesehen werden (Neurohr et al. 2019). Um zu überprüfen, ob es sich bei den behandelten 9591-Zellen tatsächlich um seneszenten Zellen handelt, bedarf es weiterer Untersuchungen. Der β -Galaktosidase-Test stellt diesbezüglich ein geeignetes Verfahren dar (Itahana, Campisi, and Dimri 2007).

Dass die 9591-Zellen epithelialen und die 3250-Zellen mesenchymalen Ursprungs sind, kann mithilfe der digitalmikroskopischen Bilder ebenfalls belegt werden. So bilden die zahlreichen Zell-Zell-Kontakte sowie die strukturelle Polarität der 9591-Zelllinie typische Merkmale für Zellen epithelialen Ursprungs, während der spindelförmige Aufbau der 3250-Zellen charakteristisch für mesenchymale Zelllinien ist (He and Magi-Galluzzi 2014).

Fasst man die oben aufgeführten Erkenntnisse zusammen, lassen sich die folgenden Unterschiede zwischen beiden Zelllinien festhalten: Bei 3250 handelt es sich um eine mesenchymale Zelllinie, welche viel PR130 enthält und sensitiv gegenüber PD reagiert. 9591 hingegen ist eine epitheliale Zelllinie, welche wenig PR130 enthält und relativ resistent gegenüber PD ist. Es wird somit vermutet, dass diese Unterschiede generelle Faktoren darstellen, welche die PD-Empfindlichkeit von PDAC-Zellen bestimmen. Diese Hypothese gilt es im Folgenden zu überprüfen.

Nachdem der PR130-Status als ein möglicher für den Erfolg der PD-Behandlung relevanter Faktor identifiziert wurde, wurden zunächst weitere Versuche zur Charakterisierung des Proteins durchgeführt. So sollte zunächst untersucht werden, inwiefern sich ein PR130-knockdown auf die PD-Empfindlichkeit muriner PDAC-Zellen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien 9591 und 3250 mittels siRNA gegen PR130 transfiziert (s. Abb. A, Abb. B). Da die siRNA-Transfektion allerdings keine zuverlässig reproduzierbaren Ergebnisse erzielte, wird ein vollständiger Crispr/CAS-Knockdown von PR130 im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeit als sinnvoll angesehen. Weitere Erkenntnisse über PR130 erbrachte allerdings die Fraktionierung von Zellkern und Cytoplasmaextrakten zur Bestimmung der intrazelluläre Lokalisation des Proteins (s. Abb. C). Die entsprechende

Western Blot-Analyse ergab, dass sich PR130 vorwiegend im Cytosol der Zelle befindet, wobei es bei den C2-Cluster Zelllinien in geringer Menge auch im Kern nachzuweisen war.

Die Validität der aufgeführten Hypothese bzgl. möglicher Faktoren, welche für die PD-Sensitivität bestimmter Zelllinien verantwortlich sind, kann zudem mithilfe folgenden Versuche überprüft werden.

Zum einen wurde untersucht, inwiefern die p53-mutierte Zelllinie 5436 auf PD reagiert. Ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle kann erst mit der verwendeten Höchstdosis von 10 μ M ausgelöst werden, wobei bei der genannten Konzentration noch immer über 50 % der Zellen am Leben sind (s. Abb. 3). Bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber PD lassen sich die 5436-Zellen somit mit 9591-Zellen vergleichen. Auch der PR130-Status der Zellen sowie deren epithelialer Phänotyp stellen Gemeinsamkeiten mit der 9591-Zelllinie dar (s. Abb. 7). Die entsprechende Western Blot-Analyse des Versuchs zeigt zudem, dass die PD-Behandlung der 5436-Zellen kaum Veränderungen auf Proteinebene zur Folge hat. Bezüglich der Schlüsselproteine der DDR lassen sich lediglich vereinzelte Aktivierungen von Proteinen, wie pKAP1 oder γ H2AX, verzeichnen, wobei diese erst ab Konzentrationen von 5 bzw. 10 μ M PD auftreten.

Zusätzlich belegt wird die Hypothese durch die PD-Behandlung der Zelllinie W22. Die Zellen weisen nach 24 h bereits hohe Apoptoseraten auf (s. Abb. 4), welche mit denen der 3250-Zellen zu vergleichen sind. Die entsprechenden Western Blot-Analyse zeigt zudem, dass es mit steigender Dosis zu einer deutlichen Abnahme von PR130 kommt (s. Abb. 8). Des weiteren konnte E-Cadherin nicht nachgewiesen werden, weshalb es sich um eine Zelllinie mesenchymalen Ursprungs handeln muss. In Bezug auf die Proteine der DDR, wie z. B. γ H2AX oder pKAP1, lässt sich eine frühere Aktivierung als bei den epithelialen Zelllinien feststellen.

Die Übersicht über die Reaktion verschiedener muriner Zelllinien auf PD (s. Abb. 11) zeigt zunächst, dass mesenchymale Zelllinien wie S411, 8248 und 3250 insgesamt höhere Apoptoseraten nach der Behandlung mit 2 μ M PD zeigen als die epithelialen Zelllinien S821, 8296 und 9591. Zudem konnte bestätigt werden, dass die mesenchymalen C1-Cluster-Zellen deutlich höhere PR130-Level aufweisen. In Bezug auf die im Rahmen dieses Experiments untersuchten Proteine pKAP1 und p53 fällt zudem auf, dass die mesenchymalen Zellen im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien eine Aktivierung der DRR verzeichnen. Die einzige Ausnahme bilden die 8248-Zellen,

welche innerhalb des C1-Clusters die geringste PD-Sensitivität aufweisen. Auf eine mögliche Ursache für diese Beobachtung wird in 5.5 eingegangen.

Mithilfe der Versuche an MIA PaCa-2- und MIA PaCa-2 NOXA KO-Zellen kann die Hypothese zudem für humane Zelllinien überprüft werden. Beide Zelllinien zeigen als Reaktion auf die Behandlung einen deutlichen, konzentrationsabhängigen Anstieg der Apoptoserate (s. Abb. 12). Auffällig ist zudem, dass die NOXA KO-Zelllinie, welche nach 48 h eine etwas höhere Gesamtapoptose aufweist als der Wildtyp, auch ein deutlich höheres PR130-Level besitzt (s. Abb. 13). Diese Beobachtung spricht ebenfalls dafür, dass der PR130-Status ein für die PD-Empfindlichkeit relevanter Faktor ist. Zudem kann N-Cadherin nachgewiesen werden, was einen mesenchymalen Ursprung dieser Zellen belegt. Beide Zelllinien zeigen außerdem eine deutliche Aktivierung von DDR-Schlüsselproteinen wie pATM, pKAP1, pp53 und γ H2AX.

Die oben genannte Hypothese wird somit durch alle im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Zelllinien bestätigt. PD-sensitive Zelllinien sind mesenchymalen Ursprungs und weisen vergleichsweise hohe PR130-Level auf. PD-resistente Zelllinien hingegen sind epithelialen Ursprungs und weisen geringere PR130-Level auf. Zudem ist festzuhalten, dass es als Reaktion auf die PD-Behandlung zu einer Aktivierung von DDR-Schlüsselproteinen kommt. Das Ausmaß dieser Aktivierung ist dabei abhängig davon, wie sensitiv eine Zelllinie gegenüber PD reagiert.

5.2 p53 ist nicht essentiell für den Zelltod durch PD

Es wurde in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt, dass eine PD-Behandlung die Aktivierung von DDR-Schlüsselproteinen zur Folge hat. So konnten entsprechende Western Blot-Analysen veranschaulichen, dass die sensitive 3250-Zelllinie mit steigender Dosis u. a. eine Zunahme des p53-Levels verzeichnet (s. Abb. 6). Bei den PD-resistenten 9591-Zellen hingegen ist diese Zunahme nur in sehr schwacher Form nachzuweisen. Die Übersicht über die Reaktion verschiedener muriner PDAC-Zellen auf eine Behandlung mit PD (s. Abb. 11) konnte ebenfalls zeigen, dass mesenchymale, PD-sensitive Zelllinien im Rahmen der Behandlung Zunahmen des p53-Levels aufweisen. Bei den epithelialen, PD-resistenten Zelllinien hingegen verändert sich die p53-Expression durch eine Behandlung mit 2 μ M PD nicht.

Diese Beobachtungen führen zu der Fragestellung, ob p53 ein für den Zelltod durch PD essentielles Protein darstellt oder eine Ausschaltung des Proteins ein Sterben der

Zellen verhindern kann. Diese Frage soll mithilfe der PD-Konzentrationsreihe der Zelllinie W22 beantwortet werden. Obwohl diese Zelllinie eine vollständige p53-Deletion aufweist (Schneider et al. 2010), reagiert sie sensitiv gegenüber PD. Das Protein p53 wird somit zwar mit steigender PD-Konzentration zunehmend aktiviert, ist jedoch nicht essentiell für die Auslösung des Zelltods.

Weiteren Aufschluss über die Bedeutung von p53 im Rahmen der PD-Behandlung gibt die Konzentrationsreihe von der Zelllinie 5436. Diese Zellen weisen eine p53R172H-Mutation auf, welche in Tumoren häufig nachgewiesen werden kann. Ursache dafür stellt die positive Wirkung der Mutation auf NF- κ B-regulierte Überlebensgene dar, wodurch Wachstum und Erhalt von Krebszellen gefördert werden (Schneider et al. 2010; Schafer et al. 2017). Diese Mutation zeigt sich auf Proteinebene durch eine Daueraktivität von p53, welche sich bereits in der Kontrolle darstellt (s. Abb. 7). Die Aktivierung von p21 als Targetprotein hingegen bleibt trotz starker p53-Aktivierung aus. Anhand der Annexin/PI-Messung (s. Abb. 3) lässt sich zudem feststellen, dass die p53-mutierten 5436-Zellen resistent gegenüber PD reagieren. Eine schützende Funktion von p53, welche die Zellen vor den Auswirkungen der PD-Behandlung bewahrt, kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die sensitiven Zelllinien im Rahmen der PD-Behandlung zwar eine Aktivierung von p53 verzeichnen, diese jedoch nicht zwingend notwendig ist, um ein Zellsterben zu initiieren. In Bezug auf PD-resistente Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die Expressierung von p53 keinen Schutz vor den Auswirkungen einer PD-Behandlung bietet, da deren Resistenz trotz p53-Mutation bestehen bleiben kann.

5.3 PD-Behandlung hat nur geringen Einfluss auf Zellzyklusverteilung

Bisher konnten u. a. die Effekte einer PD-Behandlung auf die Apoptoserate verschiedener PDAC-Zellen sowie auf Schlüsselproteine der DDR analysiert werden. Im Folgenden soll der Einfluss des Inhibitors auf die Zellzyklusverteilung diskutiert werden. Die SubG1-Messungen der PD-Konzentrationsreihe (s. Abb. 5) konnten zeigen, dass eine PD-Behandlung unerwarteterweise nur geringe Änderungen in der Zellzyklusverteilung zur Folge hat. So kommt es bei den PD-resistenten 9591 insgesamt zu einer Zunahme der Zellen in der G2- und einer Abnahme der Zellen in

der G1-Phase. In Bezug auf die PD-sensitiven 3250 lässt sich sowohl nach 24 h als auch nach 48 h bei einer Behandlung mit 1 μ M PD ebenfalls zunächst eine Zunahme an Zellen in G2 registrieren. Dieser G2-Block löst sich allerdings mit steigender Dosis wieder auf, sodass die Zellzyklusverteilungen nach Behandlung mit der Höchstdosis von 10 μ M jeweils etwa der der Kontrolle entsprechen.

Da die Apoptoseraten der 3250-Zellen nach der Behandlung mit 1 μ M PD noch sehr gering sind, kann vermutet werden, dass der G2-Block als Vorbote der Apoptose dient. Die Zellen werden zunächst in G2 abgefangen bevor mit zunehmender Dosis die Apoptoserate steigt und der G2-Block wieder aufgelöst wird. Gleiches lässt sich bei den 9591 beobachten. Da diese allerdings vergleichsweise PD-resistent sind, tritt der G2-Block als Vorbote der Apoptose erst deutlich später auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der in 5.1 diskutierten Erkenntnis, dass die Aktivierung der Checkpoint-Kinasen ATM, CHK1, etc. bei 9591 erst bei deutlich höheren PD-Konzentrationen erfolgt als bei 3250.

5.4 PR130 wird durch NOXA reguliert

PD-Konzentrationsreihen an MIA PaCa-2-Zellen konnten verdeutlichen, dass auch humane Zelllinien sensitiv gegenüber PD reagieren können (s. Abb. 12, Abb. 13). Die Zellen zeigen einen deutlichen, dosisabhängigen Anstieg der Apoptoserate und sind bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber PD mit den sensitiven 3250-Zellen zu vergleichen.

Unterschiede zeigten sich in der Reaktion von MIA PaCa-2 Wildtyp- und MIA PaCa-2 NOXA KO-Zellen. Während die Apoptoseraten beider Zelllinien nach 24 h kaum voneinander abweichen, weisen die NOXA KO-Zellen nach 48 h etwas höhere Apoptoseraten auf als die Wildtyp-Zellen. Die entsprechende Western Blot-Analyse konnte zudem verdeutlichen, dass das PR130-Grundlevel der NOXA KO-Zellen das der Wildtyp-Zellen um einiges übersteigt. Es lässt sich somit die Hypothese aufstellen, dass PR130 durch NOXA reguliert wird. Diese Beobachtung korreliert mit den in 5.1 diskutierten Ergebnissen und bestätigt, dass höhere PR130-Grundlevel mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber PD einhergehen.

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Zelllinien zeigte sich in Bezug auf das ATM-Signaling. Es fällt zunächst auf, dass die ATM- sowie pATM-Grundlevel der Wildtyp-Zellen die der NOXA KO-Zellen leicht übersteigen. Zudem stellt sich die pATM-Aktivierung im Laufe der Behandlung bei den MIA PaCa-2-Zellen wesentlich

intensiver dar. Eine Erklärung für diese Beobachtung bietet die von Göder et al. gelieferte Erkenntnis, dass PR130 die Dephosphorylierung von ATM durch PP2A fördert (Goder et al. 2018). Höhere PR130-Level gehen somit mit einer stärkeren Dephosphorylierung von ATM einher, weshalb pATM bei den NOXA KO-Zellen weniger stark aktiviert wird. Dennoch findet die Aktivierung der Targetproteine, wie z. B. pKAP1 oder pp53 (S15) bei beiden Zelllinien in etwa gleicher Intensität statt. Die Unterschiede im Downstream-Signaling können im Western Blot somit als nicht relevant angesehen werden.

5.5 Überexpression von BCL-XL kann resistente Zelllinien vor PD schützen

Um die Effekte von PD auf verschiedene murine Zelllinien vergleichen zu können, wurden sechs Zelllinien mit PD behandelt und die Effekte der Behandlung anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht (s. Abb. 11).

Die Ergebnisse dieses Versuchs können nicht nur die in 5.1 aufgeführten Faktoren, welche für die PD-Sensitivität bestimmter PDAC-Zelllinien verantwortlich sein sollen, bestätigen, sondern zeigen zudem, dass eine PD-Behandlung die Aktivierung von DDR-Proteinen zur Folge hat. Bei einer Behandlung mit 2 μ M PD lässt sich diese Aktivierung lediglich bei den mesenchymalen, PD-sensitiven Zelllinien nachweisen. Als Reaktion auf den Inhibitor kann bei diesen Zellen eine Zunahme der Proteine pKAP1 und p53 detektiert werden. Einzige Ausnahme bildet hier die Zelllinie 8248, bei welcher nach Behandlung mit 2 μ M PD keine Aktivierung zu registrieren ist. Die 8248-Zellen weisen zudem innerhalb des C1-Clusters die geringste prozentuelle Gesamtapoptose auf. Im Vergleich zu den anderen untersuchten mesenchymalen Zelllinien reagierten die 8248-Zellen somit am wenigsten sensitiv gegenüber PD. Als mögliche Ursache könnte der höhere BCL-XL-Gehalt dieser Zelllinie angesehen werden. Pons et al. konnten bereits aufzeigen, dass die pharmakologische Hemmung von BCL-XL in Kombination mit einer HU-Behandlung eine effektive Kombination gegen leukämische Zellen darstellt. Es wurde daher geschlussfolgert, dass BCL-XL die Apoptoseinduktion unterdrücken kann (Pons et al. 2021). Dies würde erklären, warum die 8248-Zellen weniger sensitiv gegenüber PD reagieren. Einen noch deutlich höheren BCL-XL-Gehalt als die PD-sensitiven 8248-Zellen weisen die Zelllinien des C2-Clusters auf. Demnach wird vermutet, dass der hohe BCL-XL-Gehalt der mesenchymalen 8248-Zellen sowie aller untersuchten epithelialen Zellen diese vor der

PD-Wirkung schützt und die Apoptoseinduktion verhindert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre ein BCL-XL-knockdown mittels siRNA oder dem BCL-XL-Inhibitor Navitoclax sinnvoll (Pons et al. 2021). Falls BCL-XL tatsächlich eine schützende Wirkung auf die Zellen ausüben sollte, müsste die Apoptoserate der entsprechenden Zelllinien bei nach siRNA-Transfektion bzw. BCL-XL-Hemmung bei gleicher Behandlung höher ausfallen. Es bedarf dahingehend somit weiterer Untersuchungen.

5.6 PD verursacht proteotoxischen Stress

Das Protein HSP70 ist als molekulares Chaperon für den korrekten Ablauf der gesamten Proteostase verantwortlich. Es kontrolliert somit u. a. die korrekte Proteinfaltung, den Proteinimport in Zellorganellen oder die Wiederherstellung von Proteinen vor Aggregation. Mitglieder der HSP70-Familie können zudem unter proteotoxischem Stress die Lebensfähigkeit der Zellen erhöhen, indem sie die Reparatur entstandener Proteinschäden fördern (Radons 2016). Eine erhöhte HSP70-Expression kann somit mit dem Vorhandensein von proteotoxischem Stress assoziiert werden.

Western Blot-Analysen konnten zeigen, dass die Behandlung mit PD eine Induktion des HSP70-Signals zur Folge hat, die Zellen demnach proteotoxischem Stress ausgesetzt werden. Diese Induktion lässt sich sowohl bei murinen (s. Abb. 6, Abb. 7, Abb. 11) als auch bei humanen PDAC-Zellen (s. Abb. 13) beobachten. Es wurde zudem festgestellt, dass die HSP70-Aktivierung umso früher eingeleitet wird, je sensitiver die entsprechenden Zellen auf PD reagieren. So zeigen die epithelialen 9591- und 5436-Zellen erst bei einer Dosis von 5 bzw. 10 μM PD eine Aktivierung von HSP70, die mesenchymalen 3250-Zellen hingegen bereits bei einer Behandlung mit 2 μM (s. Abb. 6, Abb. 7). Die Übersicht über verschiedene murine Zelllinien und deren Reaktion auf PD kann diese Beobachtung bestätigen (s. Abb. 11). Eine deutliche Induktion des HSP70-Signals im Vergleich zur Kontrolle lässt sich als Reaktion auf die Behandlung mit 2 μM PD nur bei den mesenchymalen, PD-sensitiven Zelllinien feststellen. Bei den epithelialen, PD-resistenten Zelllinien hingegen bleibt eine durch die Behandlung verursachte HSP70-Aktivierung aus.

Eine HSP70-Aktivierung als Reaktion auf die PD-Behandlung lässt sich auch in Bezug auf die humanen MIA PaCa-2-Wildtyp- bzw. NOXA KO-Zellen nachweisen (s. Abb. 13). Dass die NOXA KO-Zellen bereits in der Kontrolle ein höheres HSP70-Level als die Wildtyp-Zellen aufweisen, kann dadurch erklärt werden, dass die

Zellen durch den KO Stress ausgesetzt werden. Während der Kultivierung der Zellen fiel zudem auf, dass die NOXA KO-Zelllinie ein vergleichsweise langsames Wachstum aufwies. Das erhöhte Stresslevel dieser Zellen kann eine mögliche Ursache für diese Beobachtung darstellen.

Da PD, wie bereits in 5.1 diskutiert, die DDR aktiviert, stellt sich die Frage, ob diese Aktivierung direkt durch die PD-Behandlung oder indirekt über die Auslösung von proteotoxischem Stress verursacht wird. Um zu ermitteln, ob PD über die Aktivierung von DDR-Proteinen die Induktion des HSP70-Signals initiiert, könnten die Zellen im Rahmen künftiger Versuche zusätzlich mit ATM- oder ATR-Inhibitoren, wie KU-9553 (Li and Yang 2010) oder VX-970 (Gorecki et al. 2020) behandelt werden. Alternativ wäre ein vollständiger ATM-KO sinnvoll. Lässt sich anschließend noch immer eine Zunahme des HSP70-Signals detektieren, kann ausgeschlossen werden, dass die HSP70-Aktivierung erst über eine Aktivierung von Proteinen der DDR erfolgt. Entsprechend könnte durch die Behandlung der Zellen mit einem HSP70-Inhibitor, wie z. B. 2-(3-Chlorphenyl)-Ethynylsulfonamid (PES-Cl) (Balaburski et al. 2013), untersucht werden, ob trotz HSP70-Hemmung noch eine Aktivierung der DDR stattfindet.

5.7 Mesenchymale und epitheliale PDAC-Zelllinien unterscheiden sich nicht in ihrer Reaktion auf Replikationsstress

Wie bereits in 3.5.2 beschrieben handelt es sich bei HU um einen Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, deren Hemmung replikativen Stress zur Folge hat. Replikativer Stress bezeichnet die vorübergehende Verlangsamung oder den Stillstand der DNA-Synthese bzw. der Replikationsgabel, um unter dem Einfluss von Stressfaktoren eine fehlerhafte Kopie des Genoms zu vermeiden (Vesela et al. 2017). Ebenso kann MK über die Hemmung von WEE1 die genomische Instabilität erhöhen und Replikationsstress verursachen (Ha et al. 2020).

In 5.1 wurden bereits die Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener PDAC-Zellen gegenüber PD diskutiert. Durch die Einzelbehandlung muriner PDAC-Zelllinien mit HU und MK sollte zudem überprüft werden, ob sich mesenchymale, PD-sensitive und epitheliale, PD-resistente Zellen auch in ihrer Reaktion auf replikativen Stress grundlegend unterscheiden. Somit soll überprüft werden, ob sich die erhöhte PD-Sensitivität der mesenchymalen Zelllinien durch generelle Defekte dieser Zellen begründen lässt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden entsprechende Western Blot-Analysen durchgeführt (s. Abb. 14,

Abb. 15). Untersucht wurden jeweils die DDR-Proteine pKAP1, p53 und γ H2AX. In Bezug auf die Aktivierung dieser Proteine als Reaktion auf die verwendeten Inhibitoren ließen sich keine generellen Unterschiede zwischen mesenchymalen und epithelialen Zelllinien feststellen. Somit unterscheiden sich C1- und C2-Cluster-Zelllinien zwar in ihrer Reaktion auf PD, nicht jedoch in ihrer Reaktion auf Replikationsstress. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die hohe Empfindlichkeit der mesenchymalen Zelllinien gegenüber PD auf einer geringeren Resistenz gegenüber Inhibitoren im Allgemeinen beruht.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom stellt eine der weltweit tödlichsten Krebserkrankungen dar. Während sich die Überlebensraten anderer maligner Erkrankungen über die letzten Jahre erheblich verbessert haben, ist die Prognose des Pankreaskarzinoms relativ unverändert geblieben. Ursache dafür stellen neben der Diagnose in einem meist bereits fortgeschrittenen Stadium die unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten dar (Ansari et al. 2016; Gupta, Amanam, and Chung 2017). Dies macht die Notwendigkeit der Entwicklung neuer, effektiver Therapieoptionen deutlich.

Da eine Fehlregulation von PP2A ein in vielen Krebsarten vorkommendes Phänomen darstellt, stößt deren therapeutischer Angriff im Rahmen aktueller Forschungsarbeit auf großes Interesse (O'Connor et al. 2018). Dzulko et al. gelang es außerdem, die PP2A-Untereinheit PR130 als Schlüsselprotein zur Steuerung tumorrelevanter Funktionen in verschiedenen Krebszellarten zu charakterisieren (Dzulko et al. 2020). Anhand von Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass der direkte therapeutische Angriff mittels eines *small molecule inhibitors* von PP2A namens PD die Proliferation von Melanomzellen stoppen kann (Yue et al. 2020). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden diese Effekte an PDAC-Zellen untersucht, um zu definieren, inwiefern sich PP2A als pharmakologisches Zielprotein in Pankreaskarzinomzellen eignet und welche Rolle die Untereinheit PR130 dabei einnimmt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein direkter Angriff von PP2A je nach Zelllinie zu einem dosisabhängigen Anstieg der Apoptoserate führen kann. Dafür wurden verschiedene murine sowie humane PDCA-Zellen mit PD behandelt und deren Apoptoserate anschließend durchflusszytometrisch gemessen (s. Abb. 2, 3, 4, 12). Ob eine Zelllinie sensitiv gegenüber PD reagiert oder nicht, ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. So konnte mithilfe entsprechender Western Blot-Analysen (s. Abb. 6, 7, 8, 11, 13) festgestellt werden, dass PDAC-Zellen, die mesenchymalen Ursprungs sind viel PR130 enthalten und sensitiv gegenüber PD reagieren. Zellen epithelialen Ursprungs hingegen weisen vergleichsweise geringere PR130-Level auf und reagieren resistent gegenüber PD. Diese Erkenntnis gilt sowohl für murine als auch für humane Zelllinien.

Die PD-Konzentrationsreihe der humanen MIA PaCa-2 Wildtyp- sowie MIA PaCa-2 NOXA KO-Zellen ergab zudem, dass PR130 durch NOXA reguliert werden muss, da die Zellen nach dem NOXA KO deutlich mehr PR130 enthalten

(s. Abb. 13). Einhergehend mit dem höheren PR130-Gehalts zeigt diese Zelllinie außerdem eine entsprechend höhere Empfindlichkeit gegenüber PD.

Durch die Behandlung muriner Zellen mit den Inhibitoren Hydroxyurea und MK-1775 sollte zudem untersucht werden, ob sich die Unterschiede in der Empfindlichkeit mit generelle Defekte der sensitiven Zellen begründen lassen (s. Abb. 14, 15). Da sich mesenchymale und epitheliale Zelllinien in ihrer Reaktion auf den durch die Inhibitoren ausgelösten Replikationsstress nicht grundsätzlich unterschieden, ist ein solcher Defekt auszuschließen.

Reagiert eine Zelle auf PD, kommt es zur Aktivierung diverser DDR-Schlüsselproteine, u. a. steigt das p53-Level. Durch die PD-Behandlung p53-mutierter (5436) sowie p53-negativer Zellen (W22) sollte ermittelt werden, welche Rolle p53 im Rahmen der zellulären Schadensantwort einnimmt (s. Abb. 3, 4, 7, 8). Da auch die p53-negative Zelllinie W22 sensitiv gegenüber dem Inhibitor reagiert, kann davon ausgegangen werden, dass p53 kein essentielles Protein darstellt, um den Zelltod durch PD auszulösen. Neben der Aktivierung der DDR kommt es durch die Behandlung zu einem deutlichen Anstieg des HSP70-Levels, was einen Marker für proteotoxischen Stress darstellt (Hightower 1991). Ob die PD-Behandlung jedoch zunächst die Aktivierung der DDR-Proteine auslöst und diese die Aktivierung von proteotoxischem Stress zur Folge hat oder umgekehrt, ist bisher ungeklärt. Der genaue Mechanismus, über welchen PD letztendlich zum Zelltod führt, bedarf demnach weiterer Untersuchungen.

Die dargestellten Ergebnisse dieser Dissertation konnten somit zeigen, dass PD grundsätzlich die Proliferation von murinen wie auch humanen PDAC-Zellen stoppen kann. Der PR130-Gehalt scheint dabei einer von mehreren Faktoren zu sein, welcher für die Empfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie gegenüber PD verantwortlich ist. Diese Erkenntnisse können möglicherweise eine erste Grundlage für die Entwicklung PP2A-gesteuerter Therapiekonzepte des Pankreaskarzinoms schaffen.

Literaturverzeichnis

- Adams, R. L., and J. G. Lindsay. 1967. 'Hydroxyurea reversal of inhibition and use as a cell-synchronizing agent', *J Biol Chem*, 242: 1314-7.
- Adsay, N. V. 2008. 'Cystic neoplasia of the pancreas: pathology and biology', *J Gastrointest Surg*, 12: 401-4.
- Ahn, J. Y., J. K. Schwarz, H. Piwnica-Worms, and C. E. Canman. 2000. 'Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation', *Cancer Res*, 60: 5934-6.
- Aigner, K. R., F. O. Stephens, T. Allen-Mersh, G. Hortobagyi, D. Khayat, S. M. Picksley, P. Sugarbaker, T. Taguchi, and J. F. Thompson. 2016. *Onkologie Basiswissen* (Springer Berlin Heidelberg).
- Aktories, K., U. Förstermann, F. Hofmann, and K. Starke. 2017. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Elsevier).
- Ansari, D., B. Tingstedt, B. Andersson, F. Holmquist, C. Stureson, C. Williamsson, A. Sasor, D. Borg, M. Bauden, and R. Andersson. 2016. 'Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow', *Future Oncol*, 12: 1929-46.
- Bakkenist, C. J., and M. B. Kastan. 2003. 'DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation', *Nature*, 421: 499-506.
- Balaburski, G. M., J. I. Leu, N. Beeharry, S. Hayik, M. D. Andrade, G. Zhang, M. Herlyn, J. Villanueva, R. L. Dunbrack, Jr., T. Yen, D. L. George, and M. E. Murphy. 2013. 'A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent', *Mol Cancer Res*, 11: 219-29.
- Balkwill, F., and A. Mantovani. 2001. 'Inflammation and cancer: back to Virchow?', *Lancet*, 357: 539-45.
- Basu, A. K. 2018. 'DNA Damage, Mutagenesis and Cancer', *Int J Mol Sci*, 19.
- Bourdon, J. C. 2007. 'p53 and its isoforms in cancer', *Br J Cancer*, 97: 277-82.
- Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun. 2006. 'The when and wheres of CDC25 phosphatases', *Curr Opin Cell Biol*, 18: 185-91.
- Boutros, R., V. Lobjois, and B. Ducommun. 2007. 'CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?', *Nat Rev Cancer*, 7: 495-507.
- Boyd, A. S., and K. H. Neldner. 1991. 'Hydroxyurea therapy', *J Am Acad Dermatol*, 25: 518-24.
- Bressenot, A., S. Marchal, L. Bezdetnaya, J. Garrier, F. Guillemin, and F. Plenat. 2009. 'Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma', *J Histochem Cytochem*, 57: 289-300.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D. J. Chen. 2001. 'ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks', *J Biol Chem*, 276: 42462-7.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, and D. D. Von Hoff. 1997. 'Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial', *J Clin Oncol*, 15: 2403-13.
- Buscher, M. 2019. 'Flow Cytometry Instrumentation - An Overview', *Curr Protoc Cytom*, 87: e52.
- Canman, C. E., D. S. Lim, K. A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M. B. Kastan, and J. D. Siliciano. 1998. 'Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53', *Science*, 281: 1677-9.

- Cantley, L. C. 2002. 'The phosphoinositide 3-kinase pathway', *Science*, 296: 1655-7.
- Chantrill, L. A., A. M. Nagrial, C. Watson, A. L. Johns, M. Martyn-Smith, S. Simpson, S. Mead, M. D. Jones, J. S. Samra, A. J. Gill, N. Watson, V. T. Chin, J. L. Humphris, A. Chou, B. Brown, A. Morey, M. Pajic, S. M. Grimmond, D. K. Chang, D. Thomas, L. Sebastian, K. Sjoquist, S. Yip, N. Pavlakis, R. Asghari, S. Harvey, P. Grimison, J. Simes, A. V. Biankin, Initiative Australian Pancreatic Cancer Genome, and Group Individualized Molecular Pancreatic Cancer Therapy Trial Management Committee of the Australasian Gastrointestinal Trials. 2015. 'Precision Medicine for Advanced Pancreas Cancer: The Individualized Molecular Pancreatic Cancer Therapy (IMPACT) Trial', *Clin Cancer Res*, 21: 2029-37.
- Chapman, J. R., and S. P. Jackson. 2008. 'Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage', *EMBO Rep*, 9: 795-801.
- Chen, W., Z. Wang, C. Jiang, and Y. Ding. 2013. 'PP2A-Mediated Anticancer Therapy', *Gastroenterol Res Pract*, 2013: 675429.
- Chowdhury, D., M. C. Keogh, H. Ishii, C. L. Peterson, S. Buratowski, and J. Lieberman. 2005. 'gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair', *Mol Cell*, 20: 801-9.
- Cimprich, K. A., and D. Cortez. 2008. 'ATR: an essential regulator of genome integrity', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 616-27.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, Unicancer Groupe Tumeurs Digestives of, and Prodiges Intergroup. 2011. 'FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer', *N Engl J Med*, 364: 1817-25.
- Conroy, T., P. Hammel, M. Hebbar, M. Ben Abdelghani, A. C. Wei, J. L. Raoul, L. Chone, E. Francois, P. Artru, J. J. Biagi, T. Lecomte, E. Assenat, R. Faroux, M. Ychou, J. Volet, A. Sauvanet, G. Breysacher, F. Di Fiore, C. Cripps, P. Kavan, P. Texereau, K. Bouhier-Leporrier, F. Khemissa-Akouz, J. L. Legoux, B. Juzyna, S. Gourgou, C. J. O'Callaghan, C. Jouffroy-Zeller, P. Rat, D. Malka, F. Castan, J. B. Bachet, Group Canadian Cancer Trials, and G. I. Prodiges Group the Unicancer. 2018. 'FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer', *N Engl J Med*, 379: 2395-406.
- Crispin, J. C., C. M. Hedrich, and G. C. Tsokos. 2013. 'Gene-function studies in systemic lupus erythematosus', *Nat Rev Rheumatol*, 9: 476-84.
- Crowley, L. C., and N. J. Waterhouse. 2016. 'Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry', *Cold Spring Harb Protoc*, 2016.
- Darzynkiewicz, Z., X. Huang, and H. Zhao. 2017. 'Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry', *Curr Protoc Immunol*, 119: 5 7 1-5 7 20.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal. 2002. 'Mutations of the BRAF gene in human cancer', *Nature*, 417: 949-54.

- De Witt Hamer, P. C., S. E. Mir, D. Noske, C. J. Van Noorden, and T. Wurdinger. 2011. 'WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe', *Clin Cancer Res*, 17: 4200-7.
- Deegan, C., B. Coyle, M. McCann, M. Devereux, and D. A. Egan. 2006. 'In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂·4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines', *Chem Biol Interact*, 164: 115-25.
- Delude, R. L. 2005. 'Flow cytometry', *Crit Care Med*, 33: S426-8.
- Desterke, C., C. Bilhou-Nabera, B. Guerton, C. Martinaud, C. Tonetti, D. Clay, P. Guglielmelli, A. Vannucchi, D. Bordessoule, H. Hasselbalch, B. Dupriez, N. Benzoubir, M. F. Bourgeade, O. Pierre-Louis, V. Lazar, W. Vainchenker, A. Bennaceur-Griscelli, H. Gisslinger, S. Giraudier, M. C. Le Bousse-Kerdiles, Disorders French Intergroup of Myeloproliferative, Inserm French, and Eumnet Networks on Myelofibrosis European. 2011. 'FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis', *Cancer Res*, 71: 2901-15.
- Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF. 2013. 'Leitlinienprogramm Onkologie: Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0'. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Pankreaskarzinom/LL_Pankreas_OL_Langversion.pdf.
- Diamandis, E. P. 1992. 'Oncogenes and tumor suppressor genes: new biochemical tests', *Crit Rev Clin Lab Sci*, 29: 269-305.
- Duan, Y., X. Dong, J. Nie, P. Li, F. Lu, D. Ma, and C. Ji. 2018. 'Wee1 kinase inhibitor MK-1775 induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells and enhances the efficacy of doxorubicin involving downregulation of Notch pathway', *Oncol Lett*, 16: 5473-81.
- Dzulko, M., M. Pons, A. Henke, G. Schneider, and O. H. Kramer. 2020. 'The PP2A subunit PR130 is a key regulator of cell development and oncogenic transformation', *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1874: 188453.
- Ebeid, K., G. N. Ho, and A. K. Salem. 2017. 'HPLC-UV method for simultaneous determination of MK-1775 and AZD-7762 in both acetonitrile-aqueous solution and mouse plasma', *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1044-1045: 70-76.
- Eichhorn, P. J., M. P. Creighton, and R. Bernards. 2009. 'Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1795: 1-15.
- Elbaek, C. R., V. Petrosius, and C. S. Sorensen. 2020. 'WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry', *Mutat Res*, 819-820: 111694.
- Elford, H. L. 1968. 'Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase', *Biochem Biophys Res Commun*, 33: 129-35.
- Engstrom, Y., S. Eriksson, I. Jildevik, S. Skog, L. Thelander, and B. Tribukait. 1985. 'Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits', *J Biol Chem*, 260: 9114-6.
- Fontecha-Barriuso, M., D. Martin-Sanchez, J. M. Martinez-Moreno, D. Cardenas-Villacres, S. Carrasco, M. D. Sanchez-Nino, M. Ruiz-Ortega, A. Ortiz, and A. B. Sanz. 2020. 'Molecular pathways driving omeprazole nephrotoxicity', *Redox Biol*, 32: 101464.
- Forterre, S., A. Zurbriggen, and D. Spreng. 2011. 'In vitro effect of different mediators of apoptosis on canine cranial and caudal cruciate ligament fibroblasts and its reversibility by pancaspase inhibitor zVAD.fmk', *Vet Immunol Immunopathol*, 139: 264-70.

- Fowle, H., Z. Zhao, and X. Grana. 2019. 'PP2A holoenzymes, substrate specificity driving cellular functions and deregulation in cancer', *Adv Cancer Res*, 144: 55-93.
- Freeman, A. K., V. Dapic, and A. N. Monteiro. 2010. 'Negative regulation of CHK2 activity by protein phosphatase 2A is modulated by DNA damage', *Cell Cycle*, 9: 736-47.
- Fukushima, N., N. Sato, T. Ueki, C. Rosty, K. M. Walter, R. E. Wilentz, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and M. Goggins. 2002. 'Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma', *Am J Pathol*, 160: 1573-81.
- Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell. 1997. 'Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase', *Science*, 277: 1495-7.
- Georgakilas, A. G., O. A. Martin, and W. M. Bonner. 2017. 'p21: A Two-Faced Genome Guardian', *Trends Mol Med*, 23: 310-19.
- Georgakis, N., E. Ioannou, C. Varotsou, G. Premetis, E. G. Chronopoulou, and N. E. Labrou. 2020. 'Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration of an Enzyme Inhibitor', *Methods Mol Biol*, 2089: 41-46.
- Gnoni, A., A. Licchetta, A. Scarpa, A. Azzariti, A. E. Brunetti, G. Simone, P. Nardulli, D. Santini, M. Aieta, S. Delcuratolo, and N. Silvestris. 2013. 'Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions', *Int J Mol Sci*, 14: 19731-62.
- Goder, A., C. Emmerich, T. Nikolova, N. Kiweler, M. Schreiber, T. Kuhl, D. Imhof, M. Christmann, T. Heinzl, G. Schneider, and O. H. Kramer. 2018. 'HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130', *Nat Commun*, 9: 764.
- Goldring, J. P. D. 2019. 'Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis', *Methods Mol Biol*, 1855: 31-39.
- Goodarzi, A. A., J. C. Jonnalagadda, P. Douglas, D. Young, R. Ye, G. B. Moorhead, S. P. Lees-Miller, and K. K. Khanna. 2004. 'Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A', *EMBO J*, 23: 4451-61.
- Goral, V. 2015. 'Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis', *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 5619-24.
- Gorecki, L., M. Andrs, M. Rezacova, and J. Korabecny. 2020. 'Discovery of ATR kinase inhibitor berzosertib (VX-970, M6620): Clinical candidate for cancer therapy', *Pharmacol Ther*, 210: 107518.
- Gstraunthaler, G., and T. Lindl. 2013. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen* (Springer Spektrum: Heidelberg).
- Gupta, R., I. Amanam, and V. Chung. 2017. 'Current and future therapies for advanced pancreatic cancer', *J Surg Oncol*, 116: 25-34.
- Ha, D. H., A. Min, S. Kim, H. Jang, S. H. Kim, H. J. Kim, H. S. Ryu, J. L. Ku, K. H. Lee, and S. A. Im. 2020. 'Antitumor effect of a WEE1 inhibitor and potentiation of olaparib sensitivity by DNA damage response modulation in triple-negative breast cancer', *Sci Rep*, 10: 9930.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Harper, J. W., and S. J. Elledge. 2007. 'The DNA damage response: ten years after', *Mol Cell*, 28: 739-45.
- Harrison, J. C., and J. E. Haber. 2006. 'Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint', *Annu Rev Genet*, 40: 209-35.
- He, H., and C. Magi-Galluzzi. 2014. 'Epithelial-to-mesenchymal transition in renal neoplasms', *Adv Anat Pathol*, 21: 174-80.

- Herold, G. 2019. *Innere Medizin* (De Gruyter).
- Hightower, L. E. 1991. 'Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity', *Cell*, 66: 191-7.
- Hirai, H., T. Arai, M. Okada, T. Nishibata, M. Kobayashi, N. Sakai, K. Imagaki, J. Ohtani, T. Sakai, T. Yoshizumi, S. Mizuarai, Y. Iwasawa, and H. Kotani. 2010. 'MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil', *Cancer Biol Ther*, 9: 514-22.
- Hirai, H., Y. Iwasawa, M. Okada, T. Arai, T. Nishibata, M. Kobayashi, T. Kimura, N. Kaneko, J. Ohtani, K. Yamanaka, H. Itadani, I. Takahashi-Suzuki, K. Fukasawa, H. Oki, T. Nambu, J. Jiang, T. Sakai, H. Arakawa, T. Sakamoto, T. Sagara, T. Yoshizumi, S. Mizuarai, and H. Kotani. 2009. 'Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents', *Mol Cancer Ther*, 8: 2992-3000.
- Hishinuma, S., Y. Ogata, M. Tomikawa, I. Ozawa, K. Hirabayashi, and S. Igarashi. 2006. 'Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings', *J Gastrointest Surg*, 10: 511-8.
- Hnasko, T. S., and R. M. Hnasko. 2015. 'The Western Blot', *Methods Mol Biol*, 1318: 87-96.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, and G. J. Offerhaus. 2001. 'Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions', *Am J Surg Pathol*, 25: 579-86.
- Hua, Z., Y. C. Zhang, X. M. Hu, and Z. G. Jia. 2003. 'Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma', *World J Gastroenterol*, 9: 2764-7.
- Huang, Y., S. Nakada, T. Ishiko, T. Utsugisawa, R. Datta, S. Kharbanda, K. Yoshida, R. V. Talanian, R. Weichselbaum, D. Kufe, and Z. M. Yuan. 1999. 'Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage', *Mol Cell Biol*, 19: 2986-97.
- Itahana, K., J. Campisi, and G. P. Dimri. 2007. 'Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay', *Methods Mol Biol*, 371: 21-31.
- Iyengar, S., and P. J. Farnham. 2011. 'KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome', *J Biol Chem*, 286: 26267-76.
- Jackson, S. P., and J. Bartek. 2009. 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461: 1071-8.
- Janssens, V., and J. Goris. 2001. 'Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling', *Biochem J*, 353: 417-39.
- Kabakov, A. E., and V. L. Gabai. 2018. 'Cell Death and Survival Assays', *Methods Mol Biol*, 1709: 107-27.
- Kalev, P., M. Simicek, I. Vazquez, S. Munck, L. Chen, T. Sojin, N. Danda, W. Chen, and A. Sablina. 2012. 'Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition', *Cancer Res*, 72: 6414-24.
- Khoury, M. K., K. Gupta, S. R. Franco, and B. Liu. 2020. 'Necroptosis in the Pathophysiology of Disease', *Am J Pathol*, 190: 272-85.
- Kiely, M., and P. A. Kiely. 2015. 'PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing?', *Cancers (Basel)*, 7: 648-69.

- Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C. D. Johnson, A. V. Biankin, R. E. Neale, M. Tempero, D. A. Tuveson, R. H. Hruban, and J. P. Neoptolemos. 2016. 'Pancreatic cancer', *Nat Rev Dis Primers*, 2: 16022.
- Kowluru, A., and A. Matti. 2012. 'Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences', *Biochem Pharmacol*, 84: 591-7.
- Kumar, S., J. Stokes, 3rd, U. P. Singh, K. Scisum Gunn, A. Acharya, U. Manne, and M. Mishra. 2016. 'Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer', *Cancer Lett*, 374: 156-66.
- Kuo, L. J., and L. X. Yang. 2008. 'Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks', *In Vivo*, 22: 305-9.
- Lakin, N. D., and S. P. Jackson. 1999. 'Regulation of p53 in response to DNA damage', *Oncogene*, 18: 7644-55.
- Lambrecht, C., D. Haesen, W. Sents, E. Ivanova, and V. Janssens. 2013. 'Structure, regulation, and pharmacological modulation of PP2A phosphatases', *Methods Mol Biol*, 1053: 283-305.
- Lavin, M. F. 2008. 'Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 759-69.
- Lee, J. H., and T. T. Paull. 2005. 'ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex', *Science*, 308: 551-4.
- . 2007. 'Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks', *Oncogene*, 26: 7741-8.
- Leung-Pineda, V., C. E. Ryan, and H. Piwnicka-Worms. 2006. 'Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit', *Mol Cell Biol*, 26: 7529-38.
- Li, Y., and D. Q. Yang. 2010. 'The ATM inhibitor KU-55933 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by blocking Akt in cancer cells with overactivated Akt', *Mol Cancer Ther*, 9: 113-25.
- Li, Z., A. H. Pearlman, and P. Hsieh. 2016. 'DNA mismatch repair and the DNA damage response', *DNA Repair (Amst)*, 38: 94-101.
- Lindahl, T., and D. E. Barnes. 2000. 'Repair of endogenous DNA damage', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65: 127-33.
- Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A. B. Lowenfels, and J. Luttges. 2005. 'Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis', *Neoplasia*, 7: 17-23.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M. A. Rivera, A. Celeste, J. P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T. T. Paull, F. W. Alt, and J. Chen. 2006. 'MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals', *Mol Cell*, 21: 187-200.
- Loveday, B. P. T., L. Lipton, and B. N. Thomson. 2019. 'Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management', *Aust J Gen Pract*, 48: 826-31.
- Lukas, C., J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek, and J. Lukas. 2003. 'Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage', *Nat Cell Biol*, 5: 255-60.
- Luttges, J., H. Galehdari, V. Brocker, I. Schwarte-Waldhoff, D. Henne-Bruns, G. Kloppel, W. Schmiegel, and S. A. Hahn. 2001. 'Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis', *Am J Pathol*, 158: 1677-83.

- Luttges, J., A. Reinecke-Luthge, B. Mollmann, M. A. Menke, A. Clemens, M. Klimpfinger, B. Sipos, and G. Kloppel. 1999. 'Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution', *Virchows Arch*, 435: 461-8.
- Marshall, C. J. 1991. 'Tumor suppressor genes', *Cell*, 64: 313-26.
- Marshall, C. J., and E. A. Nigg. 1998. 'Oncogenes and cell proliferation. Cancer genes: lessons from genetics and biochemistry', *Curr Opin Genet Dev*, 8: 11-3.
- Matsumoto, H., H. Haniu, and N. Komori. 2019. 'Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE', *Methods Mol Biol*, 1855: 101-05.
- Matthaei, H., M. Dal Molin, and A. Maitra. 2013. 'Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer', *Methods Mol Biol*, 980: 1-12.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli, and R. A. Franklin. 2007. 'Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1263-84.
- McGuigan, A., P. Kelly, R. C. Turkington, C. Jones, H. G. Coleman, and R. S. McCain. 2018. 'Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes', *World J Gastroenterol*, 24: 4846-61.
- McKinnon, K. M. 2018. 'Flow Cytometry: An Overview', *Curr Protoc Immunol*, 120: 5 1 1-5 1 11.
- Meek, D. W. 2015. 'Regulation of the p53 response and its relationship to cancer', *Biochem J*, 469: 325-46.
- Mendonsa, A. M., T. Y. Na, and B. M. Gumbiner. 2018. 'E-cadherin in contact inhibition and cancer', *Oncogene*, 37: 4769-80.
- Morsi, R. Z., R. Hage-Sleiman, H. Kobeissy, and G. Dbaibo. 2018. 'Noxa: Role in Cancer Pathogenesis and Treatment', *Curr Cancer Drug Targets*, 18: 914-28.
- Mostafa, M. E., I. Erbarut-Seven, B. Pehlivanoglu, and V. Adsay. 2017. 'Pathologic classification of "pancreatic cancers": current concepts and challenges', *Chin Clin Oncol*, 6: 59.
- Muzumdar, M. D., P. Y. Chen, K. J. Dorans, K. M. Chung, A. Bhutkar, E. Hong, E. M. Noll, M. R. Sprick, A. Trumpp, and T. Jacks. 2017. 'Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function', *Nat Commun*, 8: 1090.
- Narayanaswamy, P. B., S. Tkachuk, H. Haller, I. Dumler, and Y. Kiyan. 2016. 'CHK1 and RAD51 activation after DNA damage is regulated via urokinase receptor/TLR4 signaling', *Cell Death Dis*, 7: e2383.
- Neoptolemos, J. P., J. Kleeff, P. Michl, E. Costello, W. Greenhalf, and D. H. Palmer. 2018. 'Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15: 333-48.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M. J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M. N. Wente, J. R. Izbicki, H. Friess, M. M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P. A. Lind, D. Smith, J. W. Valle, D. H. Palmer, J. A. Buckels, J. Thompson, C. J. McKay, C. L. Rawcliffe, M. W. Buchler, and Cancer European Study Group for Pancreatic. 2010. 'Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial', *JAMA*, 304: 1073-81.
- Neurohr, G. E., R. L. Terry, J. Lengfeld, M. Bonney, G. P. Brittingham, F. Moretto, T. P. Miettinen, L. P. Vaites, L. M. Soares, J. A. Paulo, J. W. Harper, S. Buratowski, S. Manalis,

- F. J. van Werven, L. J. Holt, and A. Amon. 2019. 'Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence', *Cell*, 176: 1083-97 e18.
- Norfadzilah, M. Y., J. Pailoor, M. Retneswari, K. Chinna, and L. M. Noor. 2011. 'P53 expression in invasive pancreatic adenocarcinoma and precursor lesions', *Malays J Pathol*, 33: 89-94.
- O'Connor, C. M., A. Perl, D. Leonard, J. Sangodkar, and G. Narla. 2018. 'Therapeutic targeting of PP2A', *Int J Biochem Cell Biol*, 96: 182-93.
- Oettle, H., T. Bauernhofer, M. Borner, G. Faber, R. Fietkau, V. Heinemann, U. P. Neumann, R. Pritzkeleit, M. Sinn, D. T. Waldschmidt, and B. Wörmann. 2018. 'Pankreaskarzinom'. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guide/line/html/index.html>.
- Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken, and H. Riess. 2007. 'Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial', *JAMA*, 297: 267-77.
- Ott, C., E. Heinmöller, A. Gaumann, J. Schölmerich, and F. Klebl. 2007. 'Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms', *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*: 127-35.
- Panier, S., and S. J. Boulton. 2014. 'Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 7-18.
- Park, H. A., and E. A. Jonas. 2017. 'DeltaN-Bcl-xL, a therapeutic target for neuroprotection', *Neural Regen Res*, 12: 1791-94.
- Patnaik, M. M. 2018. 'The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia', *Leuk Lymphoma*, 59: 2273-86.
- Phan, T. G., and P. I. Croucher. 2020. 'The dormant cancer cell life cycle', *Nat Rev Cancer*, 20: 398-411.
- Piper, W. 2013. *Innere Medizin* (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).
- Pitot, H. C. 1989. 'Progression: the terminal stage in carcinogenesis', *Jpn J Cancer Res*, 80: 599-607.
- Pivetta, T., F. Trudu, E. Valletta, F. Isaia, C. Castellano, F. Demartin, R. Tuveri, S. Vascellari, and A. Pani. 2014. 'Novel copper(II) complexes as new promising antitumour agents. A crystal structure of [Cu(1,10-phenanthroline-5,6-dione)2(OH2)(OCIO3)](ClO4)', *J Inorg Biochem*, 141: 103-13.
- Pons, M., Y. Zeyn, S. Zahn, N. Mahendrarajah, B. D. G. Page, P. T. Gunning, R. Moriggl, W. Brenner, F. Butter, and O. H. Kramer. 2021. 'Oncogenic Kinase Cascades Induce Molecular Mechanisms That Protect Leukemic Cell Models from Lethal Effects of De Novo dNTP Synthesis Inhibition', *Cancers (Basel)*, 13.
- Prakash, R., Y. Zhang, W. Feng, and M. Jasin. 2015. 'Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a016600.
- Qin, J., H. G. Chen, Q. Yan, M. Deng, J. Liu, S. Doerge, W. Ma, Z. Dong, and D. W. Li. 2008. 'Protein phosphatase-2A is a target of epigallocatechin-3-gallate and modulates p53-Bak apoptotic pathway', *Cancer Res*, 68: 4150-62.
- Radons, J. 2016. 'The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?', *Cell Stress Chaperones*, 21: 379-404.

- Rai, K. H., and J. Ahmed. 2019. 'A Correlative Study of N-Cadherin Expression with Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma Projecting as a Marker of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Progression', *Asian Pac J Cancer Prev*, 20: 2327-32.
- Rajeshkumar, N. V., E. De Oliveira, N. Ottenhof, J. Watters, D. Brooks, T. Demuth, S. D. Shumway, S. Mizuarai, H. Hirai, A. Maitra, and M. Hidalgo. 2011. 'MK-1775, a potent Wee1 inhibitor, synergizes with gemcitabine to achieve tumor regressions, selectively in p53-deficient pancreatic cancer xenografts', *Clin Cancer Res*, 17: 2799-806.
- Ramos, F., M. T. Villoria, E. Alonso-Rodriguez, and A. Clemente-Blanco. 2019. 'Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response', *Cell Stress*, 3: 70-85.
- Revathidevi, S., and A. K. Munirajan. 2019. 'Akt in cancer: Mediator and more', *Semin Cancer Biol*, 59: 80-91.
- Reynhout, S., and V. Janssens. 2019. 'Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866: 31-50.
- Richter, A., M. Niedergethmann, J. W. Sturm, D. Lorenz, S. Post, and M. Trede. 2003. 'Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience', *World J Surg*, 27: 324-9.
- Rieger, A. M., K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, and D. R. Barreda. 2011. 'Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death', *J Vis Exp*.
- Robert Koch Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten. 2019a. 'Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom)'.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html.
- . 2019b. 'Krebs gesamt'.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner. 1998. 'DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139', *J Biol Chem*, 273: 5858-68.
- Rouse, J., and S. P. Jackson. 2002. 'Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage', *Science*, 297: 547-51.
- Rundle, S., A. Bradbury, Y. Drew, and N. J. Curtin. 2017. 'Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy', *Cancers (Basel)*, 9.
- Ruvolo, P. P. 2016. 'The broken "Off" switch in cancer signaling: PP2A as a regulator of tumorigenesis, drug resistance, and immune surveillance', *BBA Clin*, 6: 87-99.
- Sangodkar, J., C. C. Farrington, K. McClinch, M. D. Galsky, D. B. Kastrinsky, and G. Narla. 2016. 'All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase', *FEBS J*, 283: 1004-24.
- Schafer, C., A. Goder, M. Beyer, N. Kiweler, N. Mahendrarajah, A. Rauch, T. Nikolova, N. Stojanovic, M. Wiczorek, T. R. Reich, M. T. Tomicic, M. Linnebacher, J. Sonnemann, S. Dietrich, A. Sellmer, S. Mahboobi, T. Heinzl, G. Schneider, and O. H. Kramer. 2017. 'Class I histone deacetylases regulate p53/NF-kappaB crosstalk in cancer cells', *Cell Signal*, 29: 218-25.
- Schneider, G., A. Henrich, G. Greiner, V. Wolf, A. Lovas, M. Wiczorek, T. Wagner, S. Reichardt, A. von Werder, R. M. Schmid, F. Weih, T. Heinzl, D. Saur, and O. H. Kramer. 2010. 'Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53', *Oncogene*, 29: 2795-806.

- Scully, R., and A. Xie. 2013. 'Double strand break repair functions of histone H2AX', *Mutat Res*, 750: 5-14.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin, and W. M. Bonner. 2002. 'Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody', *Radiat Res*, 158: 486-92.
- Shechter, D., V. Costanzo, and J. Gautier. 2004. 'Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates', *DNA Repair (Amst)*, 3: 901-8.
- Smith, B. J. 1994. 'SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins', *Methods Mol Biol*, 32: 23-34.
- Smith, H. L., H. Southgate, D. A. Tweddle, and N. J. Curtin. 2020. 'DNA damage checkpoint kinases in cancer', *Expert Rev Mol Med*, 22: e2.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu, and D. A. Gillespie. 2010. 'The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer', *Adv Cancer Res*, 108: 73-112.
- Song, M., A. M. Bode, Z. Dong, and M. H. Lee. 2019. 'AKT as a Therapeutic Target for Cancer', *Cancer Res*, 79: 1019-31.
- Sontag, J. M., and E. Sontag. 2014. 'Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease', *Front Mol Neurosci*, 7: 16.
- Sorensen, C. S., L. T. Hansen, J. Dziegielewski, R. G. Syljuasen, C. Lundin, J. Bartek, and T. Helleday. 2005. 'The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair', *Nat Cell Biol*, 7: 195-201.
- Suzuki, K., S. Kodama, and M. Watanabe. 1999. 'Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation', *J Biol Chem*, 274: 25571-5.
- Talar-Wojnarawska, R., and E. Malecka-Panas. 2006. 'Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: Potential clinical implications', *Medical Science Monitor*.
- Thacker, J. 2005. 'The RAD51 gene family, genetic instability and cancer', *Cancer Lett*, 219: 125-35.
- Tibbetts, R. S., D. Cortez, K. M. Brumbaugh, R. Scully, D. Livingston, S. J. Elledge, and R. T. Abraham. 2000. 'Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress', *Genes Dev*, 14: 2989-3002.
- Timson, J. 1975. 'Hydroxyurea', *Mutat Res*, 32: 115-32.
- Tomaszewska, R., K. Okon, K. Nowak, and J. Stachura. 1998. 'HER-2/Neu expression as a progression marker in pancreatic intraepithelial neoplasia', *Pol J Pathol*, 49: 83-92.
- Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2020. 'Prinzip der Durchflußzytometrie'. <https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html>.
- Urbanek, R. A., S. J. Suchard, G. B. Steelman, K. S. Knappenberger, L. A. Sygowski, C. A. Veale, and M. J. Chapdelaine. 2001. 'Potent reversible inhibitors of the protein tyrosine phosphatase CD45', *J Med Chem*, 44: 1777-93.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 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.
- Vesela, E., K. Chroma, Z. Turi, and M. Mistrik. 2017. 'Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies', *Biomolecules*, 7.
- Wang, R., and G. Wang. 2019. 'Protein Modification and Autophagy Activation', *Adv Exp Med Biol*, 1206: 237-59.
- White, D., I. U. Rafalska-Metcalf, A. V. Ivanov, A. Corsinotti, H. Peng, S. C. Lee, D. Trono, S. M. Janicki, and F. J. Rauscher, 3rd. 2012. 'The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in

- heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation', *Mol Cancer Res*, 10: 401-14.
- Wilentz, R. E., J. Geradts, R. Maynard, G. J. Offerhaus, M. Kang, M. Goggins, C. J. Yeo, S. E. Kern, and R. H. Hruban. 1998. 'Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression', *Cancer Res*, 58: 4740-4.
- Wlodarchak, N., and Y. Xing. 2016. 'PP2A as a master regulator of the cell cycle', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51: 162-84.
- World Health Organisation. 2020. "WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all." In. Genf.
- World Health Organisation: International Agency for Research on Cancer. 2020. 'Pancreas', The Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/13-Pancreas-fact-sheet.pdf>.
- Yan, Y., P. T. Cao, P. M. Greer, E. S. Nagengast, R. H. Kolb, M. C. Mumby, and K. H. Cowan. 2010. 'Protein phosphatase 2A has an essential role in the activation of gamma-irradiation-induced G2/M checkpoint response', *Oncogene*, 29: 4317-29.
- Yang, W. S., and B. R. Stockwell. 2016. 'Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation', *Trends Cell Biol*, 26: 165-76.
- Yeh, A. C., and S. Ramaswamy. 2015. 'Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer?', *Cancer Res*, 75: 5014-22.
- Yue, J., R. Vendramin, F. Liu, O. Lopez, M. G. Valencia, H. Gomes Dos Santos, G. Gaidosh, F. Beckedorff, E. Blumenthal, L. Speroni, S. D. Nimer, J. C. Marine, and R. Shiekhattar. 2020. 'Targeted chemotherapy overcomes drug resistance in melanoma', *Genes Dev*, 34: 637-49.
- Zhao, H., and H. Piwnicka-Worms. 2001. 'ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1', *Mol Cell Biol*, 21: 4129-39.
- Zou, L., and S. J. Elledge. 2003. 'Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes', *Science*, 300: 1542-8.

Anhang

Abb. A

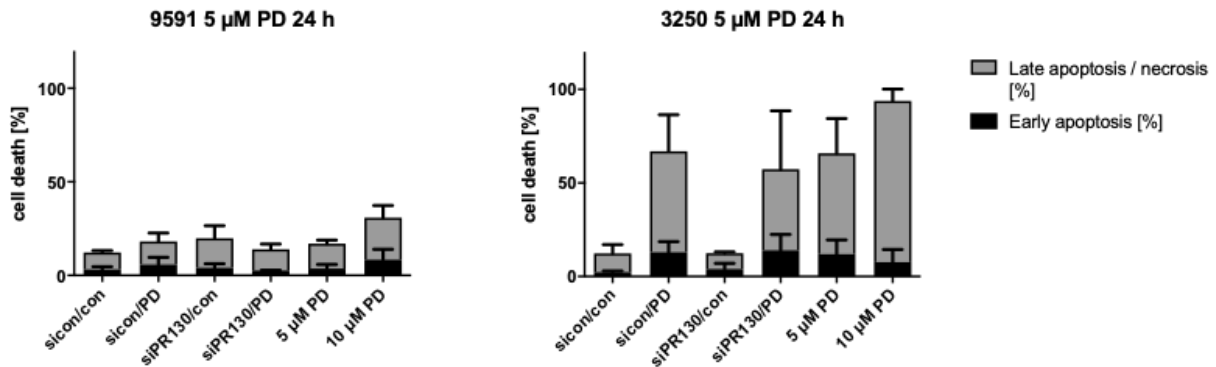


Abbildung A: PD-induzierte Zelltoxizität der Zelllinien 9591 und 3250 nach Transfektion (sicon, siPR130) und Behandlung mit 5 μ M PD für 24 h

Die Graphen zeigen die Messergebnisse der Transfektion und anschließender PD-Behandlung. Gezeigt sind die Kontrollen (con, sicon/con, siPR130/con) und die Behandlungen mit 5 μ M PD (PD, sicon/PD, siPR130/PD). Die Messungen erfolgten am FACS Calibur. (n=2-4)

Abb. B

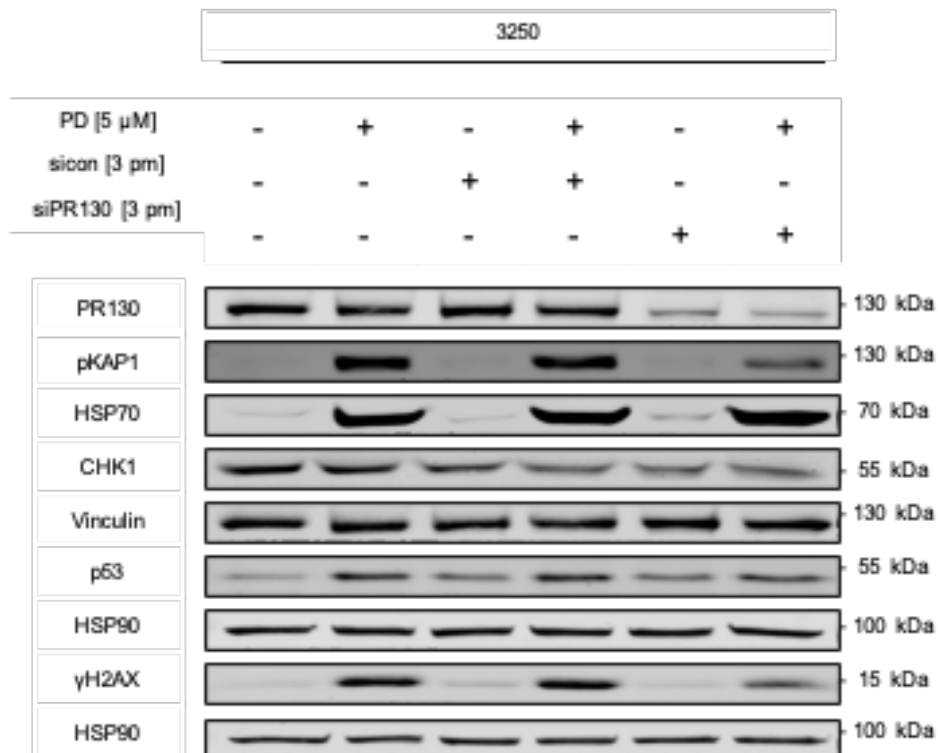


Abbildung B: Western Blot-Analyse der Zelllinie 3250 nach Transfektion (sicon, siPR130) und 6 h Behandlung mit PD

Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle diente HSP90. (n=2)

Abb. C

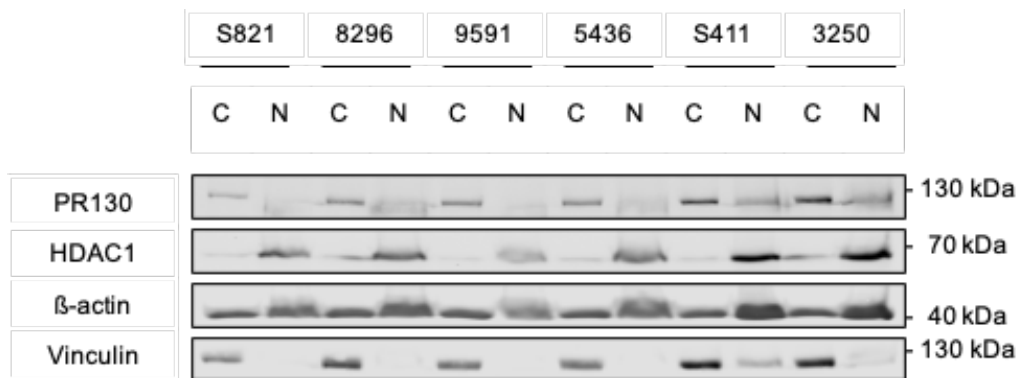


Abbildung C: Western Blot-Analyse der Zelllinien S821, 8296, 9591, 5436, S411 und 3250 nach Fraktionierung von Zellkern und Cytosol

Pro Zelllinie wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte nach vorangegangener Fraktionierung getrennt aufgetragen (C = Cytosolische Fraktion, N = Kernextrakte). Die oben aufgeführten Proteine wurden per Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System detektiert. Als Ladekontrolle diente β -actin. (n=1)

Danksagung

Curriculum vitae