

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki, F.A.C.S.

Funktionelle Analyse des Kynureninase-Proteins im humanen Pankreaskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Christoph Alexander Kondziella

aus Hamburg

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
16.01.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: *Prof. Dr. med. M. Bockhorn*

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: *Prof. Dr. med. Tobias Lange*

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: *Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sonja Loges*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1 Ätiologie.....	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Therapie.....	4
1.2 Der Stoffwechsel essentieller Aminosäuren im Krebsgeschehen	5
1.3 Der Tryptophanstoffwechsel im Krebsgeschehen	6
1.4 Struktur und Funktion von Kynureninase	11
2 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	14
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Geräte, Materialien, Chemikalien.....	16
3.1.1 Geräte	16
3.1.2 Materialien.....	17
3.1.3 Chemikalien.....	18
3.1.4 Lösungen, Medien	20
3.1.5 Antikörper	21
3.1.6 shRNA, Plasmide	22
3.1.7 Zytokine.....	22
3.1.8 Herstellerkits	22
3.1.9 Primer	23
3.1.10 Bakterienstämme	23
3.2 Zelllinien.....	23
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	25
3.3.1 Transformation von Bakterienzellen	25
3.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab	25
3.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	26
3.3.4 RNA Interferenz	26
3.3.5 RNA-Isolation aus Zellenpellets	27
3.3.6 cDNA Synthese	28
3.3.7 Real-Time PCR	28
3.3.7.1 Relative Quantifizierung	29
3.4 Zellkultur	30
3.4.1 Zellkultivierung	30
3.4.2 Passagieren der Zellen.....	30
3.4.3 Kryokonservierung.....	30

3.4.4	Zellzahlbestimmung	31
3.4.5	Behandlung mit Gemcitabin.....	31
3.4.6	Stimulation mit Interferon- γ	31
3.4.7	Zellkultivierung unter Hypoxie	32
3.4.8	Virusproduktion.....	32
3.4.9	Virustransduktion	33
3.4.10	MTT-Assay	34
3.4.11	Transwell-Assay	35
3.4.11.1	DAPI-Färbung	36
3.4.11.2	Calcein-Färbung	36
3.5	Proteinbiochemische Methoden	37
3.5.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	37
3.5.2	Gewinnung von Zellkulturüberständen	37
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.5.4	Immunpräzipitation	38
3.5.5	SDS-Gelelektrophorese	38
3.5.6	Western-Blot	39
3.5.6.1	Proteintransfer	39
3.5.6.2	Proteinfärbung	40
3.5.6.3	Blocken.....	40
3.5.6.4	Immundetektion.....	40
3.5.6.5	Detektion	40
3.5.7	Ionenfallen-Massenspektrometrie	41
3.5.8	Zellfraktionierung.....	41
3.5.9	Protein Deglykosylierung.....	42
3.6	Histologische Methoden	43
3.6.1	Immunhistochemie	43
3.6.1.1	Histologisches Material.....	43
3.6.1.2	Anfertigen von Gewebeschnitten am Kryotom	43
3.6.1.3	Etablierung von Färbeprotokollen für Kynureninase	43
3.6.1.4	Färbeprotokoll Kynureninase	44
3.6.1.5	Histologische Auswertung.....	44
3.6.2	Immunzytochemie	45
3.6.3	Konfokale Laser Mikroskopie	45
3.7	Auswertung	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Differentielle Kynureninase-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien.....	47
4.2	Kynureninase-Expression in humanem Pankreaskarzinomgewebe.....	49
4.3	Intrazelluläre Lokalisation der Kynureninase.....	51
4.4	Sekretion der Kynureninase in den extrazellulären Raum	54

4.5	Die Hemmung der Kynureninase-Expression beeinträchtigt die Zellproliferation von Pankreaskarzinomzellen.....	55
4.6	Die Hemmung der Kynureninase-Expression beeinflusst die Zellmigration nicht	58
4.7	Die chemotherapeutische Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin steigert die Kynureninase-Expression	59
4.8	Interferon- γ steigert die Kynureninase-Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	61
4.9	Hypoxie induzierter Stress steigert intra- und extrazelluläre Mengen der Kynureninase	64
4.10	Identifikation neuer Kynureninase-interagierender Proteine im Pankreaskarzinom..	66
5	Diskussion	70
	Abbildungsverzeichnis	82
	Tabellenverzeichnis	83
6	Zusammenfassung.....	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Danksagung	V
9	Eidesstattliche Versicherung.....	VI

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat	His	Histidin
AKT	Proteinkinase B	HPDE	Humanes duktales pankreatisches Epithel
APS	Ammoniumpersulfat, Ammoniumperoxo-disulfat, Ammoniumperoxo-disulfat	HPV	Humanes Papillomavirus
Arg	Arginin	HRP	Horseradish peroxidase
Asn	Asparagin	IDH	Isozitat-Dehydrogenase
BCA	Bicinchoninsäure	IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
BCAT1	Branched chain amino-acid transaminase 1	IFN- γ	Interferon- γ
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A-interacting protein	igG	Immunglobulin G
Bin1	Bridging integrator 1	IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
BRCA2	Breast cancer 2	IRE1	Inositol-requiring-enzyme-1
CBNE	Chromatin bindender nukleärer Extrakt	KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
CBR1	Carbonyl reductase	KYNU	Kynureninase
CD200	Cluster of differentiation 200	Leu	Leucin
c-DNA	Complementary desoxyribonucleic acid	MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
CE	Zytoplasmatischer Extrakt	ME	Membranöser Extrakt
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain	Met	Methionin
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats 73	MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
CSE	Zytoskelett assoziierter Extrakt	mTOR	Mechanistic target of rapamycin
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	NAD	Nikotinadenindinukleotid
dCK	Deoxycytidinkinase	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	NE	Nukleärer Extrakt
DMSO	Dimethylsulfoxid	PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
DTT	Dithiothreitol	PBS	Phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	PES	Phenazine ethosulfate
FAMMM	Familiäres atypische Muttermale und Melanom Syndrom	Phe	Phenylalanin
FCS	Fötales Kälberserum	PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
GAG	Gruppenspezifisches Antigen	POL	Polymerase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Gcn2	General control nonderepressible 2	RIPA	Radio immunoprecipitation assay buffer
GDA	Guanine deaminase	ROCK II	Rho-associated protein kinase II
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR family related gene	SDS	Sodium dodecyl sulfate
Gln	Glutamin	Ser	Serin
GSTP1	Glutathione S-Transferase	shRNA	Small harpin ribunucleic acid
GTP	Guanosintriphosphat	SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
HBS	HEPES buffered saline	SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
HENT1	Humaner equilibrativer Nucleosid-Transporter 1	SOB	Mediums Super optimal broth medium
HEPES	2--Ethansulfonsäure	STAT	Signal transducers and activators of transcription
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2	TALEN	Activator-like effector nuclease
HIF	Hypoxie-induzierter-Faktor	TEMED	Tetramethylethylendiamin
		TGF- β	Transforming growth factor β
		Tyr	Tyrosin
		UPR	Ungefaltetes Protein

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Ätiologie

Das Pankreaskarzinom ist ein hochmaligner, epithelialer Tumor der Bauchspeicheldrüse. Mit einem Anteil von 92% aller exokrinen Pankreastumoren, stellt das duktales Adenokarzinom die größte Gruppe der malignen intrapankreatischen Neoplasien dar. Weitere maligne, exokrine Tumoren der Bauchspeicheldrüse sind das intraduktales papillär-muzinöses Karzinom (2%), das muzinöse Zystadenokarzinom (1%) und das Azinuszellkarzinom.

Benigne Tumoren sind das seröse Zystadenom (1%) und das muzinöse Zystadenom.

Die endokrinen Pankreastumoren, wie das Insulinom, das Gastrinom, das Somatostatinom, das Glukagonom und das VIPom nehmen einen sehr geringen Anteil von weniger als 5% an allen Pankreastumoren ein. Den Rest machen Tumore des Bindegewebes und sehr seltene Tumore wie das Pankreatoblastom und der solid-pseudo-papilläre Tumor, sowie unklassifizierbare Neoplasien aus (Böcker, Denk, & Heitz, 2004).

Das Adenokarzinom ist in etwa 70% der Fälle im Pankreaskopf, in 30% in Körper oder Schwanz der Bauchspeicheldrüse lokalisiert (Cubilla & Fitzgerald, 1985). In 75% der Fälle liegt bei Diagnosestellung ein inoperables, also einer kurativen Therapie nicht mehr zuführbares Stadium vor (Philip, 2008). In dieser Mehrzahl der Fälle bestehen Kontraindikationen gegen die Resektion, wie Fernmetastasen, eine Peritonealkarzinose, eine Infiltration der A. hepatica, der A. mesenterica superior oder des Truncus coeliacus, mit Ummauerungen der betreffenden arteriellen Gefäße von mehr als 180°.

Ein Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist die familiäre Prädisposition. Das familiäre Pankreaskarzinom geht mit einem 9-fach erhöhtem Erkrankungsrisiko einher (Klein, et al., 2004). Auch weitere hereditäre Tumorprädispositionssyndrome erhöhen das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Hierzu zählen das Peutz-Jeghers-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis, das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom (FAMMM), das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom, die familiäre Polyposis Coli und das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom (Klein, Hruban, Brune, Petersen, & Goggings, 2001).

Auch an Diabetes Mellitus Typ I und II erkrankte Patienten zeigen eine erhöhte Koinzidenz für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Cui & Andersen, 2012).

Als gesicherte umweltbedingte Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gelten Tabakrauchen (Iodice, Gandini, Maisonneuve, & Lowenfels, 2008), ein erhöhter Body-Mass-Index (Aune, et al., 2012) starker Alkoholkonsum (Lucenteforte, et al., 2011) und eine fett- und fleischreiche Ernährung (Lyon, Slattery, Mahoney, & Robison, 1993). Als Grund hierfür wird die Ausschüttung der Hormone Cholecystokinin und Sekretin nach Zunahme fettreicher Nahrung angenommen, welche eine hypertrophe Wirkung auf das Gangepithel des Pankreas ausüben (Beard Shall, et al., 1989).

1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich etwa 16000 Menschen an einem duktalem Pankreaskarzinom. Aufgrund der infausten Prognose ist die Mortalitätsrate des Pankreaskarzinoms beinahe ebenso hoch wie dessen Inzidenz. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8% weist es den am häufigsten letal endenden Verlauf aller Krebsarten in Deutschland auf. Somit belegt das Pankreaskarzinom den 4. Platz in der Statistik der häufigsten Krebstodesursachen hierzulande, ursächlich für 6,7 und 7,9% aller Krebstodesfälle von Männern bzw. Frauen. Dabei lag das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 71, für Frauen bei 75 Jahren. Beide Geschlechter erkrankten gleich häufig. Das mittlere Lebenszeitrisko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken beträgt 1,6%. (Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe, 2013) (Seufferlein, et al., 2014).

Weltweit beläuft sich die Zahl jährlicher Neuerkrankungen auf 277000 Fälle, und erreicht damit einen Anteil von 2,5% aller Krebsneuerkrankungen (Ferlay, Shin, Forman, Mathers, & Parkin, 2010). Dennoch nimmt das Pankreaskarzinom den 8. bis 9. Platz aller krebsbedingten Todesfälle ein. Die Inzidenzrate eines Landes erhöht sich mit dessen Entwicklungsgrad sowie dessen Entfernung vom Äquator (Maisonneuve & Lowenfels, 2010). Trotz des medizinischen Fortschritts und dem Erkenntnisgewinn von molekularen Mechanismen der Karzinogenese hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate für am Pankreaskarzinom erkrankte US-Amerikaner im Zeitraum von 1975 bis 2005 gerade einmal um 2,4% erhöht (Horner, et al., 2010).

1.1.3 Pathogenese

Wie für viele andere Tumorentitäten auch, sind für das Pankreaskarzinom Vorläuferläsionen beschrieben. Hierzu gehören die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die muzinöse zystische Neoplasie (MCN) und die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie

(IPMN). Die IPMN und MCN sind makroskopische Läsionen eines jeweils eigenen histologischen Subtyps, welche auch klinisch apparent werden können. Primär von benigner Dignität gekennzeichnet, können diese Neoplasien in ein Pankreaskarzinom übergehen. PanINs sind mikroskopische Läsionen und gelten als direkte Vorläuferneoplasien des *Carcinoma in Situ* (Hruban, et al., 2001). Hierbei werden hyperplastische Veränderungen von muzinösem (PanIN1A) oder papillarem (PanIN1B) Charakter unterschieden. Dysplastische Veränderungen werden in *low grade* Dysplasien (PanIN2) und *high grade* Dysplasien (PanIN3) eingeteilt (Hruban, et al., 2001). Dem Tumorprogressionsmodell nach kommt es durch die Anhäufung von Mutationen zur fortschreitenden Zelltransformation. Entscheidend hierfür ist die Aktivierung von Onkogenen wie KRAS und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53, p16 SMAD4 (Güngör, Hofmann, Wolters-Eisfeld, & Bockhorn, 2013).

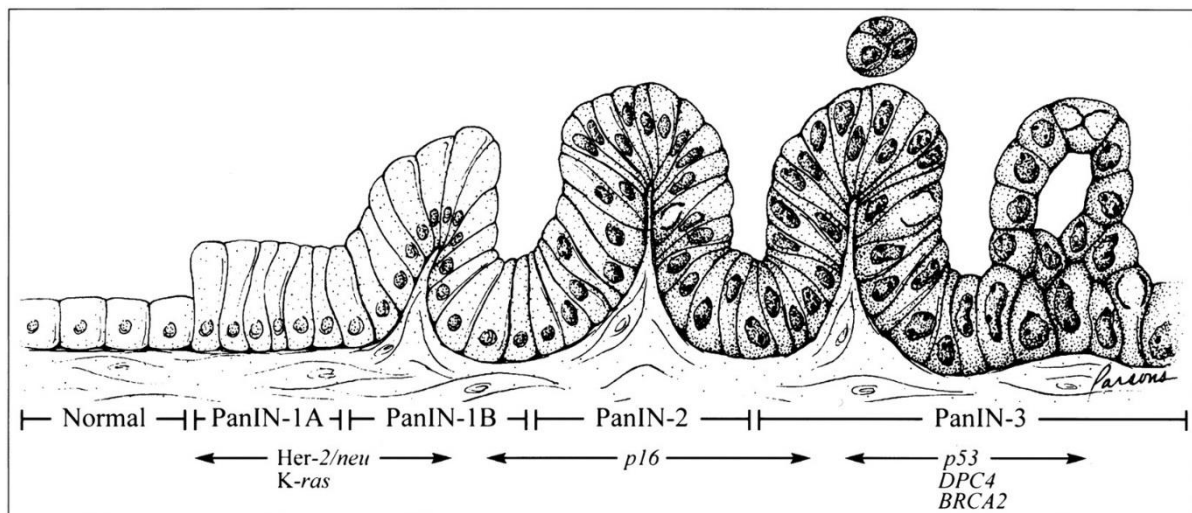


Abb. 1.1.1 **Tumorprogressionsmodell des Pankreas** (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000).

Duktile Adenokarzinome tragen in über 90% der Fälle eine Mutation im KRAS-Gen (Almoguera, et al., 1988). Es ist anzunehmen, dass diese Mutation zu einem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese auftritt (Moskaluk, Hruban, & Kern, 1997). Sie betrifft vornehmlich das Codon 12 des KRAS-Gens, in seltenen Fällen auch das Codon 13, und führt zum Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin oder Aspartat (Pellegata, Sessa, & Renault, 1994). KRAS ist ein G-Protein, welches im aktivierten Zustand GTP bindet. Durch dessen intrinsische GTP-Hydrolyse sowie dessen Interaktion mit GTPase-aktivierenden Proteinen und Nukleotid-Austausch-Faktoren ist der aktivierte Zustand von begrenzter Dauer. Mutationen im zuvor beschriebenen Bereich resultieren in einer verminderten Hydrolyse von gebundenem GTP und damit dem Sistieren des Proteins in einem dauerhaft aktivierten Zustand. In dieser Konfiguration aktiviert KRAS in der Tumorzelle proliferationsfördernde Signalwege.

Auch eine Überexpression des Onkogens Her-2/neu gilt als frühes Ereignis in der Tumorentstehung (Day, et al., 1996). Später folgt die Inaktivierung des Zellzyklusregulators p16 (Wilentz, et al., 1998). Weiterhin kommt der Stilllegung der Tumorsuppressorgene p53, SMAD4 und BRCA2 bei der Entstehung eines Pankreaskarzinoms eine entscheidende Bedeutung zu (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000).

1.1.4 Diagnostik

Fehlende Frühsymptome und ein unspezifisches Beschwerdebild erschweren die rechtzeitige Diagnose des Pankreaskarzinoms. Symptome des fortgeschrittenen Tumorleidens sind abdominelle Schmerzen, Rückenschmerzen, Gewichtsverlust und möglicherweise ein Ikterus. Manchmal wird ein Pankreaskarzinom durch einen neu aufgetretenen Diabetes Mellitus oder eine Pankreatitis apparent. Für die Erstuntersuchung des Pankreas eignet sich die Oberbauchsonographie. Eingehendere Untersuchungsmethoden sind der endoskopische Ultraschall, die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie einschließlich der Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie. Der Tumormarker CA-19.9 kann während Therapie und Nachsorge zur Verlaufskontrolle genutzt werden. Stichbiopsien werden aus dem Pankreas nur bei unklarem radiologischen Befund entnommen, vorzugsweise endoskopisch (Seufferlein, Bachet, Van Cutsem, & Rougier, 2012).

1.1.5 Therapie

Die einzige kurative Therapieoption ist die operative Resektion des Pankreaskarzinoms. Die Pylorus erhaltende oder die magenresezierende partielle Duodenopankreatektomie sind die üblicherweise durchgeführten Operationsverfahren bei einem Pankreaskopfkarzinom. Andere Lokalisationen des Pankreaskarzinoms machen eine Pankreaslinksresektion oder die totale Duodenopankreatektomie erforderlich.

Nach der R0/R1-Resektion eines Pankreaskarzinoms besteht die Indikation zur 6-monatigen adjuvanten Chemotherapie. Bevorzugt eingesetzt wird hierfür das Chemotherapeutikum Gemcitabin. Gemcitabin ist ein Nukleosidanalogen von Cytidin. Des Weiteren ist der Einsatz von 5-Fluorouracil zur adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms möglich.

Die palliative Chemotherapie wird regelhaft mit Gemcitabin begonnen und bis zum Progress fortgeführt. Für Patienten mit sehr gutem *Performance Status* kommen eine Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Erlotinib oder Gemcitabin und Capecitabin in Frage (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013) oder optional aggressivere Chemotherapie-Regime wie das FOLFIRINOX-Protokoll. Aus therapeutischer Sicht ist die

rasche Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen gängige Chemotherapeutika problematisch.

1.2 Der Stoffwechsel essentieller Aminosäuren im Krebsgeschehen

Trotz des zunehmenden Verständnisses von molekularen Mechanismen der Karzinogenese, aufbauend auf klassischen Tumorprogressionsmodellen, hat sich die Prognose für am Pankreaskarzinom erkrankte Patienten in den letzten Jahrzehnten nicht entscheidend verbessert. Um die Gänge des Tumorgeschehens zu erforschen, rücken auch bislang weniger beleuchtete Bereiche der Krebsforschung in den Fokus der Biowissenschaften. Ein stark wachsendes Feld der Krebsforschung ist die Forschung am Stoffwechsel von Tumorzellen. So beschrieb der Biochemiker und Arzt Otto Warburg bereits 1924 einen veränderten Energiestoffwechsel an Tumorzellen. Laut seiner Hypothese gewannen Tumorzellen ihre Energie vornehmlich aus der anaeroben Glykolyse unter Entstehung von Laktat, und waren dadurch nicht unbedingt auf ein sauerstoffreiches Wachstumsmilieu angewiesen. Auch aktuellere Arbeiten stützen die Warburg-Hypothese. So konnte eine Induktion der oxidativen Phosphorylierung in Krebszelllinien deren Wachstum verlangsamen (Schulz, et al., 2006). Nicht nur Veränderungen im Glukosestoffwechsel, sondern auch im Abbau von Aminosäuren, insbesondere den essentiellen Aminosäuren, sind für das Wachstum von Tumorzellen unabdingbar. Eine Restriktion der Aminosäuren Cystein, Valin, Tryptophan, Threonin, oder Phenylalanin und Tyrosin führte im Mausmodell zu einer verminderten Immunantwort (Jose & Good, 1973). Aktuellere Arbeiten enthüllen genauere Mechanismen im Abbau einzelner Aminosäuren, welche für den Stoffwechsel von Tumorzellen spezifisch sind. In Glioblastomen konnte beispielsweise eine Intaktheit bzw. Überexpression der Proteine Isozitat-Dehydrogenase (IDH) und Verzweigkettige-Aminosäuren-Transaminase-1 (BCAT1) und damit ein veränderter Katabolismus der Aminosäure Glutamin aufgezeigt werden (Tönjes, et al., 2013). Darüber hinaus verfügen Tumorzellen über Alterationen im Stoffwechsel der Aminosäure Methionin. Während die meisten benignen Zelllinien die Fähigkeit besitzen in Methionin freiem Medium zu proliferieren, sind maligne Zelllinien der Entitäten Blasenkarzinom, Bronchialkarzinom Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Nierenzellkarzinom, Melanom und Glioblastom von einer stetigen Methionin Zufuhr abhängig (Cellarier, et al., 2003). Grund hierfür ist unter anderem eine erhöhte Methionin-Synthase Aktivität in Methionin unabhängigen Zelllinien (Judde, Ellis, & Frost, 1989). Aufgrund vermehrter Proteinbiosynthese und einer erhöhten

Transmethylierungsrate, einschließlich der DNA-Methylierung, zeichnen sich Tumorzellen des Weiteren über einen gesteigerten Bedarf an Methionin aus (Stern & Hoffman, 1984). Auch *in vivo* konnte die tumorsuppressive Wirkung einer Methionin armen Diät dargelegt werden (Breillout, Halida, Echinard-Garin, Lasceaux, & Poupon, 1987). Auch die intra- und extrazelluläre Methionin Depletion durch zugeführte und retroviral transduzierte Methioninase konnte das Tumorwachstum von Ovarialkarzinomzellen und Fibrosarkomzellen *in vitro* hemmen (Miki, et al., 2000). Für das *in vivo* und *in vitro* Wachstum von Mammakarzinomzelllinien nimmt darüber hinaus der Stoffwechsel der Aminosäure Serin einen integralen Bestandteil ein. So ist das für die Synthese von Serin taktgebende Enzym Phosphoglycerat-Dehydrogenase in vielen Zelllinien und Gewebeproben von Mammakarzinomen überexprimiert oder amplifiziert. Die Stilllegung dieses Enzyms bedingt ein verlangsamtes Wachstum von überexprimierenden Zelllinien (Possemato, et al., 2011). Im Pankreaskarzinom ist der Zusammenhang zwischen Supplementierung der essentiellen Aminosäure Leucin und beschleunigter Progression der Tumorerkrankung im Mausmodell beschrieben. Hierbei wurde die intrazelluläre Zunahme von phosphoryliertem mTOR, ribosomalem Protein S6 und Zyklin D1 im Zusammenhang mit einer Leucin reichen Diät beobachtet (Liu, Lashinger, Rasmussen, & Hursting, 2014). Die aus krebstherapeutischer Sicht mit am vielversprechendsten Erkenntnisgewinne im Gebiet der Stoffwechselenzyme werden im Stoffwechselweg der Aminosäure Tryptophan erbracht.

1.3 Der Tryptophanstoffwechsel im Krebsgeschehen

Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, welche als Vorläufermolekül für die Synthese von Serotonin und Melatonin und als Provitamin für Vitamin B3 notwendig ist. Die Abbauprodukte von Tryptophan werden außerdem teilweise zur Synthese von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) verwendet. Tryptophan wird intrazellulär im Kynurenin-Abbauweg zu den Produkten Anthranilsäure, Kynureninsäure, Xanthurensäure, Picolinsäure, Quinolinsäure und Acetessigsäure verstoffwechselt. Ein Überblick über den Tryptophanstoffwechsel mit Fokus auf dem Kynurenin-Abbauweg menschlicher Zellen ist in Abb. 1.3.1 dargestellt.

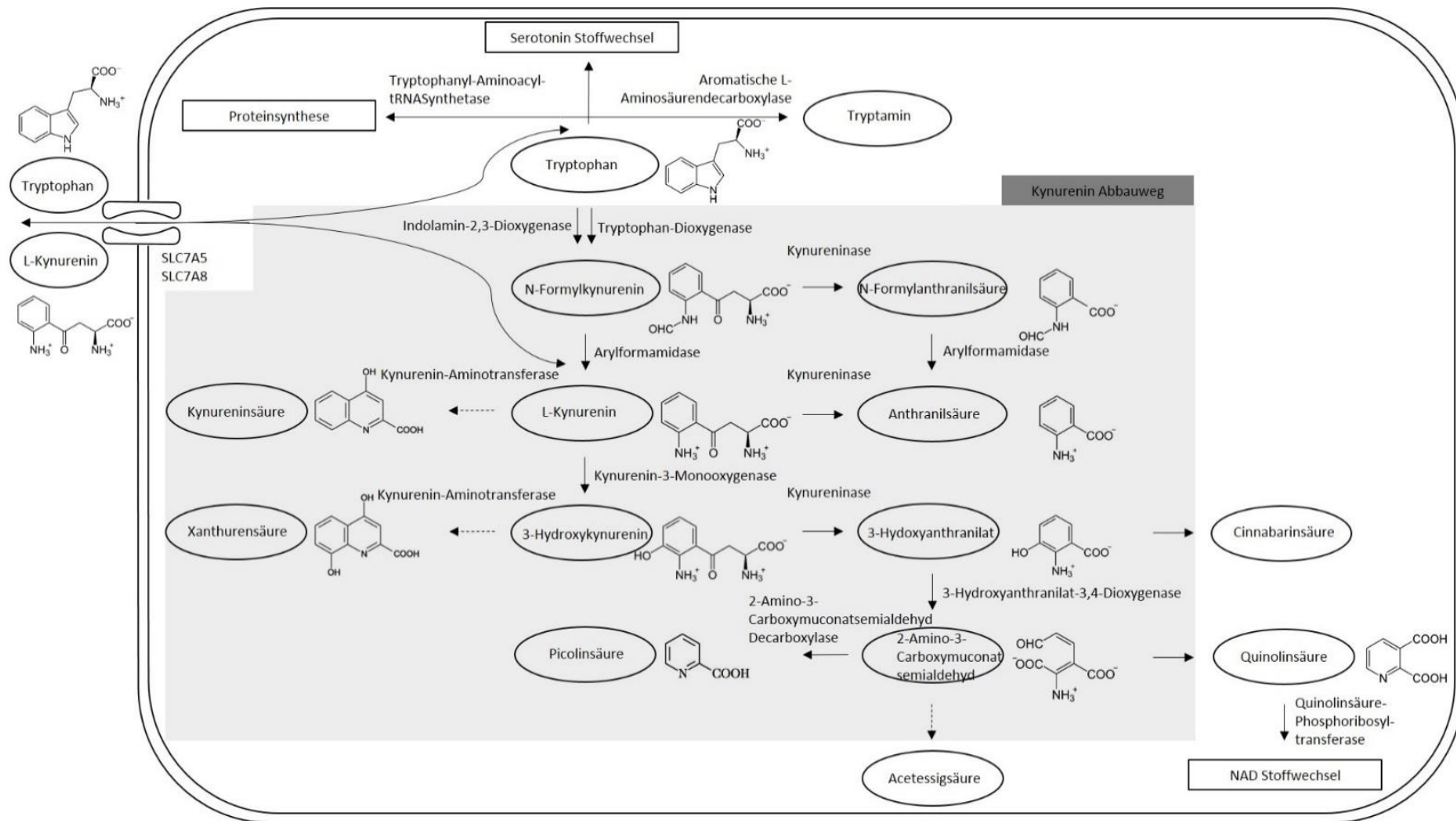


Abb. 1.3.1 **Tryptophanstoffwechsel.**

Schematische Darstellung des intrazellulären Tryptophanstoffwechsels mit Schwerpunkt auf dem Kynurenin-Abbauweg.

Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Tryptophan stellt die Umwandlung der Aminosäure zu N-Formylkynurenin durch die Enzyme Indolamin-2,3-Dioxygenase oder Tryptophan-Dioxygenase dar. Nach der Abspaltung von Ameisensäure durch die Arylformamidase und anschließende Hydroxylierung durch die Kynurenin-3-Monooxygenase entsteht 3-Hydroxykynurenin. Es folgt die enzymatische Abspaltung von Alanin durch das Enzym Kynureninase. Das resultierende 3-Hydroxyanthranilat wird durch eine weitere Dioxygenase am Aromatenring enzymatisch gespalten und in mehreren Reaktionsschritten zu Acetessigsäure abgebaut. Darüber hinaus fallen innerhalb dieses Kynurenin-Abbauweges durch den enzymatischen Umsatz von Zwischenprodukten die Säuren Anthranilsäure, Kynureninsäure, Xanthurensäure, Picolinsäure und Quinolinsäure intrazellulär an (Stavrum, Heiland, Schuster, Puntervoll, & Ziegler, 2013).

Das geschwindigkeitslimitierende Enzym des Tryptophanabbauweges, Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), steht nachgewiesenermaßen im Zusammenhang mit pathologischer Entzündung, Immuntoleranz und Tumorgeschehen. IDO wird physiologischerweise stark von Hepatozyten exprimiert und dient hier der Regulation systemisch vorhandenen Tryptophans. Das Interferon- γ abhängige Enzym kann, sofern exprimiert, in seiner Mikroumgebung die Aktivität von T- und NK-Zellen supprimieren und die Aktivität von regulatorischen T-Zellen (T-Reg-Zellen) fördern (Pendergast, et al., 2014). Indolamin-2,3-Dioxygenase ist in vielen Tumoren konstitutiv exprimiert. Dessen Expressionsstatus korreliert mit der Krankheitsprogression. Die Hemmung der Indolamin-2,3-Dioxygenase durch den Inhibitor 1-Methyl-L-Tryptophan verringert das Wachstum der betreffenden Krebszellen *in vitro* und *in vivo* (Uyttenhove, et al., 2003). IDO befindet sich unter Kontrolle des Tumorsuppressorgens Bin1, welches seine Funktion während der Tumorprogression häufig verliert. Eine Antagonisierung von IDO konnte *in vivo* den Effekt einer chemotherapeutischen Behandlung potenzieren (Müller, DuHadaway, Donover, Sutanto-Ward, & Prendergast, 2005). Außer den Interferonen stimulieren auch B-Zell-Ko-Rezeptoren wie CTLA-4, CD200 und GITR die IDO Expression (Holmgaard, Zamarin, Munn, Walchok, & Allison, 2013). Ebenso ist das Zytokin TGF- β in der Lage die IDO vermittelte Immunsuppression aufrechtzuerhalten (Belladonna, et al., 2008).

Ein Wirkmechanismus von IDO ist die Gcn2 Aktivierung, welche zu einem Proliferationsarrest von T-Zellen führt (Munn, et al., 2005). Ebenso ist IDO in der Lage durch die Hemmung des Signaltransduktors mTOR die vermehrte Autophagie von T-Zellen herbeizuführen (Metz, et al., 2012).

Abgesehen von der Tryptophan Depletion wird ein weiterer karzinogener Effektormechanismus der Indolamin-2,3-Dioxygenase und Tryptophan-Dioxygenase durch deren Produkte, die Kynurenine vermittelt. Kynurenine sind Liganden des Aryl-Hydrocarbonyl-Rezeptors. Dieser besitzt durch die Transkriptionssteigerung antiapoptotisch und proliferativ wirkender Gene tumorfördernde Eigenschaften (Opitz, et al., 2011). Außerdem supprimieren die Tryptophan Metabolite Kynurenin, Kynureninsäure, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthrhanilsäure, das Produkt des Enzyms Kynureninase, die Funktion von T-Zellen (Opitz, Wick, Steinman, & Platten, 2007).

Neben der immunmodulatorischen Wirkung nimmt IDO auch direkten Einfluss auf die Tumorphiliferation. Eine IDO Genstilllegung konnte das Auftreten von Kolonkarzinomen in mit Azoxymethan behandelten, immuninsuffizienten Versuchstieren verringern. Des Weiteren konnte durch die IDO Depletion in Kolonkarzinomzelllinien ein antiproliferativer Effekt *in vitro* erzielt werden. Dieser war durch eine Inhibition der β -Catenin Degradierung vermittelt und mündete in einer verminderten Expression von Zyklin D1 und D3. Die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Quinolinsäure oder Kynureninen hob den beobachteten Effekt wieder auf (Thaker, et al., 2013). Diese Feststellung spricht ebenfalls für die Karzinogenität der Abbauprodukte von Tryptophan selbst.

Bei Untersuchung von Zellen mit stammzellähnlichem Charakter im Vergleich zur Ursprungszelllinie der Entitäten Prostatakrebs, Brustkrebs und Mesotheliom konnte eine Hochregulierung des gesamten Tryptophan Abbauwegs festgestellt werden. Die Überexpression von IDO in den betreffenden Zellen konnte durch die Behandlung mit auf mitochondriale Strukturen zielenden Chemotherapeutika aufgehoben werden (Stapelberg, et al., 2013).

Auch das Isoenzym Tryptophan-Dioxygenase steht im Zusammenhang mit der Ausbildung von Immunresistenzen bei neoplastischen Erkrankungen. So konnte die Transfektion von murinen p815 Tumorzellen mit Tryptophan-Dioxygenase die T-Zell vermittelte Immunabwehr zuvor immunisierter Mäuse verhindern, sodass es zum Wachstum der Tumorzellen und Tod der Versuchstiere kam. Die systemische Inhibition des Enzyms konnte die Abstoßungsreaktion gegenüber den Tumorzellen wiederherstellen (Pilotte, et al., 2012). Neben der IDO, ist ein zweites IDO verwandtes Enzym, IDO2 bekannt, welches Tryptophan mit geringerer enzymatischer Aktivität degradiert (Metz, et al., 2007).

Indolamin-2,3-Dioxygenase, Kynurenin-3-Hydroxylase und in manchen Zellen Kynureninase sind notwendige Enzyme zur Herstellung der neurotoxischen Quinolinsäure (Heyes, Chen, Mayor, & Saito, 1997). Quinolinsäure ist ein Vorläufer zur Synthese von NAD^+ . Quinolinsäure akkumuliert beispielsweise in humanen Gliomen und korreliert dort mit einem malignen Phänotyp. Glioblastomzellen exprimieren das Enzym Quinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase verstärkt, um aus Quinolinsäure vermehrt NAD^+ zu bilden und oxidativem Stress zu entgehen. Bei Blockade der Synthese von NAD^+ ausgehend von Nikotinsäure, konnte die Supplementation mit Quinolinsäure die Überlebensfähigkeit von Gliomzellen, nicht aber von Astrozyten, wiederherstellen. Dabei ist eine höhere Quinolinsäure-Phosphoribosyl-Transferase Expression mit einer schlechteren Krankheitsprognose assoziiert. Durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid, Chemotherapie oder Röntgenbestrahlung erzeugter Oxidativer Stress induzierte die Expression dieses Enzyms (Sahm, et al., 2013).

Neben der Karzinogenese wird ein erhöhter Tryptophan Metabolismus mit neurodegenerativen Erkrankungen, und den im Rahmen einer Pneumokokkenmeningitis auftretenden Pathomechanismen in Verbindung gebracht (Bellac, Coimbra, Christen, & Leib, Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury, 2006). Eine Inhibition der Enzyme Kynurenin-3-Hydroxylase und Kynureninase bewirkte bei mit Pneumokokken infizierten Versuchstieren eine Inhibition der hippocampalen Apoptose sowie eine Reduktion des intrazellulären NAD^+ Gehalts (Bellac C. L., Coimbra, Christen, & Leib, 2010). Durch die Stimulation mit Interferon- γ ließen sich die Expressionen von IDO1, IDO2, Kynureninase und Kynurenine-3-Monooxygenase in humanen Gliomzellen steigern. Im Serum von an Glioblastomen leidenden Patienten konnte durch die Zunahme des Verhältnisses von Kynureninen zu Tryptophan ebenfalls eine Aktivierung des Kynurenin-Abbauwegs aufgezeigt werden (Adams, et al., 2014). Die Wirkung von Interferonen auf die Genexpression wird durch sogenannte Interferon-Regulator-Faktoren vermittelt. Im Pankreaskarzinom ist die Expression des IRF1 herunter-, die des IRF2 hochreguliert. Dies führt zu vermehrter Proliferation, Apoptose- und Chemotherapieresistenz (Sakai, et al., 2014).

1-D-Methyl-Tryptophan, ein Inhibitor von IDO, wird derzeit in klinischen Studien in Verbindung mit konventionellen Chemotherapeutika auf seine Verträglichkeit und therapeutische Wirksamkeit bei soliden Tumorerkrankungen getestet.

1.4 Struktur und Funktion von Kynureninase

Kynureninase ist ein Pyridoxal-5'-phosphat abhängiges Enzym, strukturell der Klasse V-Aminotransferasen zugehörig (Phillips, 2011). Das purifizierte Enzym liegt als Homodimer vor, mit einem Molekulargewicht der Monomere von je 52,4kDa, bestehend aus 465 Aminosäuren (Walsh & Botting, Purification and biochemical characterization of some properties of recombinant human kynureninase, 2002). Das Monomer besteht aus zwei Domänen, zwischen denen sich das aktive Zentrum mit Phosphattasche befindet. Die kleine Domäne besteht aus einer $\alpha\beta$ -Sandwich-, und die große Domäne aus einer sogenannten $\alpha\beta$ -„griechischen Schlüssel“-Architektur. Die kleine Domäne wird aus sieben β -Faltblattstrukturen gebildet (S5-S8, S10, und S11), umgeben von den α -Helices H8-H14. Die große Domäne setzt sich aus den β -Faltblattstrukturen S17, S18, S20 und S21 zusammen, welche von den α -Helices H17-H20 eingebettet werden. Für die Substratspezifität der humanen Kynureninase sind vor allem die Reste His-102 und Asn-333 im aktiven Zentrum verantwortlich. Das aktive Zentrum wird durch die Reste Tyr-226, Phe-225, Leu-310, Phe-314, Met-316, Trp-305, und Phe-165 von Seiten der großen Domäne, und Gln-402, Asp-426, Arg-434, Arg-428, und Asn-429 der kleinen Domäne geformt. Die Unterseite der Substratbindetasche wird durch die Seitenreste von Ser-75 und His-102 ausgebildet (Lima, Kristoforov, Momany, & Phillips, 2007).

Northern-Blot Analysen zeigten ein ubiquitäres Vorkommen von Kynureninase in verschiedenen Organen, mit stärkster Expression in den Organen Leber, Gehirn, Placenta und Lunge (Alberati-Giani, et al., 1996). Intrazellulär ist das Enzym in Hepatozyten zytoplasmatisch und mitochondrial lokalisiert (Inada, Okuno, Kimura, & Kido, 1984).

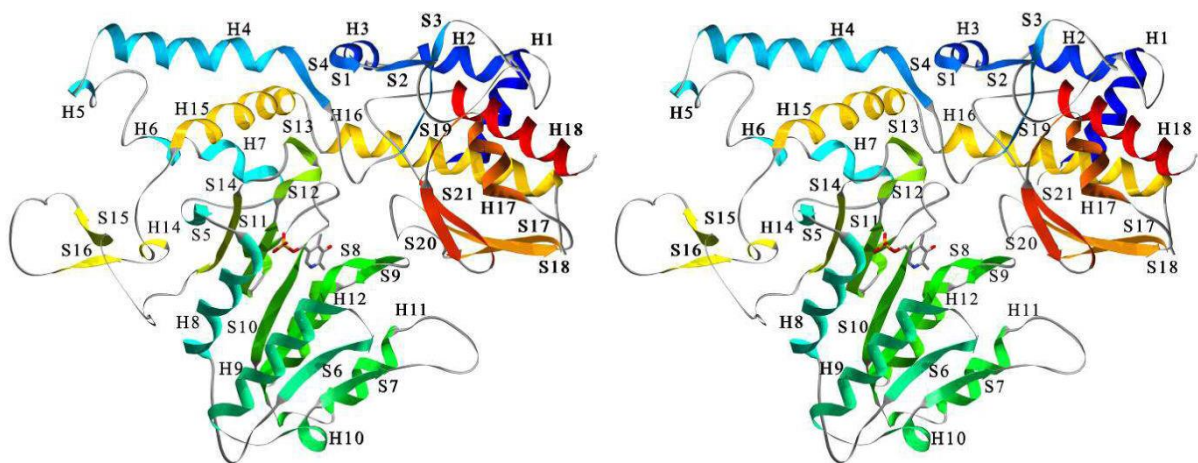


Abb. 1.4.1 Tertiärstruktur humaner Kynureninase (Lima, Kristoforov, Momany, & Phillips, 2007).

β -Faltblattstrukturen sind mit dem Präfix S benannt, α -Helices mit dem Präfix H. Der Kofaktor Pyridoxal-5'-phosphat ist im Monomer zwischen den β -Strängen S8 und S11 lokalisiert. Die große Untereinheit ist in den Farben grün, hellblau und gelb (H15, S15, und S16), die kleine in den Farben rot, dunkelblau, orange und gelb (H16) dargestellt.

Kynureninase katalysiert die hydrolytische Reaktion von 3-Hydroxy-Kynurenin und H_2O zu 3-Hydroxy-Anthranilat und Alanin. Kofaktor hierbei ist Pyridoxal-5'-phosphat. Die genaue Übersicht über die biochemische Reaktion bietet Abb. 1.4.2. Dabei besitzt das Enzym eine Substratpräferenz für 3-Hydroxy-L-Kynurenin gegenüber L-Kynurenin (Lima, Kumar, Gawandi, Momany, & Phillips, 2009). Die katalytische Aktivität von Kynureninase beträgt $K_M=3\mu\text{mol}$ bei einem Aktivitätsoptimum unter einem pH Wert von 8,25 (Walsh & Botting, 2002).

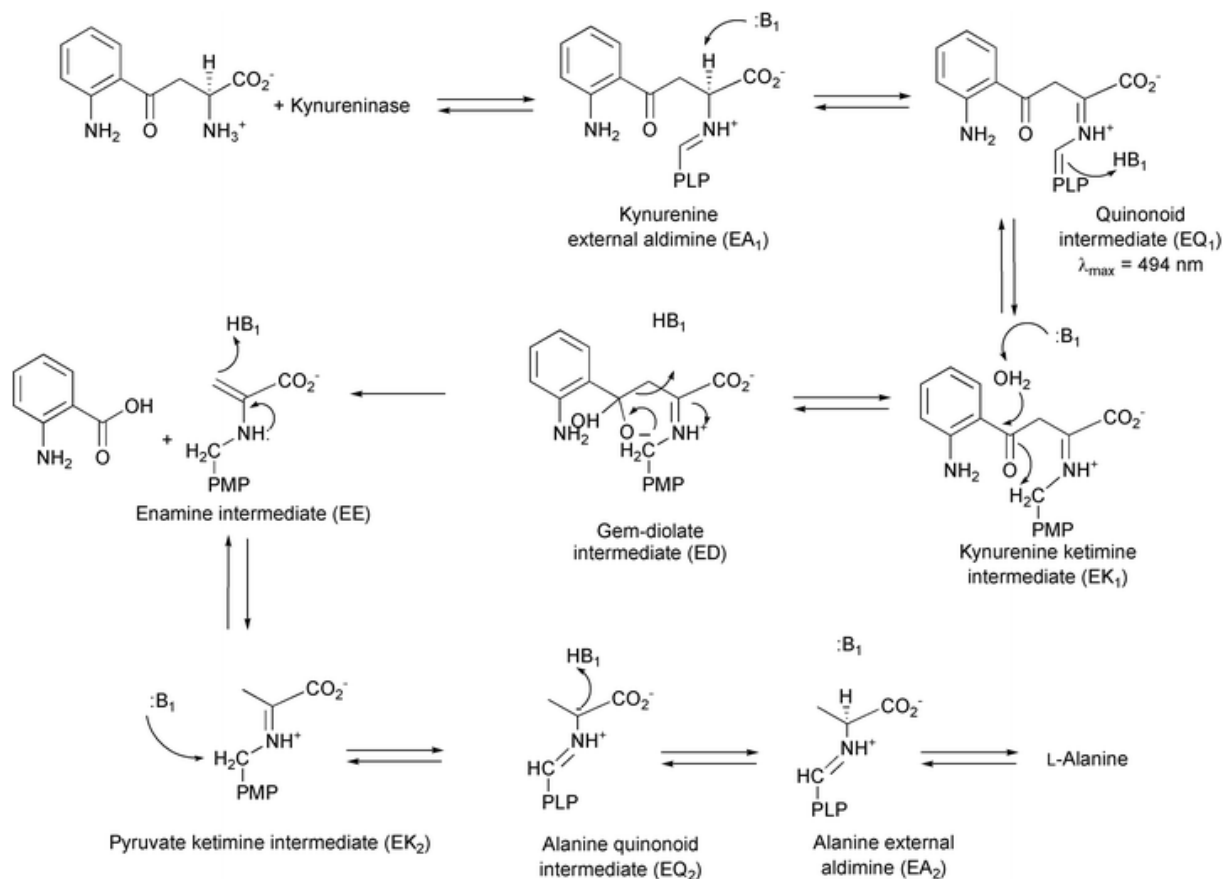


Abb. 1.4.2 **Durch Kynureninase katalysierte Reaktion von Kynurenin zu Anthranilsäure und Alanin** (Heiss, Anderson, & Phillips, 2003).

Das KYNU Gen ist auf Chromosom 2q22.1 lokalisiert (Alberati-Giani, et al., 1996). Alternatives Spleißen ermöglicht die Proteinsynthese einer Kynureninase Isoform 2, unter Ausschluss der letzten 158 Aminosäuren. In neuronalen Zellen wird die Aktivität des Enzyms durch die Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen Interferon- γ , TNF- α und

Lipopolysacchariden gesteigert (Chiarugi, Calvani, Meli, Traggiai, & Moroni, 2001). Inhibitoren des Enzyms sind L- und D-Kynurenine, O-Methylbenzoylalanin, 2-Amino-4-oxo-4-naphthyl-Buttersäure oder 2-Amino-4-[3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxy-Buttersäure (Walsh & Botting, 2002), (Fritzgerald, Muirhead, & Botting, 2001), (Walsh, Leslie, O'Shea, & Botting, 2002).

Die Xanthurenazidurie, eine sehr seltene, durch eine Punktmutation im KYNU Gen verursachte Stoffwechselerkrankung, führt zur vermehrten Ansammlung und Ausscheidung von Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, Kynureninsäure und Xanthurensäure. Aufgrund der verminderten NAD⁺ Synthese können bei Betroffenen Pellagra ähnliche Symptome, sowie geistige und körperliche Retardierung auftreten. Die Behandlung der Erkrankung erfolgt durch eine hochdosierten Gabe von Pyridoxal-5'-phosphat (Christensen, Duno, Lund, Skovby, & Christensen, 2007).

Durch Einzelnukleotid-Polymorphismen verursachte Varianten von Kynureninase wurden bei Han-Chinesen mit Bluthochdruck in Verbindung gebracht (Zhang, et al., 2005).

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 führte der Knockdown des Arylhydrocarbonrezeptors, welcher als Transkriptionsfaktor für onkogene Proteine fungiert (s.o.), zur Herunterregulation der Kynureninase-mRNA (Goode, Pratap, & Eltom, 2014).

Zu vorliegender Arbeit wurde im Vorwege die Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl durch Herrn Dr. Güngör, den Arbeitsgruppenleiter des allgemeinchirurgischen Forschungslabors, kontinuierlich mit aufsteigenden Dosen des Chemotherapeutikums Gemcitabin versetzt, bis diese eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Gemcitabin erwarb (Güngör, et al., 2011). Anschließend wurden die in das Kulturmedium sezernierten Proteine der chemotherapieresistenten und sensiblen Zelllinien mit Hilfe der sogenannten SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)-Methode verglichen. Die SILAC-Methode ist ein Verfahren zur radioisotopischen Markierung des Proteoms einer Zellprobe, sodass Unterschiede in den enthaltenden Proteinmengen zu anderen Proben massenspektrometrisch quantifiziert werden können. Dieser SILAC-Versuchsansatz enthüllte die vermehrte Präsenz des Kynureninase-Proteins im Kulturmedium der chemotherapieresistenten L3.6pl RES Linie im Vergleich zur chemotherapiesensiblen Ursprungslinie (L3.6pl WT).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt eine Krebserkrankung mit steigender Inzidenz in den Industrienationen dar und belegt den vierten Platz der häufigsten krebsbedingten Todesursachen hierzulande. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8% ist es die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität, sodass dessen Inzidenz- und Mortalitätsrate beinahe gleichauf liegen (Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe, 2013). Grund für die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms sind die sehr späte Diagnosestellung im Krankheitsverlauf, bedingt durch mangelnde Frühsymptome und unzureichende diagnostische Mittel, sowie das rasche, aggressive und hoch infiltrative Wachstum des Tumors. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die meisten Pankreaskarzinome inoperabel, und somit einer kurativen Therapie nicht mehr zuführbar. Aus therapeutischer Sicht ist auch die rasche Resistenzentwicklung der Tumore gegenüber der Therapie mit gängigen Chemotherapeutika problematisch.

Die Herausforderung an die Forschung am Pankreaskarzinom besteht daher in der Suche nach Biomarkern zur raschen Diagnose eines Pankreaskarzinoms, sowie in der Entschlüsselung molekularer Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung. Das Kynureninase-Protein ist im Labor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie durch Herrn Dr. Güngör in einem sogenannten SILAC Versuchsansatz im Zellkulturüberstand besonders chemoresistenter Pankreaskarzinomzellen vermehrt nachgewiesen worden. Kynureninase ist als Stoffwechsellzym für den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan im Rahmen des Kynurenin-Abbaupeges mitverantwortlich. Der Kynurenin-Abbaupeg mündet in der Gewinnung des Energielieferanten NAD^+ . Weitere Enzyme des Kynurenin-Abbaupeges sind bereits mit pathologischer Entzündung, Immunmodulation und dem Tumorgeschehen in Verbindung gebracht worden (Uyttenhove, et al., 2003) (Pilotte, et al., 2012) (Sahm, et al., 2013).

Eine Literaturrecherche bezüglich der Kynureninase-Expression und deren potentieller Funktionen im Pankreaskarzinom blieb erfolglos.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Expression von Kynureninase im Pankreaskarzinom auf Protein- und Transkriptomebene, sowohl an Zellmaterial aus Pankreaskarzinomzelllinien als auch an Patientengewebe. Des Weiteren soll Kynureninase im Hinblick auf tumorfördernde Eigenschaften und Resistenzmechanismen gegenüber Chemotherapeutika molekularbiologisch charakterisiert werden. Hierzu soll eine stabile

Stilllegung des KYNU Gens mittels shRNA in einer besonders chemotherapieresistenten Pankreaskarzinomzelllinie erzeugt und der resultierende Phänotyp analysiert werden.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit sollen helfen, die für den aggressiven Phänotyp des Pankreaskarzinoms verantwortlichen molekularen Mechanismen besser zu verstehen und die Forschung an einer effektiven chemotherapeutischen Behandlung unterstützen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Materialien, Chemikalien

3.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank 37°C, 5% CO ₂		Heraeus Instruments, Hanau
ELISA Reader	FluostarOmega	BMG Labtech, Ortenberg
Entwickler	Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Filmkassette	x-ray cassette	rego, Augsburg
Gefrierschrank -20°C		Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C		Kryotec, Hamburg
Heizblock	Thermo Shaker TS-100	Peqlab, Erlangen
Inkubator		Heraeus Instruments, Hanau
Inkubator	CO ₂ Incubator C16	Labotect, Göttingen
Konfokales Mikroskop	SP-5	Leica, Wetzlar
Kryotom	Microm HM550 Cryostat	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank +4°C		Linde, Unterschleißheim
Magnetrührer	Ikamag RH	Jemke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Axiovert 40CFL	Zeiss, Göttingen
Mikroskop	Axio Scope A1	Zeiss, Göttingen
PCR Gerät	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photometer	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Pipetten	1000/200/100/20µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Real-Time PCR Cycler	LS 480	Roche, Basel, Schweiz
Rotator	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Rüttler	KS 15 Control	Edmund Bühler, Tübingen
Schüttler	Orbital Shaker S03	Stuart, Staffordshire, UK
SDS-Laufkammer	Mini Protean II	Bio-Rad, München
SDS-Page Power Supply	PowerPac Universal	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau

Vortexer	Certomat MV	B. Braun Biotech International
Wärme Inkubator	B15	Heraeus Instruments, Hannau
Wärmebad	W6	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tab. 3.1.1 Liste der verwendeten Geräte.

3.1.2 Materialien

Produkt	Modell	Hersteller
6-Well-Platte	Nuncleon Delta Surface 6 Well Plate	Thermo Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platte	Microplate F-Bottom	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Platte	Light Cyclor 480 Multiwell Plate 96	Roche, Basel, Schweiz
96-Well-Platte	OptiPlate-96 F HB, Black 96-well Microplate	PerkinElmer, Waltham, USA
96-Well-Zellkultur-Platte	Cellstar 96 Well Culture Plate	Greiner, Frickenhausen
Cover Slips		
Deckgläser	Verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe
Färbekasten, Färbegestell,	SMG-Glas, für 10 Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Filterpapier		VWR, Darmstadt
Filterpapier	Trockenblock	Whatman
Inkubationskammer für Objektträger		Carl Roth, Karlsruhe
Kanüle	Sterican® Standardkanüle	B.Braun, Melsungen
Kryoröhrchen		nunc, Langenselbold
Nitrozellulosemembran	Nitrocellulose Membrane	Thermo Scientific, Waltham, USA
Objektträger		Marienfild, Königshofen
Pasteurpipetten	Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen, versch. Größen		Falcon, Eppendorf, Biosphere, Sarstedt
Reaktionsgefäße	15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, safe lock	0,1ml, 0,5 ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Medical x-ray screen film	CEA, Hamburg

Spritzen	Injekt, verschiedene Volumina	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Sterile Syringe Filter 0,2µm	VWR, Darmstadt
Ultrazentrifugationseinheit	Vivaspin 20, Vivaspin 60	Sartorius AG, Göttingen
Zählkammer	Neubauer	
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	TC Flasche T75, T25	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen, versch. Größen	nunc lon surface	nunc, Langenselbold
Zellmigrationsfilter	Costar Transwell Permeable Support 8,0 µm	Corning, New York, USA
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 3.1.2 Liste der verwendeten Materialien.

3.1.3 Chemikalien

Produkt		Hersteller
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Medium	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
	DMEM	
	OptiMEM	
	Keratinocyte-SFM	
Einfriermedium	Recovery	
FCS (Fetal calf serum) Fötales Kälberserum	10%	
Penicillin/Streptomycin	200 IU/ml	
Trypsin	0,25% EDTA	
PBS PBS-T	Dilbecco's phosphate buffered saline Dilbecco's phosphate buffered saline + Tween	
Trypanblau	Blue Stain 0,4%	
Acrylamid	30%Acrylamid/Bis 37, 5:1	Bio-Rad, München
Ammoniumperoxo- disulfat	APS	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Antikörperlösung	Antibody Diluent	Dako Deutschland, Hamburg
BCA- Reagenz	Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit. Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific, Rockford, USA
Blot Entwickler Substrat	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Blot Entwickler Substrat	Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Calcein	Calcein, AM, cell-permeant dye	Invitrogen, Carlsbad, USA

Chloroform		VWR, Darmstadt
Cloroquin	Cloroquin diphosphate salt solid	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
di-natriumhydrogen-phosphat-Heptahydrat	Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)		GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Calcium Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Eindeck-Medium mit DAPI	Mounting Medium with DAPI	Invitrogen, Carlsbad, USA
Epidermaler Wachstumsfaktor	Animal-free Recombinant human EGF AF-11-15	Pepro Tech, London, UK
Fettfreies Milchpulver	Blotting grade blocker non-fat dry milk	Bio-Rad, München
Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Recombinant Human FGF-Basic 100.18-B	Pepro Tech, London, UK
Formaldehyd	Formaldehyde Solution 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Gemcitabin	GEMZAR 1000 Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung	Elly Lilly, Indianapolis, USA
Gentamycin	10mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Glycin	Glycine Reagent Plus	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Hämalaun Lösung	Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
HBS Lösung	HEPES buffered saline, BioUltra, for molecular biology, 2× concentrate	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Insulin, bovin	I6634	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogen-phosphat	KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Kanamycin sulfate from Streptomyces kanamyceticus	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Ladepuffer	Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München
Lysis Puffer	RIPA-Buffer	PIERCE, Waltham, USA
Methanol		VWR, Darmstadt
MTT Reagenz	Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Fitchburg, USA
Nährboden	LB Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Nährmedium	LB Broth (Luria low salt)	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
NP-40	NP-40 (ab142227)	ABCAM, Cambridge, UK
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Polybrene	Hexadimethrine bromide	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau Rot	Ponceau S	Serva, Heidelberg
Protease Inhibitor	Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (100X)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protein A/G Agarose	Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
Proteinstandard	Precision Plus Protein Standards Dual Color	Bio-Rad, München
Real Time PCR Amplifikationsmix	Absolute qPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sammel-Gel-Puffer	Stacking Gel Buffer	Bio-Rad, München
Selektionsmedium	Fast-Media Amp LB	Invivogen, San Diego, USA
Selektionsmedium	Fast-Media Amp X-Gal	Invivogen, San Diego, USA
SOB-Medium	500g	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Trenn-Gel-Puffer	Resolving Gel Buffer	Bio-Rad, München
Transferrin, human	T8158	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Triton TM	Triton TM X-100	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Tri Reagenz	Peq Gold Tri Fast 100ml	Peqlab, Erlangen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Trizma base	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20		Serva, Heidelberg

Tab 3.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien.

3.1.4 Lösungen, Medien

Für die Herstellung folgender Lösungen wurde vollentsalztes, enteistes Wasser verwendet. Die Adjustierung des pH-Werts erfolgte durch Zugabe von NaOH, KOH oder HCL. Nährlösungen für Bakterien wurden vor deren Verwendung autoklaviert.

Lösung	Zusammensetzung
--------	-----------------

Laemmli Probenpuffer (3x)	60mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10% β -Mercaptoethanol, 50% Glycerin, 1,5% Bromphenolblau
LB-Medium	15g/l LB Broth (Luria/Miller), Roth®
NETN-Puffer	0,5% NP 40; 20mM Tris (pH 8,0); 100mM NaCl; 1mM EDTA; 10% Glycerol ; frisch dazugeben 1mM DTT; 1mM PMSF; 1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche)
PBS-Puffer	0,14M NaCl; 2,7mM KCl; 3,2mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5mM KH ₂ PO ₄
PBST	PBS und 0,1% Tween 20
SDS PAGE Lauf-Puffer	25mM Tris-HCl; 190mM Glycerol; 0,1% SDS (pH 8,3)
TBS-T	50mM Tris-HCl; 0,15M NaCl (pH 7,6)
Western Blot Transfer-Puffer	50mM Tris (pH 8,0); 380mM Glycin; 0,1% SDS

Tab. 3.1.4 Liste der verwendeten Lösungen und Medien.

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Ursprung	Hersteller
Human Kynureninase MAb (Clone 589731)	Maus	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-L-Kynurenine Hydrolase antibody (ab96365)	Kaninchen	ABCAM, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody	Ziege	life technologies, Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody	Ziege	life technologies, Carlsbad, USA
anti-HRP-Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-HRP-Antikörper	Maus	Cell Signaling, Beverly, USA
Monoclonal Anti- β -Actin	Maus	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Antikörper als Negativkontrolle, Mouse IgG1 (MoPC-21)	Maus	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Antikörper als Negativkontrolle, Mouse IgG1, X0931	Maus	Dako Deutschland, Hamburg

Tab. 3.1.5 Liste der verwendeten Antikörper.

3.1.6 shRNA, Plasmide

RNA	Sequenz, Beschreibung	Hersteller
Kynureninase shRNA-A	GAGCAGGAGGAATTGCTGGTGCTTCATT (29)	Origene, Beijing, China
Kynureninase shRNA-B	CTCTCCACCTAGATGAGGAAGATAAGCTG (29)	
Kynureninase shRNA-C	GCGTTCCTTGGATTACAGGAGATGAGAGTA (29)	
Kynureninase shRNA-D	GCCTTATGAAGGACATTGTAGGAGCCAAT (29)	
Kontroll-shRNA		
pGAG (Gruppenspezifisches Antigen)	Retrovirales Gen für Matrix- Kapsid- und Nukleokapsidproteine	Freundlicher-weise durch AG Ph.D. Carol Stocking (HPI) zur Verfügung gestellt
pPOL (Polymerase)	Reverse Transkriptase, Integrase und Protease	
GALVenv	Retrovirale Hüllproteine	

Tab. 3.1.6 Liste der verwendeten shRNA und Plasmide.

3.1.7 Zytokine

Zytokin	Hersteller
IFN- γ Rekombinantes humanes Protein, 100 μ g	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA

Tab. 3.1.7 Liste der verwendeten Zytokine.

3.1.8 Herstellerkits

Kit		Hersteller
c-DNA Synthese	Transcripor First Strand c-DNA Synthesis Kit	Roche, Basel, Schweiz
Immunhistochemie Reagentien	Cell&Tissue Staining Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Plasmid-Maxi-Präparationen	Pure Link Hi Pure Plasmid DNA Purification Kit	life technologies, Carlsbad, USA
RNA Isolation	RNeasy Mikro Kit	Quiagen, Hilden
Zellfraktionierung	Subcellular Protein Fraction Kit for Cultured Cells	Thermo Scientific, Rockford, USA
Deglykosylierung	Protein Deglycosylation Mix	New England BioLabs, Ipswich, USA

Tab. 3.1.8 Liste der verwendeten Herstellerkits.

3.1.9 Primer

Primer	Sequenz, Beschreibung	Hersteller
hKYNU-F1	GGCTCTCCACCTAGATGAGGA (21)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
hKYNU-R1	GCTGCTATTTTGGCCCACTTAT (22)	
hKYNU-F2	GGGGAAGCGTCCTTGGATTAC (21)	
hKYNU-R2	CGTGAAGTTGTAGTTGTGACTCA (23)	
H_GAPDH-F	CCACTCCTCCACCTTTGAC (19)	
H_GAPDH-R	ACCCTGTTGCTGTAGCCA (18)	

Tab 3.1.9 Liste der verwendeten Primer.

3.1.10 Bakterienstämme

	Stamm, Beschreibung	Produktname	Hersteller
<i>Escherichia Coli</i>	DH5 α : F- <i>gyrA</i> 96(Nal ^r) <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r_K^- m_K^+) <i>glnV44</i> <i>deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 [Φ 80d Δ (<i>lacZ</i>)M15]	One Shot Top Ten Chemically Competent <i>E. Coli</i>	life technologies, Carlsbad, USA

Tab. 3.1.10 Liste der verwendeten Bakterienstämme.

3.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet.

1. Die HPDE (Human Pancreatic Duct Epithelial) Linie diene als Referenzzelllinie, da sie als einzige Zelllinie nicht maligne entartet war. Die Zelllinie war durch die Transduktion einer primären Pankreasepithelzelllinie mit den HPV16 Genen E6E7 etabliert worden, und besaß einen mit gutartigem epithelialen Pankreasgewebe annähernd identischen Genotyp und Phänotyp (Ouyang, et al., 2000). Sie war dem allgemein chirurgischen Forschungslabor freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe S. Sebens der Universitätsklinik Kiel zur Verfügung gestellt worden. Sie wurde in KFS-M Keratinozytenmedium kultiviert.
2. Die Zelllinie L3.6pl, laborintern als L3.6pl Wilttyp (WT) bezeichnet, ist eine aus Lebermetastasen gewonnene Pankreaskarzinomzelllinie. Für die Etablierung dieser Linie waren Versuchstieren COLO357 Zellen in das Pankreas injiziert worden. Aus deren Lebern konnten metastatische Zellen erfolgreich isoliert und kultiviert werden (Bruns, Harbison, Kuniyasu, Eue, & Fidler, 1999). Letzteres wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Zelllinie war dem UKE freundlicherweise durch Frau Prof. Bruns der

Ludwig-Maximilians-Universität München übergeben worden. Diese Zelllinie wurde in RPMI Medium kultiviert.

3. Die Zelllinie L3.6pl 2 μ M RES war im Labor der Allgemeinchirurgie des UKE aus L3.6pl WT Zellen etabliert worden. Dazu war die chemosensible Ursprungslinie kontinuierlich mit aufsteigenden Dosen von Gemcitabin behandelt worden, bis diese, sonst längst letale Dosen von 2 μ M Gemcitabin toleriert hatte (Güngör, et al., 2011). Beide L3.6pl Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert. Die chemotherapie-resistente L3.6pl RES Linie wurde kontinuierlich in der Gegenwart von 2 μ M Gemcitabin kultiviert.
4. Die Zelllinie Panc-1 ist kommerziell erwerblich (CRL-1469, ATCC). Sie war aus dem Resektionspräparat eines 56 Jahre alten, am Pankreaskarzinom erkrankten Mannes kultiviert worden. Der pathologische Befund entsprach einem undifferenzierten Karzinom duktales Ursprungs (Lieber, Mazetta, Nelson-Rees, Kaplan, & Todaro, 1975). Die Panc-1 Karzinomlinie war freundlicherweise durch die Universität Freiburg zur Verfügung gestellt worden. Die Zellen wuchsen in DMEM Kulturmedium.
5. Die Zelllinie BxPC3 entstammt der Biopsie einer 61 jährigen kaukasischen Frau, welche an einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt war (Tan, et al., 1986). Die Zellen wurde in DMEM Medium kultiviert. Die Zelle war von von ATCC (CRL-1687) erworben worden.
6. Die Zelllinie PaCa 5061 wurde aus einem Adenokarzinom des Pankreas eines Patienten des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gewonnen und im Labor der Klinik für Allgemeinchirurgie erfolgreich etabliert (Kalinina, et al., 2010). Die Kultur erfolgte in TUM Medium. Zu dessen Herstellung wurden 500 ml RPMI 1640 Medium 50 ml FCS (10% FCS), 5ml Penicillin/Streptomycin, 50nmol/ml Transferrin, 0,01 μ g/ml Insulin, 0,01 μ g/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor, und 0,01 μ g/ml Epidermaler Wachstumsfaktor zugesetzt.

Die Kulturmedien aller verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 10% FCS und 200IU/ml Penicillin/Streptomycin supplementiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transformation von Bakterienzellen

Zunächst wurden die gekauften Plasmide in 50µl Wasser gelöst. Die Bakterien-Transformation wurde mit den sh-RNA Plasmiden A, B, C, D und sh-Kontrolle durchgeführt. Als kompetente Zellen dienten *One Shot Top Ten* Bakterien der Firma Invitrogen (*E.Coli* DH5α). 200ng DNA (2µl) der fünf Plasmide wurden mit je einer 100µl Bakterien-haltigen Suspension vermengt. Nach einer 20 minütigen Inkubationsphase auf Eis wurden die Röhrchen für 90sec im Heizblock auf 42°C erhitzt um die Plasmid-DNA durch den Heatshock in die Bakterien zu transformieren. Anschließend wurden die Bakterien zwei Minuten auf Eis gelagert, woraufhin ihnen 1ml Trypton-haltiges SOB Medium zur Regeneration hinzugefügt wurde. Eine Stunde lang wurden die Suspensionen bei 37°C und 1000rpm gerüttelt. Die Gemische wurden 2min bei 14000rpm zentrifugiert und in 50µl des SOB Mediums resuspendiert. Mit einem Trigalski-Spatel wurden die Medien auf Kanamycin-haltigen Agar Platten (50µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet. In allen erworbenen Plasmiden befand sich ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Dementsprechend konnten auf den Agar Platten nur solche Bakterien proliferieren, welche das Plasmid zuvor erfolgreich internalisiert bzw. exprimiert hatten.

3.3.2 Plasmidpräparation im großen Maßstab

Die Plasmid Extraktion aus Bakterien wurde mit einem Kit der Firma Life Technologies durchgeführt. Jeweils 200ml LB Medium wurden für jedes Plasmid mit einer Bakterienkolonie in Erlmeyerkolben mit Schikanen angeimpft. Das Nährmedium wurde mit 50µM/ml Kanamycin versetzt. Die Erlmeyerkolben wurden über Nacht bei 37°C und bei 230 Umdrehungen pro Minute gerüttelt um eine gute Belüftung des Mediums zu garantieren. Am Folgetag wurden die Medien bei 4000g 10min lang zentrifugiert und der Überstand entfernt. Bei den folgenden Schritten wurde nach Protokoll des Herstellerkits verfahren. Die Zellpellets wurden in einem Resuspensionspuffer, welcher RNase A enthielt, gelöst. Mit 10ml des Lysis Puffers wurden die Zellen aufgeschlossen und die Plasmid-DNA der Zellen zugänglich gemacht. Durch Zugabe von 10ml eines Präzipitationspuffers wurden zelluläre Bestandteile wie Zellmembran, Zellorganellen und Zellkern mit genomischer DNA ausgefällt. Die Lysate wurden anschließend für 20min bei 6000g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Silica-Säulen des Herstellers zur Plasmidextraktion mit 30ml des Equibrilationspuffers benetzt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Säulen mit dem Überstand der Röhrchen beladen. Dabei sollten Kationen der stark salzhaltigen Lösung die Anheftung der negativ geladenen Plasmid DNA an

den ebenfalls anionisch geladenen Silica-Säulen ermöglichen. Danach wurden die Säulen mit 60ml Waschpuffer des Herstellers gereinigt. Nachdem ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen unter der Säule platziert worden war, erfolgte die Lösung der DNA in 15ml Elutionspuffer. Der Durchfluss enthielt die extrahierte Plasmid-DNA. Zu den Lösungen wurden 10,5ml Isopropanol hinzugegeben um die DNA zu fällen. Anschließend wurde das Gemisch 60min lang bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA Pellet wurde in 5ml 70% Ethanol gewaschen und weitere 5min unter letzteren Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die DNA luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 300µl sterilem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Der Gehalt an Nukleinsäuren wurde spektrometrisch am Nanodrop®-Photometer gemessen. Im Spektrophotometer wurde die DNA mit UV Licht von 260 und 280nm Wellenlänge angeregt. Ein Detektor maß die Lichtintensität der durchdringenden Lichtstrahlen. Je stärker die Absorption des UV Lichts, desto höher war der Gehalt an Nukleinsäuren. Aus der gemessenen Extinktion und dem durchschnittlichen Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA von $0.020(\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ errechnete sich der DNA Gehalt der Lösung. Die gelösten Plasmide wurden auf eine Konzentration von 1000ng/µl eingestellt.

3.3.4 RNA Interferenz

Die RNA Interferenz ist ein Mechanismus eukaryotischer Zellen welcher der sequenzspezifischen Ausschaltung von Messenger RNA dient. In den Biowissenschaften wird er zur zielgerichteten Genstilllegung, dem Knockdown, genutzt. Eine von außen eingeschleuste RNA Sequenz soll die komplementäre mRNA eines Gens reduzieren, sodass das weiterhin transkribierte Gen nicht mehr zum Protein translatiert wird.

Fire und Mello erkannten 1998 bei Experimenten am Fadenbandwurm *C. elegans*, dass in Zellen injizierte, doppelsträngige RNA in der Lage ist, deren Genexpression zu verändern (Fire, et al., 1998). Für diese Erkenntnis wurden sie 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

In vorliegender Arbeit wurde gegen Kynureninase gerichtete sh-RNA des Herstellers Origine (siehe shRNA, Plasmide) ins Genom der Empfängerzellen transduziert.

Bei der Genstilllegung mittels shRNA wird diese transkribiert und als pri-mikroRNA ähnelnder Komplex vom Enzym Drosha prozessiert (Zeng, Rui, & Cullen, 2005). Es entsteht shRNA welche aus dem Zellkern ins Zytoplasma gelangt. Die doppelsträngige RNA wird von dem

Enzym Dicer in 20-30 Basen lange Fragmente geschnitten, indem Dicer mit der RNase III interagiert. (Meister & Tuschl, 2004) Diese Fragmente werden auf den sogenannten RNA-induzierten silencing Komplex (RISC) geladen, durch Helicaseaktivität entwunden und in Einzelstränge zerlegt (Hammond, Caudy, & Hannon, 2001). Einer dieser Stränge wird mit Hilfe des Proteins Ago2 zerschnitten und abgestoßen. Der verbleibende Komplementärstrang hybridisiert mit der Ziel mRNA und die RNA wird durch Ago Proteine abgebaut (Carthew & Sontheimer, 2009). Die RNA Interferenz ist also eine Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene (Hannon, 2002). Eine vollständige Genstilllegung ist mit dieser Methode nicht erreichbar, es verbleibt stets eine Genaktivität von 5-10%. Die richtige Nukleotidlänge und ein CG-Basengehalt zwischen 30-55 % sollen die Effektivität erhöhen. Des Weiteren kann eine Loop Sequenz zwischen den RNA Fragmenten die Effizienz erhöhen, invertierte Wiederholungen können der Effizienz abträglich sein (Reynolds, et al., 2004). Mit Hilfe von „Blast Software“ ist es möglich Homologien der Sequenzen zu anderen Genen auszuschließen (zB. www.pubmed.com).

3.3.5 RNA-Isolation aus Zellenpellets

Zunächst wurden die Pellets in einem ml Trireagenz (Peqlab) resuspendiert. Trireagenz enthält Guanidiniumthioacetat und Phenol. Guanidiniumthioacetat lysiert die Zellmembranen und inaktiviert RNasen, Phenol bringt die RNA in Lösung. Das Gemisch wurde eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10min bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Die Suspension wurde geschüttelt, mit 200µl Chloroform versetzt und nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erneut bei 12000g und 4 °C 15min lang zentrifugiert. Hiernach waren drei Phasen zu erkennen. Die untere Phase enthielt die Proteine, die mittlere Phase DNA, die obere Phase enthielt die RNA, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Es wurde mit dem Quiagen RNeasy Plus Mini Kits nach Herstellerangaben fortgefahren. Das Volumen wurde auf die DNA-Eliminator Säulen gegeben und 90sec lang bei 8000g zentrifugiert. Die Säulen wurden verworfen und der Durchfluss wurde mit 70% Ethanol auf ein Volumen von 700µl gebracht. Mit dem Gemisch wurden die RNeasy Säulen bestückt, welche für 30sec bei 8000g zentrifugiert wurden. Der Durchsatz wurde verworfen und die Säule mit 700µl des RW1 Puffers gewaschen. Die Säule wurde anschließend erneut unter letzteren Bedingungen zentrifugiert. Danach wurden die Reinigungssäulen mit 500µl RPE Puffer befüllt und erneut zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und die Säule durch nochmalige Zentrifugation getrocknet. Unter den Trennsäulen wurden neue Eppendorf Reaktionsgefäße befestigt und die gebundene RNA mit 30µl RNase freiem Wasser, durch einminütige

Zentrifugation bei 8000g und 4°C, eluiert. Die RNA Proben wurden direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C tiefgekühlt gelagert.

3.3.6 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde das Transcriptor First Strand c-DNA Synthesis Kit der Firma Roche verwendet. Dabei werden die RNA Stränge durch das Enzym Reverse Transkriptase und die zugefügten Deoxynukleotide in cDNA umgeschrieben. Ein Oligo-dT-Primer band den polyadenylierten Bereich am 3' Ende der mRNA spezifisch und diente als Startpunkt für die Reaktion. Die RNA Proben wurden zunächst auf eine Konzentration von 1µg/ml durch Messung mit dem Nanodrop Spektrophotometer eingestellt. 1µg der RNA wurde mit 1µl oligo(dT)₁₈ Primern versetzt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 13µl eingestellt. Die RNA Lösung wurde 10min lang bei 65°C im Thermoblockcycler denaturiert. Dem Reaktionsgefäß wurden 4µl Reaktionspuffer, 0,5µl RNase Inhibitor, 2µl eines Deoxynukleotid Mix und 0,5µl Reverse Transkriptase zugefügt. Die Umschrift der RNA erfolgte durch 30 minütige Inkubation bei 55°C im Thermoblock. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.7 Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR basiert auf einer herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion. Hierbei wird die DNA einer Probe durch Hinzugabe von Desoxyribonukleotiden und einer thermostabilen Polymerase beim Durchlaufen unterschiedlicher Temperaturzyklen fortlaufend getrennt und vervielfältigt. Die Erstbeschreibung der Real-Time PCR geht auf Higuchi im Jahre 1992 zurück (Higuchi, Dollinger, Walsh, & Griffith, 1992). So fügte die Arbeitsgruppe um Higuchi einem gewöhnlichem PCR Reaktionsgefäß Ethidiumbromid bei, und maß dessen Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus. Ethidiumbromid besitzt die Eigenschaft bevorzugt doppelsträngige DNA zu binden und ermöglicht somit die Quantifizierung des Amplifikats im PCR-Reaktionsgefäß. Die Real-Time PCR ist inzwischen in der Molekularbiologie weit verbreitet, es finden jedoch andere Farbstoffe anstatt Ethidiumbromid Verwendung.

Die Real-Time PCRs wurden in dieser Arbeit mit einem Light Cycler LS 480 der Firma Roche durchgeführt. Dabei lief die PCR in den Kavitäten einer 96-Well-Platte ab, der mitgelieferte Mastermix enthielt SYBR[®] GREEN als fluoreszierenden Farbstoff. Ein Computerprogramm ermittelte während der Replikationszyklen den CT Wert, jenen Punkt der Kettenreaktion, ab welchem die PCR exponentiell ablief. Die CT Werte verschiedener Proben konnten später verglichen werden.

Zunächst wurden die lyophilisiert gelieferten Primer nach Herstellerangaben in H₂O mit einer Zielkonzentration von 100pmol/μl gelöst. Die Primer waren komplementär zu einem Bereich der Kynureninase-mRNA konstruiert worden, sodass während der PCR Kynureninase kodierende DNA repliziert und quantifiziert wurde. Aus jeweils 10μl eines Sinn- und Gegensinnprimers sowie 80μl sterilen Wassers wurde ein Primermix hergestellt. In jedes Well der Reaktionsplatte wurden 12,5μl des SYBR[®] GREEN Mastermixes gegeben, welcher neben SYBR[®] GREEN die Desoxynukleotide und die Polymerase enthielt. Zusätzlich wurden 1μl des Primer-Mix, 9,5μl H₂O und 2μl der zu messenden cDNA hinzugefügt, sodass ein Reaktionsansatz von 25μl resultierte. Jeder Reaktionsansatz wurde in Doppelbestimmung pipettiert. Die Lochplatte wurde mit einer mitgelieferten Klarsichtfolie verschlossen und eine Minute lang bei 1000g im Swing-Out Rotor zentrifugiert. Nun wurde der Light Cycler[®] mit der PCR Platte beladen und folgendes PCR Programm gestartet.

Zyklen	Zeitprofil	Temperatur	
1	10min	95°C	Initiale Denaturierung
45	15s 1min	95°C 60°C	Denaturierung Extension
1	1min 2min	95°C 65°C 65°C bis 95°C(2°C/min)	Schmelzkurve

Tab. 3.3.1 Beschreibung des verwendeten Real-Time-PCR Programms: Zyklussequenz, Zeit- und Temperaturprofil.

3.3.7.1 Relative Quantifizierung

Um die Expressionslevel der Kynureninase unterschiedlicher Proben anhand ihrer C_T Werte vergleichen zu können, wurden ebenfalls DNA Messungen von Haushaltsgenen wie GAPDH auf der gleichen 96-Well-Platte durchgeführt. Haushaltsgene sind idealerweise in den zu vergleichenden Zellen gleich stark konstitutiv exprimiert. Die Differenzen der C_T Werte von Kynureninase und GAPDH, die dC_T Werte, konnten miteinander verglichen werden. Dazu wurde von allen dC_T Werten der dC_T Wert der Referenzprobe subtrahiert. Zur genauen Auswertung der Real-Time-PCR und ihrer Herleitung siehe (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zellkultivierung

Zur Zellkultivierung wurden die gewünschten Kryoröhrchen auf Raumtemperatur erwärmt und die enthaltene Zellsuspension in eine mit 20ml des betreffenden Kulturmediums befüllte Zellkulturflasche pipettiert. Sämtliche Zellkulturflaschen inkubierten im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ Raumluftgehalt und unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die benutzten Zelllinien wuchsen als Monolayer am Boden der Zellkulturflaschen. Am Folgetag der Aussaat wurden die Zellmedien mit einer Vakuum Pumpe abgesaugt, ggf. mit PBS gewaschen und die Zellkulturflaschen mit frischem Medium bestückt. Der Mediumwechsel diente hierbei der Eliminierung des im Gefrier-Medium enthaltenen, zytotoxischen DMSO. Ferner wurden die Zellkulturflaschen alle zwei bis drei Tage mit neuem Medium befüllt und mikroskopisch auf eine mögliche Kontamination sowie den Konfluenzgrad der Zellen geprüft. Bei Erreichen eines Konfluenzgrades von über 90% wurden die Zellen aufgrund der zellkontaktinduzierten Wachstumshemmung passagiert. Die Zellkulturarbeiten wurden unter keimarmen Bedingungen unter der Sterilwerkbank durchgeführt, hierbei fanden ausschließlich sterile Pipettenspitzen sowie sterile Zellkulturbehältnisse Verwendung.

3.4.2 Passagieren der Zellen

Bei annähernd erreichter Konfluenz der Pankreaskarzinomzellen folgte deren Passage. Hierzu wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturgefäßen entfernt und der Zellrasen mit 10ml sterilem PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und aus dem Zellverband wurden anschließend 2ml Trypsin hinzugegeben. Hieran schloss sich eine fünfminütige Inkubation im Brutschrank an. Mit der Zugabe 5ml frischen serumhaltigen Mediums wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins gestoppt. Außerdem wurden hierdurch die abgelösten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Je nach Wunsch konnten nun 0,5 bis 2ml der nun verdünnten Zellkultursuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt werden.

3.4.3 Kryokonservierung

Zunächst wurden die einzufrierenden Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und abgespült. Die Zellsuspension wurde in sterile Greiner-Röhrchen übertragen. Zur Bildung eines Pellets wurde das Zellgemisch 5min lang bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand an Kulturmedium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden in einem Milliliter Frostmedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Dem Frostmedium war das Frostschutzmittel DMSO zugesetzt,

welches die Eiskristallbildung in und außerhalb der Zellen verhindert und somit den mechanischen Stress auf die Zellen minimiert. Die Kryoröhrchen wurden unter Zuhilfenahme eines sogenannten „Freezing-Boys“ schonend auf -80°C gekühlt und später im Stickstofftank bei -270°C konserviert.

3.4.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl Trypanblau gemischt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Trypanblau durchdringt die Zellmembran avitaler Zellen und färbt diese zur Unterscheidung von lebenden Zellen blau an. Die Zellzählung erfolgte unter dem Mikroskop. Es wurden vier Quadranten der Zählkammer ausgewertet und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl wurde auf ein Volumen von einem Milliliter skaliert.

3.4.5 Behandlung mit Gemcitabin

Zur chemotherapeutischen Behandlung mit Gemcitabin wurden die Zellen Panc-1, PaCa 5061 und BxPC3 zunächst in 10cm Zellkulturschalen gesät. Nach erfolgter Adhärenz wurde das Kulturmedium gewechselt, und mit 0,5 bzw. 0,25µM Gemcitabin im Falle der Linie BxPC3 supplementiert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und der Kulturüberstand zur weiteren Analyse entnommen.

3.4.6 Stimulation mit Interferon-γ

Zunächst erfolgte die Aussaat von jeweils sechs 10cm Zellkulturschalen mit HPDE, L3.6pl WT oder L3.6pl RES Zellen mit dem Ziel einer 70 bis 80 prozentigen Konfluenz am Folgetag. Am Folgetag wurde das Medium aller Zellkulturschalen gewechselt, jeweils 4 Schalen eines Zelltyps erhielten serumfreies Medium. Nach 16-stündiger Serumkarenz erfolgte die Hinzugabe von Interferon-γ in aufsteigender Konzentration. Die 6 Zellkulturschalen enthielten nun folgende Medien:

- Serumhaltiges Medium
- Serumfreies Medium
- Serumfreies Medium, 50ng/ml Interferon-γ
- Serumfreies Medium, 100ng/ml Interferon-γ
- Serumfreies Medium, 300ng/ml Interferon-γ
- Serumhaltiges Medium, 300ng/ml Interferon-γ

Nach 24 Stunden wurde das Experiment beendet. Vorher wurde das Zellkulturmedium in Greiner-Röhrchen übertragen und zur weiteren Bearbeitung bei -20°C konserviert. Die Zellen wurden trypsinisiert und pelletiert und ebenfalls in Greiner-Röhrchen bei -20°C gelagert.

3.4.7 Zellkultivierung unter Hypoxie

Die Aussaat der Zellen erfolgte am Vortag des Versuchs in 10cm Schalen mit dem Ziel einer 30- bis 40- prozentigen Konfluenz adhärenter Zellen. Für die durchgeführten Versuche fanden die Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES Verwendung. Die adhärenenten Zellen wurden folgend in einem hierfür geeigneten Brutschrank unter 1% bzw. 5% O₂-Raumlufthalt bebrütet. Hierzu erfolgte die Stickstoffinsufflation in das geschlossene System des Inkubators. Um den biologischen Zustand der Sauerstoff- und Nährstoffkarenz von Tumorzellen zu simulieren, wurden die Zelllinien jeweils auch serumfrei inkubiert. Der Serumentzug erfolgte in diesem Fall jeweils 16 Stunden vor Beginn des Experiments. Die übrigen Inkubationsbedingungen entsprachen derer gewöhnlicher Zellkultur. Nach 48 Stunden, bzw. nach 24-stündigen Intervallen wurden Zelllysate der noch adhärenenten Zellen gebildet, sowie Zellkulturüberstand entnommen.

3.4.8 Virusproduktion

Alle Zellkulturarbeiten, welche den Gebrauch von Viren erforderten, wurden im Zellkulturlabor der AG Prof. Dr. Fehse mit S2 Genehmigung durchgeführt. Am Vortag der Virenherstellung wurden 5×10^6 HEK293-T Zellen in 10cm Schalen in 10ml DMEM ausgesät. Zuerst wurden alle verwendeten Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurden 5µg des sh-RNA Vektors (A-D+K), 10µg des GAG/POL Vektors und 2µg des GALV Vektors in je einem 15ml Falcon Röhrchen zusammengefügt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 500µl aufgefüllt. Bei GAG, POL und GALV/env handelt es sich um drei Gene des Gammaretrovirus. GAG(gruppenspezifisches Antigen) kodiert die Matrix-, Kapsid-, und Nukleokapsidproteine. Die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease werden von POL codiert. GALV/env enthält die Sequenzen zur Herstellung der viralen Hüllproteine. In jedes der 15ml Röhrchen wurden 50µl 2,5-molarer CaCl₂ Lösung hinzugefügt. Kalziumchlorid verändert das Membranpotential der zu transfizierenden Zellen und ermöglicht so das Einbringen der viralen RNA in die HEK293-T Zellen. Es wurden 5 weitere 15ml Greiner-Röhrchen mit 500µl 2-fachen HBS Puffers befüllt. Mit der Auslassfunktion der Pipettierhilfe wurden nun Luftblasen im HBS Puffer gebildet während das hergestellte Gemisch der Vektoren tropfenweise hinzu pipettiert wurde. Währenddessen wurde das Medium der HEK293-T Zellen gegen 10ml neues Chloroquin-haltiges Medium getauscht. Das DNA-Gemisch wurde der in

Achten bewegten Zellkulturschale tropfenweise hinzugefügt. Die viralen Gene wurden nun in die Hek293-T Zellen aufgenommen, transkribiert und translatiert, sodass kompetente Viren entstanden. Die teilweise zum Virus komplementären Bereiche der 5' und 3' *Long Terminal Repeat*(LTR) Region des shRNA Plasmids fügten sich dabei in das Virusgenom ein (Coffin, Hughes, & Varmus, 1997). Dem hergestellten Virus fehlten E-*Enhancer* und U3 *Promotor*, es handelte sich also um einen selbst-inaktivierenden Vektor, der keine weiteren Replikationszyklen mehr durchlaufen konnte (Miyoshi, Blömer, Mayaso, Gage, & Verma, 1998). Nach 6 Stunden wurde das Chloroquin-haltige Medium abgesaugt und 10ml DMEM hinzugegeben. Fluoreszenzmikroskopisch konnte die Integration des shRNA Vektors in die HEK Zellen überprüft werden, da es eine Sequenz für tGFP enthält. Die positiv transfizierten Zellen leuchteten grün. (Shimomura, 2005). Von nun an wurden die Viruspartikel nach jeweils 12 und 24 verstrichenen Stunden geerntet. Hierzu wurde das Kulturmedium ab pipettiert, steril filtriert und für die shRNA Vektoren A, B, C, D und Kontrolle bei -80°C gelagert.

3.4.9 Virustransduktion

Am Vortag der Transduktion wurden L3.6pl RES Zellen in zwei 6-Well-Schalen ausgesät. Hierzu wurden pro Well 500µl Zellsuspension mit 4ml Gemcitabin-haltigem Medium aufgefüllt. Am Tag der Virustransduktion wurde zunächst ein Mediumwechsel zu 0,1% Polybrene-haltigem Medium vorgenommen. Polybrene verringert die Abstoßung zwischen Sialinsäuren auf der Zelloberfläche und den Viruspartikeln. Anschließend wurden 500 bzw. 1000µl des Virusüberstandes jedes shRNA Vektors in eine Kavität der 6-Well-Platte pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 2ml Medium in den 6-Well-Schalen resultierte. Die 6-Well-Platten wurden eine Stunde lang bei 2200rpm und Raumtemperatur im Swing-Out-Rotor zentrifugiert um die viralen Partikel auf den Zellrasen zu senken. Die Membranfusion von Virus und Empfängerzelle wird durch die spezifische Bindung von auf der Hülle des Virus lokalisierten Glykoproteinen an Rezeptoren der Epithelzellen ermöglicht. Hierbei binden Oberflächenproteine des Virus an Glykoproteine, Proteoglykane oder Glykolipide auf der Zellmembran. Diese multiplen Bindungen ermöglichen vermutlich eine Umorganisation der Lipidhülle der Wirtszelle und bewirken den endozytotischen Eintritt der Viruspartikel (Bomsel & Alfsen, 2003). In den infizierten Zellen wird die shRNA durch die reverse Transkriptase ins Genom integriert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel zu RPMI 1640, ohne den Zusatz von Gemcitabin, durchgeführt. Die transduzierten Zellen wurden im S2 Zellkulturlabor mehrmals passagiert, ehe sie zur weiteren Analyse in das S1 Labor der Allgemeinchirurgie übernommen wurden. Die Durchführung von Arbeiten mit zuvor infizierten Zellen der

Sicherheitsstufe 1 war nach vorangegangener Dekontamination im S1 Labor zulässig (Bundesamt für Verbraucherschutz, 2011). Die positiv transduzierten Zellen wurden durch die Hinzugabe von Antibiotika in das Zellkulturmedium selektiert. Die erforderliche Konzentration an Puromycin (1,0µg/ml) im Kulturmedium war laborintern bekannt gewesen. Die Zellklone wurden mittels Real-Time-PCR und Western-Blot hinsichtlich der Effizienz der Kynureninase-Depletion verglichen. Hierbei wurde die Effizienz des Knockdowns der verschiedenen shRNA Vektoren verglichen. Es wurde ferner die Menge eingesetzten Virusüberstands bestimmt, mit welcher sich die effizienteste Suppression von Kynureninase erzielen ließ. Obwohl das Protokoll der Transduktion mit Hilfe von Gammaretroviren im Labor von Prof. Dr. Fehse etabliert war, galt es im Rahmen dieser Arbeit die optimalen Bedingungen für einen möglichst effizienten Knockdown der Kynureninase zu finden. Hierfür wurde der Einsatz von verschiedenen Mengen des Virusüberstandes erprobt. Ehe die stabile Transduktion mit 500 bzw. 1000µl Virusüberstand erfolgte, wurden zusätzlich transiente Transduktionen mit geringerer Virusmenge durchgeführt. Diese Vorversuche galten dem Auffinden der idealen Menge des eingesetzten Virusüberstandes, um einen nach Möglichkeit starken Knockdown zu erreichen.

3.4.10 MTT-Assay

Der MTT-Proliferations-Test dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität vitaler Zellen. Grundlage des verwendeten Kits ist die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium durch mitochondriale Dehydrogenasen (Mosmann, 1983). In Anwesenheit des Elektronenüberträgers Phenazine Ethosulfat (PES) entsteht dabei stark orangefarbenes Formazan, dessen Farbintensität photometrisch bestimmt werden kann (Schmitz, 2011). Die Menge des umgesetzten Farbstoffs ist dabei proportional zur Zellzahl in der betreffenden Probe.

Bei diesem *in vitro* Assay wurde den zu untersuchenden Zellen das MTT-Substrat zu verschiedenen Zeitpunkten beigemischt und der eintretende Farbumschlag des Kulturmediums photometrisch bei 490nm gemessen. So konnte das Zellwachstum verschiedener Zelllinien verglichen werden. In vorliegender Arbeit sollte das Wachstum der transfizierten und transduzierten Zellen anhand dieses Proliferationsversuchs mit Wildtyp Zelllinien verglichen werden.

Die zu analysierenden Zellen wurden aus der Zellkulturflasche gelöst und ausgezählt. Anschließend wurden die vereinzelter Zellen verdünnt und zu 5000 Zellen in 200µl Medium

in die Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät. Für jeden Messzeitpunkt wurde eine 96-Well-Platte mit Zellen befüllt. Bis zur Messung wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Messpunkte wurden in 24-stündigen Intervallen gewählt.

Der MTT-Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Medium wurde aus den Kavitäten der 96-Well-Platte entfernt und die Zellen in PBS gewaschen. Den Wells wurde je 20µl des MTT-Substrats, verdünnt in 100µl des betreffenden Kulturmediums, beigemischt. Nach zweistündiger Inkubation im Wärmeschrank wurde die Lichtabsorption des Mediums bei 490nm im Mikroplate-Reader gemessen. Für jede Probe wurden vier Kavitäten ausgesät und gemessen. Der Mittelwert dieser vier Messungen wurde zur Auswertung verwendet. Außerdem wurde der Leerwert des Kulturmediums und des MTT-Substrates bestimmt. Die gemessene Absorption war somit direkt proportional zur Zellaktivität in den betreffenden Kavitäten.

3.4.11 Transwell-Assay

Mit Hilfe des Transwell-Assays wurde die Migration der gentechnisch veränderten Karzinomzellen analysiert. Dabei sollte der Einfluss der unterschiedlichen Kynureninase-Proteinexpression, ansonsten genotypisch identischer Zellen, auf deren Migrationsverhalten untersucht werden. Die Studien zur Zellmigration wurden in dieser Arbeit mit Zweikammersystemen der Firma Corning (Costar Transwell® Permeable Support 8,0µm) durchgeführt. Für diesen Versuch wurde sich die Eigenschaft der Zellen, in ein Nährstoff reicheres Milieu zu migrieren, zu Nutze gemacht. Dabei wurden Zellen definierter Anzahl auf einer Polycarbonat-Membran ausgesät. Während der 24-stündigen Inkubation durchdrangen die Zellen die Poren entlang eines Serumgradienten. Anschließend konnte die Zahl der migrierten Zellen auf der Unterseite des Filters bestimmt, und für verschiedene Zelllinien verglichen werden.

Zunächst wurden die Kavitäten einer 6 Loch Platte mit 2,5ml eines 1% FCS- Kulturmediums befüllt. Zur Äquilibration wurden die Transwell® Einsätze eine Stunde lang in das Medium gelegt. Die zu untersuchenden Zellen wurden aus der Zellkulturschale gelöst und in der Neubauerkammer ausgezählt. Eine definierte Zellzahl wurde in entsprechendem ein Prozent-haltigen Kulturmedium auf 1,5ml verdünnt. Die Transwell® Einsätze wurden angehoben und das Medium in den Kavitäten der 6-Well-Platte gegen entsprechendes 10% FCS-haltiges Kulturmedium getauscht. Auf die Oberseite der Membran wurden 1,5ml der gewünschten Zellsuspension pipettiert. Von den zu vergleichenden Zellen wurden stets gleiche Mengen ausgesät. Für jede Zelllinie erfolgte eine Doppelbestimmung. Das Zweikammersystem wurde

für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C sowie 5% CO₂ bebrütet um die Migration der Zellen durch die 0,8µm großen Poren zu ermöglichen.

Am Folgetag wurde die Anzahl der auf die Unterseite der Membran migrierten Zellen verglichen. Hierzu kamen folgende Methoden zum Einsatz.

3.4.11.1 DAPI-Färbung

Die Transwell® Einsätze wurden für 10min in 0,5ml Paraformaldehydlösung (4%) platziert. Die Unterseite der Einsätze wurde in PBS gewaschen, während alle auf der Oberseite adhären Zellen mit einem Zellstofftuch abgewischt wurden. Die Polycarbonatmembran der Einsätze wurde mit einem Skalpell entfernt. Diese wurde umgekehrt mit Aquatex auf einem Objektträger fixiert. Die Präparate wurden mit DAPI-Mounting-Solution eingedeckt. Die blau leuchtenden Zellkerne wurden am Fluoreszenzmikroskop randomisiert ausgezählt. Dazu wurden die Zellen durch ein 40x vergrößerndes Objektiv betrachtet; es wurden für jedes Präparat mindestens fünf zufällig gewählte Gesichtsfelder begutachtet und deren Zellzahl gemittelt.

3.4.11.2 Calcein-Färbung

Die Migrationseinsätze wurden hierzu in eine neue 6-Well-Platte überführt, in deren Kavitäten zuvor je 2ml Trypsin vorgelegt worden war. Die Platte wurde 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und im Intervall geschüttelt. Die Einsätze wurden verworfen, die Zellsuspension in 2ml Reaktionsgefäße überführt und für 5min bei 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200µl PBS aufgenommen. Dem Gemisch wurden 1µl Calcein (1µg/µl) hinzugegeben. Calcein-Acetoxymethylester wird durch die Zellmembran vitaler Zellen transportiert. Intrazellulär werden die Acetoxymethylgruppen durch zelleigene Esterasen abgespalten. Freies Calcein besitzt die Eigenschaft Calciumionen zu komplexieren und in diesem Zustand grün zu fluoreszieren (Lichtenfels, Biddison, Schulz, Vogt, & Martin, 1994). Die Zellen wurden 30min lang bei 37°C mit Calcein inkubiert, anschließend zweimal in PBS gewaschen und in 100µl PBS aufgenommen. Dieses Volumen wurde in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und dessen Fluoreszenz bei einer Exzitation von 495nm und Emission von 520nm im Microplate-Reader gemessen.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Sämtliche Arbeiten wurden hierbei auf Eis durchgeführt, um einer Proteinolyse vorzubeugen. Zunächst wurden die Zellen einer T₇₅ Zellkulturflasche in Lösung gebracht und in 15ml Reaktionsgefäßen 5min bei 4000rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 350µl RIPA Puffer (*radio immunoprecipitation assay buffer*) gelöst. Das Gemisch wurde mit einem Hundertstel Protease Inhibitor Coctail (PIC) versetzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteinlysate 45min lang bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

3.5.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung von Kulturmedien wurden die Zellen unter gewünschten Bedingungen inkubiert und deren Überstand anschließend in ein konisches 15ml Reaktionsgefäß transferiert. Alsdann wurde das Medium nacheinander mit einem 0,44 und 0,22µm feinen Porenfilter aufgereinigt, um zelluläre Bestandteile zu beseitigen. Mit den Proben wurden Vivaspin® 6ml oder 20ml fassende Ultrafiltrationseinheiten beladen und bei 4000 bzw. 5000g und 4°C, zwischen 5 und 6 Stunden lang, bis zur gewünschten Einengung zentrifugiert. Die eingeeengten Proteine des Zellkulturüberstands (≥ 3000 mwCO) befanden sich oberhalb des Filters und konnten mit der Pipette entnommen werden. Der Proteingehalt der Proben konnte darauf folgend mittels BCA Test (siehe Bestimmung der Proteinkonzentration) bestimmt werden. Die eingeeengten Kulturüberstände wurden bei -20°C konserviert.

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Hierzu wurde ein BCA-Test nach Anleitung des Kits Pierce® Microplate BCA Protein Assay durchgeführt. Es wurden jeweils 5µl des zu quantifizierenden Proteins in zwei Kavitäten einer 96-Well- Platte pipettiert. Das Herstellerkit enthielt zwei BCA-Reagenzien, welche im Verhältnis von 1:50 gemischt wurden. Die Proteinproben wurden mit 200µl des Reagenz versetzt und deren Extinktion bei 562nm nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C im Photometer gemessen. Der messbare Farbumschlag beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst komplexieren Kupfer (II) Ionen in einer Biurethreaktion Proteine in alkalischer Lösung. Kupfer (II) wird zu Kupfer (I) reduziert und bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen rosafarbenen Komplex, welcher photometrisch messbar ist (Smith, et al., 1987). Mithilfe einer Eichgeraden, welche

durch die Messung von Albumin-Proteinlösungen bekannter Konzentration erstellt wurde, konnte die Proteinmenge aus der Extinktion berechnet werden.

3.5.4 Immunpräzipitation

Es wurden Zelllysate aus L3.6pl RES Zellen aus vier annähernd konfluent bewachsenen T75 Zellkulturflaschen und 300µl RIPA-Puffer (+1% Proteaseinhibitor) hergestellt. Das Lysat wurde mehrmals durch eine Nadel auf- und abgesogen. Vorab wurden im Rahmen eines Reinigungsschrittes zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 1000µg Protein und 4µl Maus-IgG (10µg) sowie 100µl Protein A/G Agarose befüllt und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Die Reaktionsgefäße wurden bei 12000g 20s lang zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt. Dieser Schritt diente dem Ausschluss von Proteinbindungen am Maus-IgG Grundgerüst. Den Gemischen wurden nun 6µg Kynureninase-spezifischer Antikörper (Maus) bzw. 6µg Maus-IgG hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden nun eine Stunde lang rotierend bei 4°C inkubiert, um eine spezifische Bindung zwischen dem Antikörper und dem Epitop zu gewährleisten. Nach Hinzugabe von 100µl der Protein A/G Agarose wurde das Gemisch für 4h bei 4°C schwenkend inkubiert, damit die Protein A/G *Beads* an das IgG Grundgerüsten binden konnten. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 10000g 3min lang zentrifugiert um die gebundenen Proteine, einschließlich interagierender Proteine, zu konzentrieren. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 1ml NETN Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweifach wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die *Beads* mit 25µl Lämmli-Puffer versetzt. Die enthaltenen Proteine wurden durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Das Gemisch wurde abermals für 3min bei 10000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Der Versuch wurde mit 3000µg Protein, 20µg Antikörper und 200µl Protein A/G Agarose wiederholt. Zur Vorreinigung wurden 200µl Agarose und 10µg Maus-IgG verwendet.

3.5.5 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden zunächst Gele hergestellt. Die Gele wurden aus einem definierten Gemisch aus Acrylamid (3,3ml), Tris Puffer (2,5ml), H₂O (4ml), 10% SDS (100µl), 10% APS (100µl), und TEMED (20µl) gegossen. Dieses Trenngel enthielt 10% Acrylamid.

Über dieses Trenngel wurde ein 5% Acrylamid-haltiges Sammelgel mit Taschen zur Befüllung der Proben gegossen.

Quervernetztes Polyacrylamid enthält Poren, welche sich zur Separation der Proteine nach ihrer Größe eignen (Raymond & Weintraub, 1959). Polyacrylamid wurde beim Gießen der Gele aus Acrylamid und dem Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) in einer exothermen Reaktion hergestellt. Tetramethylethylendiamin (TEMED) diente als Katalysator. Die Seife SDS band die Proteine und verlieh ihnen eine negative Ladung. Die Menge der negativen Ladungen ist proportional zum gebundenen SDS und damit zur Molekulargröße. Im elektrischen Feld wurden die Proteine in Richtung Anode mobilisiert. Dabei fungiert das quervernetzte Acrylamid als Molekularsieb. Die Proteinkomplexe wurden folgend nach ihrer Ladung und ihrem hydrodynamischen Radius, also dem Molekulargewicht aufgetrennt.

Je 60µg Protein der im BCA-Test gemessenen Proteinproben wurden in separate Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die Proben wurden mit H₂O auf gleiche Volumina aufgefüllt und mit 5µl Laemmli Puffer versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend im Heizblock für 5min auf 95°C erhitzt. Dadurch wurden die Proteine denaturiert und in ihre Primärstrukturen versetzt (Laemmli, 1970). Es folgte die zweiminütige Zentrifugation bei 14000rpm. Die Gelelektrophorese wurde in Laufkammern der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Laufkammer wurde mit Lauf-Puffer befüllt. Die Proteinproben wurden in die Taschen des Gels pipettiert. In die erste Tasche jedes Gels wurden 15µl eines Markers (Precision Plus Protein Standards Dual Color; BioRad, München) pipettiert. Der Marker enthielt gefärbte Proteine bekannter Größen, sodass eine spätere Größenzuordnung der aufgetrennten Proteine ermöglicht war. Danach wurde eine Spannung mit konstanter Stromstärke von 15mA angelegt, welche nach Passage des Sammelgels auf 30mA erhöht wurde.

3.5.6 Western-Blot

3.5.6.1 Proteintransfer

Die Proteine im SDS-Gel wurden nach der Gelelektrophorese auf eine Trägermembran, die Nitrozellulosefolie übertragen. Dies geschah durch Anlegen einer Spannung, welche senkrecht zur Laufrichtung der Proteine stand (Burnette, 1981). Geblottet wurde nach dem Tank-Blot-System.

Hierzu wurden SDS-Gel und eine Nitrozellulosemembran übereinandergelegt und von beiden Seiten mit drei Whatmanpapieren umgeben. Dieser Stapel wurde dabei immer wieder mit Transfer-Buffer benetzt und unter einem Glasstab ausgerollt um störende Luftblasen zwischen

dem Gel und der Nitrozellulosemembran zu entfernen. Die Membranen wurden nun zwischen zwei Schwämmen in die Blotkammer gestellt, welche mit Transfer-Puffer aufgefüllt wurde. Der Kammer wurde ein Rührfisch und ein Kühlelement hinzugefügt um der Wärmeentwicklung beim Proteintransfer vorzubeugen. Die Kammer wurde im Kühlraum bei 4°C auf einem Magnetrührer platziert und es wurden 100V Spannung angelegt. Nach einer Stunde wurde die Nitrozellulosefolie entnommen.

3.5.6.2 Proteinfärbung

Mit dem Azofarbstoff Ponceau S konnten die Proteine auf der Nitrocellulose Membran rot angefärbt werden, ohne die anschließende Immundetektion zu beeinflussen. Ponceau S bindet die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine reversibel und diente der visuellen Kontrolle der übertragenen Proteine. Der Farbstoff wurde im Anschluss mit PBS und 0,1% Tween abgewaschen.

3.5.6.3 Blocken

Vor Hinzugabe der Antikörper wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit entfettetem Milchpulver abgesättigt. Dies diente der Reduktion von nicht Epitop-vermittelten Bindungen des Antikörpers und somit des Hintergrundrauschens bei der späteren Detektion. Hierfür wurden 10g fettfreien Milchpulvers in 200ml TBS-T gelöst. Die Nitrozellulosemembran wurde 60min auf dem Rüttler mit der Milchpulverlösung inkubiert.

3.5.6.4 Immundetektion

Das geblottete Protein wurde mit den Primärantikörpern (Human Kynureninase MAb (Clone 589731) und Anti-L-Kynurenine Hydrolase antibody (ab96365)) detektiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C im Kühlraum mit der Antikörperlösung inkubiert. Die Antikörper wurden in 5% Milchpulversuspension gelöst (1:500 für Clone 589731; 1:1000 für (ab96365)). Am Folgetag schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit TBS-T an. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre, mit Peroxidase markierte Antikörper (anti-HRP-Antikörper gegen Maus oder Kaninchen) ließ die spätere Detektion zu (Ogata, Arakawa, Kasahara, Shioiri-Nakano, & Hiraoka, 1983). Im Anschluss wurde die Membran viermal jeweils 15min lang mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

3.5.6.5 Detektion

Die Membran wurde je nach Art des Antikörpers und der Proteinmenge entweder mit Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate oder mit Pierce® ECL Western Blotting

Substrat benetzt. Nach einer einminütigen Inkubationszeit wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien verpackt und in einer Röntgenfilmkassette fixiert. Die Western Blot Substrate enthielten Luminol, dessen Oxidation vom Peroxidase markierten Antikörper katalysiert wurde. Diese Reaktion löste eine Lumineszenz aus. In einer Dunkelkammer wurden nun Röntgenfilme in die Filmkassette gelegt. Die Belichtungszeit dauerte zwischen einer Sekunde und 30min und richtete sich nach der Signalstärke der markierten Proteine. Die Röntgenfilme wurden anschließend im AGFA Curix 60 entwickelt.

3.5.7 Ionenfallen-Massenspektrometrie

Die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen zur Identifizierung der mittels Immunpräzipitation angereicherten Proteine erfolgte in Kooperation mit dem Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin durch Sönke Harder. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Proteinbanden in 1mm² fassende Stücke zerkleinert. Es folgten Waschungen mit 100mM NH₄HCO₃ Puffer (12min), Acetonitril (12min), Dithiothreitol 30-40min, 57°C, Acetonitril (12min), Iodacetamid (30-40min im Dunklen), Acetonitril (12min), NH₄HCO₃ Puffer (12min), Acetonitril (12min), NH₄HCO₃ Puffer (12min), Acetonitril (12min), wobei jeweils der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurden die Proben mit Trypsinlösung (8ng/μl in 50mM NH₄HCO₃ Puffer) benetzt und bei 4°C 40min lang inkubiert. Die Proben wurden zweimalig mit 50mM NH₄HCO₃ Puffer gewaschen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin gesammelt. Insgesamt dreimalig wurden die Proben abwechselnd mit Extraktionspuffer (30min) und Reinstwasser (20min) inkubiert und die Überstände gesammelt. Alle Überstände wurden getrocknet. Die Proben wurden anschließend in 0,1% Ameisensäure aufgenommen und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie über eine C18-Säule aufgetrennt und ins Massenspektrometer gesprüht. Die Messung der enthaltenen Peptide erfolgte mittels Ionenfallen-Massenspektrometrie (Orbitrap Fusion Tribrid, Thermo Scientific). Mit Hilfe der Proteomdiscoverer-Software (Thermo Scientific), wurde eine Trefferliste nach spezifischen Peptiden, Deckung, und Zahl der Peptide erstellt.

3.5.8 Zellfraktionierung

Mit Hilfe des Subcellular Protein Fractionation Kits, konnten Proteinlysate entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Zellkompartimenten aufgetrennt werden. Dabei wurde das totale Zelllysat in die Einheiten cytosolische Extraktion (CE), membranöse Extraktion (ME), nukleäre Extraktion (NE), Chromatin bindende Extraktion (CBNE) und cytoskeletale Extraktion (CSE) fraktioniert.

Als Ausgang für die Zellfraktionierung dienten aus T₇₅ Zellkulturflaschen gewonnene Zellpellets der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES. Die Pellets wurden mit 1000µl CEB Puffer (Kit) + 10µl PIC versetzt, gemischt und für 10min bei 4°C inkubiert. Der Überstand nach fünfminütiger Zentrifugation bei 500g enthielt die CE-Fraktion. Zur Gewinnung der membranösen Fraktion wurde das Pellet mit 1000µl MEB Puffer (Kit) + 10µl des Protease-Inhibitors vermengt, 5sec auf dem Vortexer durchmischt und für 5min bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die ME-Fraktion. Hiernach wurde dem Pellet 500µl NEB (Kit) + 5µl des Protease-Inhibitors beigelegt. Die Suspension wurde wiederum für 15sec mit Hilfe des Vortexers durchmischt und anschließend für 30min leicht schüttelnd bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) entsprach der Überstand der NE-Fraktion. Zum Gewinnen der CBNE-Fraktion wurde dem Pellet ein Puffergemisch (500µl NEB + 25µl CaCl₂ + 15µl *Micrococcal Nuclease*) beigegeben. Dieses wurde 15sec lang auf dem Vortexer gemischt, 15min bei Raumtemperatur verwahrt, und nochmals mittels Vortexer vermengt. Die fünfminütige Zentrifugation bei 16000g lieferte die CBNE-Fraktion als Überstand. Um die letzte Zellfraktion zu isolieren, wurden dem Pellet 500µl des PEB Puffers (Kit) zusammen mit 5µl des Proteaseinhibitors beigelegt. Das Gemisch wurde für 15sec auf dem Vortexer gemischt, für 10min bei Raumtemperatur inkubiert und 5min lang bei 16000g zentrifugiert. Als Überstand entstand die CSE-Fraktion. Um die Proteinproben stärker zu konzentrieren, wurden diese mit Hilfe der VivaSpin[®]-Filtereinheiten auf ein Fünftel der Ausgangsvolumina eingeeengt (siehe Gewinnung von Zellkulturüberständen). Der Proteingehalt der Proben wurde anschließend quantifiziert (siehe Bestimmung der Proteinkonzentration), um die weitere Analyse mittels proteinbiochemischer Methoden (siehe SDS-Gelelektrophorese oder Protein Deglykosylierung) zu gewähren.

3.5.9 Protein Deglykosylierung

Um eine mögliche Glykosylierung der Kynureninase festzustellen, wurden Zelllysate nach deren Fraktionierung (siehe Zellfraktionierung) mit einem Deglykosylierungs-Enzym-Mix enzymatisch verdaut. Die verdauten Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe SDS-Gelelektrophorese) analysiert und mit unverdauten Proben verglichen.

Das Verfahren wurde mit einem Kit (Protein Deglycosylation Mix) des Herstellers New England BioLabs durchgeführt. Zunächst wurden die Proteinproben denaturiert, damit diese in Primärstruktur vorlagen und den Enzymen zugänglich waren. Dazu wurden 30µg der Proteinprobe und 1,5µl des Denaturierungspuffers vermengt und mit H₂O auf ein Zielvolumen von 15µl verdünnt. Die Proben wurden 10min lang bei 100°C erhitzt, 10sec auf Eis gekühlt und

für 10sec bei 14000g zentrifugiert. Jeder Probe wurden 2,5µl G7-Buffer, 2,5µl NP 40 und 2,5µl des Enzymmix zugefügt; alle Reagentien waren im Herstellerkit enthalten. Das Gemisch wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und im Intervall geschüttelt. Der Deglykosylierungs-Mix enthielt folgende rekombinanten Enzyme: O-Glykosidase, PNGase F, Neuraminidase, β 1-4 Galaktosidase und β -N-Acetylglukosaminidase. Diese Enzyme katalysierten die Abspaltung verschiedener Glykoside eines Glykoproteins.

3.6 Histologische Methoden

3.6.1 Immunhistochemie

In vorliegender Arbeit wurde die Avidin-Biotin (ABC-) Methode verwendet. Grundlage ist die Verwendung folgender Reagenzien nacheinander: Primärantikörper, biotinylierter Sekundärantikörper, Avidin-Enzymkomplex, Chromogen-Substrat.

3.6.1.1 Histologisches Material

Für die histologischen Studien dieser Arbeit wurden Gewebe der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf verwendet. Bei den verwendeten Gewebeproben handelt es sich um durch einen Pathologen begutachtete OP-Präparate der Jahre 1998 bis 2013. Es wurden ausschließlich kryokonservierte Operationspräparate verwendet. 24 der 30 Proben entstammten aus am Pankreaskarzinom erkrankten Patienten, 4 Proben enthielten gutartiges Pankreasparenchym, eine Probe enthielt Gewebe eines Papillenkarcinoms und eine Probe enthielt Gewebe einer akuten Pankreatitis.

3.6.1.2 Anfertigen von Gewebeschnitten am Kryotom

Bei den Arbeiten am Kryotom wurde die Betriebstemperatur konstant auf -20°C gehalten. Mit Hilfe eines Kugelgelenkes, einer Höhenverstellung und des Grobtrimms wurde der Gewebeblock unter dem Messer plan adjustiert. Zum Schneiden wurde der Feintrimm verwendet; es wurden Kryoschnitte von 7µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Objektträger aufgenommen und weiterhin bei -20°C aufbewahrt.

3.6.1.3 Etablierung von Färbeprotokollen für Kynureninase

Da bislang keine Informationen über die Expression der Kynureninase im Pankreaskarzinom vorlagen, galt es in dieser Untersuchung ein Protokoll für eine histologische Färbung der Kynureninase zu etablieren. Die Immunfärbung der histologischen Präparate erfolgt mit dem Cell&Tissue Staining Kit der Firma R&D. Hierbei fand die Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

(ABC-) Methode Verwendung (Bayer, Skutelsky, & Wilchek, 1979). Als Primärantikörper wurde Human Kynureninase MAb (Clone 589731) der Firma R&D in den Verdünnungen 1:50, 1:100 und 1:300 erprobt. Bei allen Färbungen wurden Negativkontrollen mit Mouse IgG1 (MoPC-21) mitgeführt um unspezifische Anfärbungen auszuschließen. Eine kontrastreiche und spezifische Färbung war mit einer 1:100 Konzentration zu erzielen.

3.6.1.4 Färbeprotokoll Kynureninase

Die Immunfärbung der Kryoschnitte wurde nach Anleitung des Herstellerkits Cell&Tissue Staining Kit der Firma R&D durchgeführt. Zunächst wurden die Präparate 3min lang in Aceton fixiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-T folgte die fünfminütige Inkubation mit *Peroxidase Blocking Reagent*. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und für 15min mit dem *Serum Blocking Reagent* benetzt. Es folgte ein 15-minütiger Reaktionsschritt im *Avidin Blocking Reagent*. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte für 15min im *Biotin Blocking Reagent* inkubiert. Es folgte abermals ein Waschschriff und die Einwirkung des Primärantikörpers über Nacht. Dieser war vorher in gewünschter Konzentration in *Antibody Diluent* gelöst worden. Am Folgetag wurde der Primärantikörper mit TBS-T abgewaschen, der biotinylierte sekundäre Antikörper aufgetragen und für 45min auf den Objektträgern belassen. Es folgten ein Waschschriff sowie die 30 minütige Inkubation in HSS-HRP (*Horseradish Peroxidase*). Nach einem letzten Waschschriff wurde ein Gemisch aus AEC Chromogen und Chromogen Puffer (1 Tropfen auf 2ml) hergestellt und die Präparate hiermit für etwa 5min bis zur beginnenden Rotfärbung benetzt. Die Reaktion wurde in ddH₂O gestoppt und eine Gegenfärbung in Mayers Hämatoxylin durchgeführt. Die Präparate wurden 3min lang in Leitungswasser gebläut und in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckt.

3.6.1.5 Histologische Auswertung

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Mitarbeiter des Forschungslabors der Allgemeinchirurgie. Dabei wurde die Farbintensität der Präparate sowie der Anteil positiv angefärbter Zellen begutachtet. Die Einteilung erfolgte in den Abstufungen negativ, schwach, moderat und stark. Ein Präparat wurde mit schwach bewertet, sofern weniger als 70% der Zellen eine starke, oder weniger als 30% der Zellen eine moderate Anfärbung aufwiesen. Moderat eingeordnete Präparate enthielten mindestens 70% schwach angefärbte Zellen, oder 30-70% moderat angefärbte Zellen, oder eine starke Färbung bei maximal 30% der Zellen. Für das Kriterium stark war eine moderate Farbintensität bei mindestens 70% der

Zellen, oder eine starke Intensität bei mindestens 30% der Zellen erforderlich. Für jedes Präparat wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen beider Gutachter gebildet.

3.6.2 Immunzytochemie

Zunächst wurden die Böden einer sterilen Sechs-Loch Platte mit autoklavierten, runden Deckgläschen bedeckt. In diese Kavitäten wurden die zu untersuchenden Zellen zusammen mit einem ml Kulturmedium ausgesät. Nach Erreichen der 50- bis 70- prozentigen Konfluenz der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt. Der Zellrasen wurde durch die Hinzugabe von Formaldehyd (4%) (10 min Inkubation) auf den Deckgläschen fixiert. Anschließend wurden die Kavitäten der Zellkulturplatte 5- bis 6-fach mit PBS gespült. Es folgte die einstündige Inkubation in einem Ansatz aus 1% BSA und 1% Triton® in PBS (300µl/Well). Triton® enthält Octoxinol 9 welches als Detergenz Zellmembranproteine aus ihrem Verband löst und somit die Kontinuität der Zellmembranen aufhebt. BSA sättigt vor der anschließenden Antikörperinkubation unspezifische Bindungsdomänen zellulärer Proteine ab. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers (1:500 in 0,1 % BSA/PBS) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am Folgetag wurden die Proben 10-fach mit PBS gewaschen, ehe der zweite, fluoreszierende Antikörper (Alexa Fluor® 1:1000m in 0,1 %BSA/PBS) für eine Stunde lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubierte. Die Zellen wurden abermals 10-malig mit PBS gewaschen und mit DAPI-Mountingsolution benetzt umgekehrt auf einem Objektträger platziert. Die Ränder der Deckgläschen wurden mit Nagellack überzogen um die Austrocknung der Proben zu vermeiden. Die Proben konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.6.3 Konfokale Laser Mikroskopie

Ausgewählte Präparate wurden am konfokalen Laser Mikroskop abfotografiert. Das System Leica SP5 wurde mit Hilfe der Software Leica LAS bedient. Die Präparate wurden unter dem Ölimmersionsobjektiv (63x 1.40) betrachtet. Dazu wurde der auf den Präparaten gebundene fluoreszierende Antikörper mit einem Argon Laser bei 488nm angeregt.

3.7 Auswertung

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit sind als Mittelwerte (MV, *mean value*) $\pm$ Standardabweichung (SD) des Mittelwertes einer bestimmten Anzahl (n) von Experimenten

angegeben. Zur Berechnung wurde das Programm Excel (Office 2013, Microsoft, Washington, USA) verwendet.

Der Vergleich der Daten zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe erfolgte mit Hilfe des T-Tests. Hierbei wurde der T-Test von Graphpad (Graphpad Inc., California, USA) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p > 0,05$) in zweiseitigen Tests gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Differentielle Kynureninase-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien

Vor Beginn vorliegender Doktorarbeit wurde die Kynureninase durch Dr. Cenap Güngör in einem SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Experiment nachgewiesen. Hierbei wurden die Medien der Zelllinien L3.6pl WT und L3.6pl RES mit Isotopen-markierten Aminosäuren versetzt, welche kontinuierlich ins Proteom eingebaut wurden. Die Isotope unterschieden sich für beide Linien in ihrem Elementargewicht. Anschließend wurden die Kulturüberstände entnommen, und einer massenspektrometrischen Messung in der UKE-internen *Core-Facility* unterzogen. Hierbei wurden Proteine identifiziert, welche unterschiedlich stark in das Kulturmedium der beiden Zelllinien sezerniert worden waren. Unter diesen Proteinen befand sich unter anderem Kynureninase. Da die chemotherapieresistente Zelllinie L3.6pl RES aus L3.6pl WT Zellen selektiert worden war (Güngör, et al., 2011), ist die Beteiligung der im SILAC Experiment nachgewiesenen Proteine an Resistenzmechanismen gegen Chemotherapeutika möglich.

Zunächst wurde die Kynureninase-Protein- und Genexpression in den Karzinomzellen L3.6pl WT und RES, sowie in der Referenzlinie benignen Ursprungs, HPDE, bestimmt. Auch weitere Zelllinien aus Pankreaskarzinomen, darunter Panc-1, Panc-2, BxPC3, MiaPaca, und die primären Pankreaskarzinomlinien PaCa 5061, PaCa 5072, PaCa 5156 wurden auf ihre Kynureninase-Expression hin überprüft.

In Abb. 4.1.1 findet sich ein Western-Blot aus Zelllysaten verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien. Auf Proteinebene war in der zur Referenz hinzugezogenen Linie HPDE keine Detektion der Kynureninase möglich. Die Zelllinie L3.6pl WT offenbarte eine prägnante Kynureninase-Proteinexpression. Diese war in der chemoresistenten L3.6pl RES Zelllinie nochmals deutlich gesteigert. Der Western-Blot zeigte für die Zelllinien Panc-1, Panc-2 und PaCa 5156 keine Proteinexpression von Kynureninase. In den Zelllinien BxPC3, PaCa 5061 und PaCa 5072 war die Kynureninase-Proteinexpression ebenfalls nachweisbar. Die höchst metastasogene, primäre Linie PaCa 5061 überstieg in ihrer Kynureninase Menge die Zelllinie L3.6pl RES. Insgesamt offenbarten vier von sieben Pankreaskarzinomlinien eine auf

Proteinebene auffindbare robuste Proteinexpression der Kynureninase.

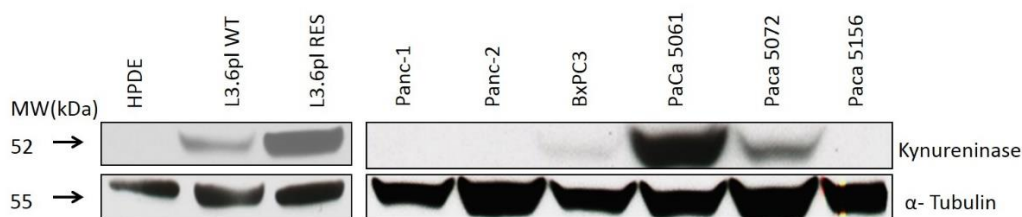


Abb. 4.1.1 Western-Blot der Kynureninase-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien.

SDS-Gelelektrophorese von Proteinextrakten. Der Western-Blot wurde mit spezifischen Antisera gegen Kynureninase und α -Tubulin (Ladekontrolle) hybridisiert.

Abb. 4.1.2 zeigt die Genexpression der Kynureninase in verschiedenen Pankreaskarzinomlinien. Aus den aufgeführten Zelllinien wurde mRNA isoliert und mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse deckten sich mit den zuvor auf Proteinebene gemessenen Expressionsverhältnissen. Die Expressionsanalyse auf mRNA Ebene bezeugte die Kynureninase-Überexpression der Zelllinie L3.6pl RES. Die Menge an für Kynureninase-kodierender mRNA war im Vergleich zur L3.6pl WT Linie leicht erhöht und im Vergleich zur Linie HPDE um den Faktor 16,51 größer.

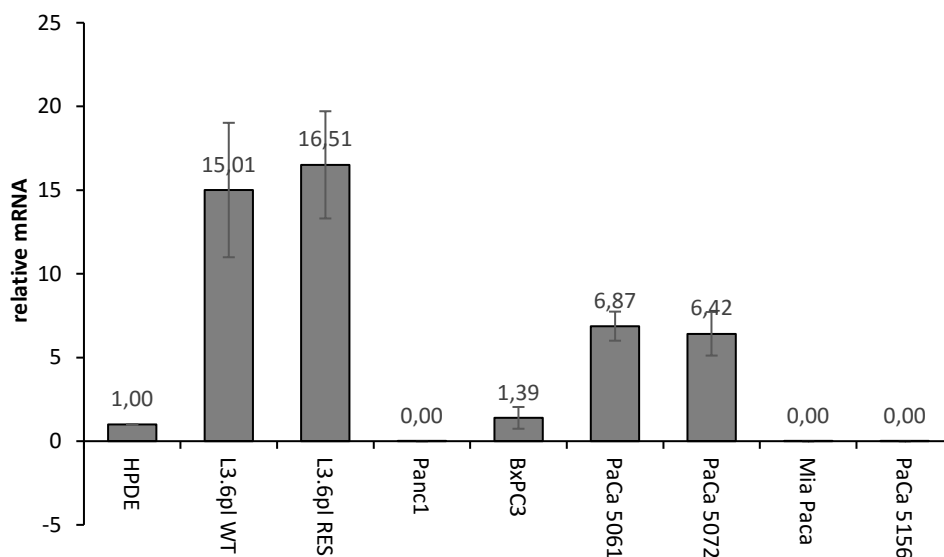


Abb. 4.1.2 Real-Time-PCR Daten der Kynureninase-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien.

Säulendiagramm der vergleichbaren mRNA Mengen mit HPDE als Referenzmenge. Die Amplifikation wurde mit Kynureninase-spezifischen Primern durchgeführt. Die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen wurden auf GAPDH Mittelwerte normiert. Der Versuch wurde mit einem weiteren unabhängigen Primerpaar für Kynureninase reproduziert (Daten nicht gezeigt). Die gezeigten Daten entstammen drei Versuchen. Die Linie HPDE wurde jeweils als Referenz mit den

Zelllinien L3.6pl WT und L3.6pl RES, bzw. mit den übrigen Zelllinien gemessen. Die Daten stellen die auf die Expression der Linie HPDE normierten Werte dar.

4.2 Kynureninase-Expression in humanem Pankreaskarzinomgewebe

Um einen Einblick in die Kynureninase-Expression in humanem Karzinom- und Normalgewebe zu gewinnen, wurde die immunhistochemische Färbung der Kynureninase an Gewebeschnitten durchgeführt. Das histologische Material stammt aus der Tumorbank der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf. Für die Auswertung wurden 34 Operationsresektate verwendet, davon 25 Gewebeschnitte aus Pankreaskarzinomen, 3 aus Papillenkarcinomen, sowie 6 aus gutartigem Pankreasgewebe. Die Dignität der Gewebsschnitte war vor dem Einschluss in die Tumorbank durch einen Pathologen gesichert worden.

Eine Übersicht über die Färbereignisse zeigt Abb. 4.2.1. Das Färbeprodukt der Kynureninase stellt sich braun dar. Zusätzlich wurde eine Hämalalaun Färbung durchgeführt. Sowohl im Karzinom- als auch im Normalgewebe war Kynureninase prädominant im Zytoplasma der Epithelzellen angefärbt. Zusätzlich war bei einigen Zellen eine nukleäre Lokalisation des Enzyms prominent.

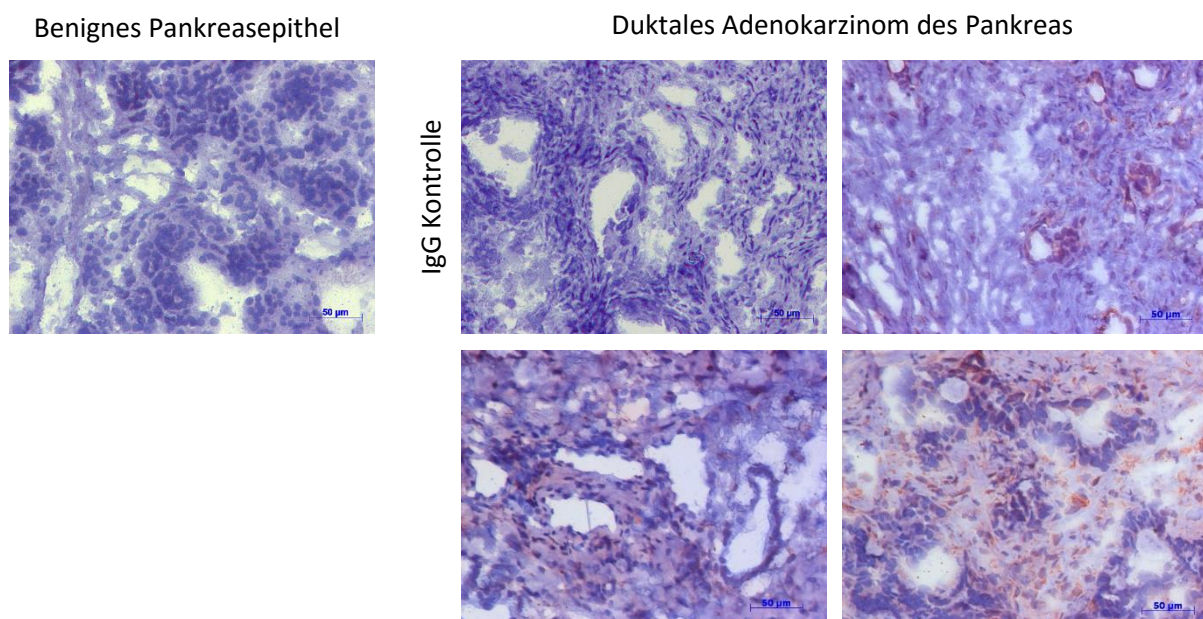


Abb. 4.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Kynureninase in Pankreaskarzinomgewebe.

Gefärbte Zellen stellen sich braun dar. Oben links ist ein Gewebeschnitt aus benignem Pankreasepithel dargestellt. Des Weiteren sind ein schwach (oben rechts), moderat (unten links) und stark (unten rechts) Kynureninase-positives Pankreaskarzinom abgebildet. Oben Links ist eine mit Kynureninase-spezifischem Antikörper angefertigte Negativkontrolle abgebildet. 200x Vergrößerung.

Subjektiv fiel eine stärkere Immunfärbung der Kynureninase im Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zum benignen Normalgewebe auf. Vor allem war dies bei der Betrachtung korrespondierender Proben des gleichen Patienten der Fall. Für die quantitative histologische Auswertung wurden die Präparate durch zwei unabhängige Mitarbeiter des Labors begutachtet und deren Ergebnisse gemittelt. Insgesamt war auch im immunhistochemisch gefärbten Patientengewebe eine heterogene Expression der Kynureninase in Pankreaskarzinomen unterschiedlicher Herkunft ersichtlich. Die Auswertung ist in Tab. 4.2.1 und Tab. 4.2.1 in tabellarischer bzw. graphischer Form dargestellt. Die meisten der untersuchten Pankreaskarzinome (n=25) wiesen eine moderate Anfärbung der Kynureninase auf (50% aller Pankreaskarzinome). In der Gruppe der Pankreaskarzinomproben befanden sich ein Kynureninase-negatives Präparat (4%), 8 schwach Kynureninase-positiv (31%) sowie 4 stark Kynureninase-positiv Präparate. Unter den gutartigem Pankreasgewebe entstammenden Präparaten (n=6) wiesen die Mehrzahl von 4 Proben (67%) eine schwache Immunfärbung mit Kynureninase auf. Jeweils ein Präparat dieser Gruppe war moderat bzw. stark angefärbt. Die drei untersuchten Papillenkarzinome zeigten in zwei Fällen eine moderate und in einem Fall eine starke Expression der Kynureninase. Damit konnte eine im Vergleich zum Normalgewebe durchschnittlich erhöhte Expression der Kynureninase im Tumorgewebe des Pankreas nachgewiesen werden.

Kynureninase Immunfärbung in (%)					
	n	negativ	schwach	Moderat	stark
Pankreaskarzinom	25	1 (4%)	8 (31%)	12 (50%)	4 (19%)
Papillenkarzinom	3	0	0	2 (67%)	1 (33%)
Normalgewebe	6	0	4 (67%)	1 (17%)	1 (17%)

Tab. 4.2.1 Kynureninase-Expression in Patientengeweben.

Aufführung der Art und Anzahl der untersuchten Gewebeproben; Auflistung der Anzahl Kynureninase-negativer, sowie schwach, moderat und stark positiver Präparate.

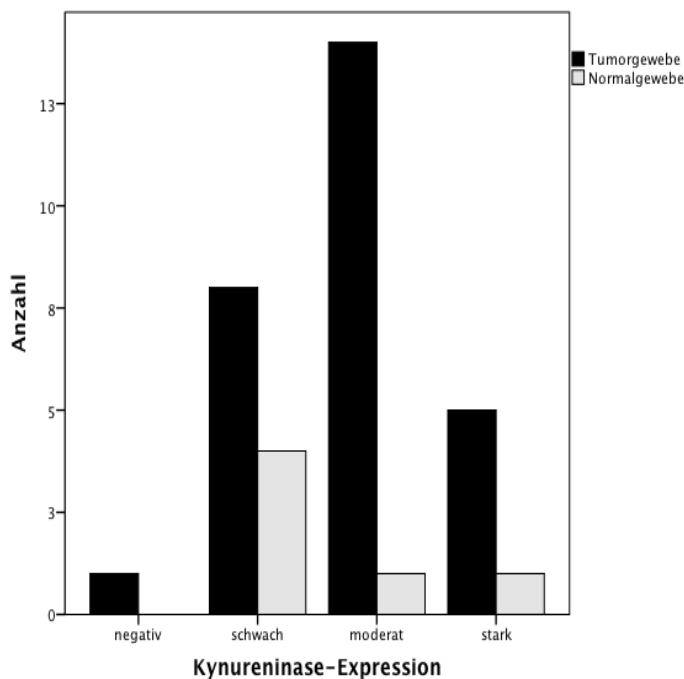


Abb. 4.2.2 Graphische Darstellung der Kynureninase-Expression in Patientengewebeschnitten.

4.3 Intrazelluläre Lokalisation der Kynureninase

Eine Literaturrecherche bezüglich der Lokalisation von Kynureninase und deren potentieller Funktion im Pankreaskarzinom blieb erfolglos. Als Stoffwechselenzym lag dessen Vorkommen im Zytosol nahe. Für die genaue Ortung der Kynureninase wurden die kultivierten Pankreaskarzinomzellen fixiert und das Protein mittels Zytochemie markiert. Die am konfokalen Mikroskop dokumentierten Aufnahmen, siehe Abb. 4.3.1, deckten eine Kernlokalisierung der Kynureninase in allen untersuchten Zelllinien auf. In den Aufnahmen der Linie HPDE waren intensiv grün leuchtende, gut abgrenzbare Punkte rund um den Zellkern auffindbar. Diese imponierten ebenfalls in den Kontrollaufnahmen und waren laborintern als Eigenfluoreszenzen der Linie HPDE bekannt. Somit fand sich in diesem benignen Zelltyp ein geringes Vorkommen von Kynureninase im Nukleus. Die L3.6pl WT Linie wies eine Anfärbung des Zellkerns mit Kynureninase-spezifischem Antikörper auf. Im Falle der L3.6pl RES Karzinomlinie konzentriert sich der tief grün angefärbte Bereich nochmals stärker auf den Zellkernbereich. Darüber hinaus waren stark fluoreszierende, sich ins Cytoplasma erstreckende Bereiche sichtbar. Insgesamt imponierte hier eine ausgeprägtere Färbung. Mit Hilfe einer Datenbank für Proteinbindedomänen (www.elm.eu.org) fanden sich drei potentielle NLS- (Kernlokalisierungssignal-) Domänen innerhalb der humanen Kynureninase-Proteinsequenz.

Diese befinden sich an den Positionen 151-158, 153-158 und 355-362 der Proteinsequenz und deuten auf eine mögliche Kernlokalisation der Kynureninase hin.

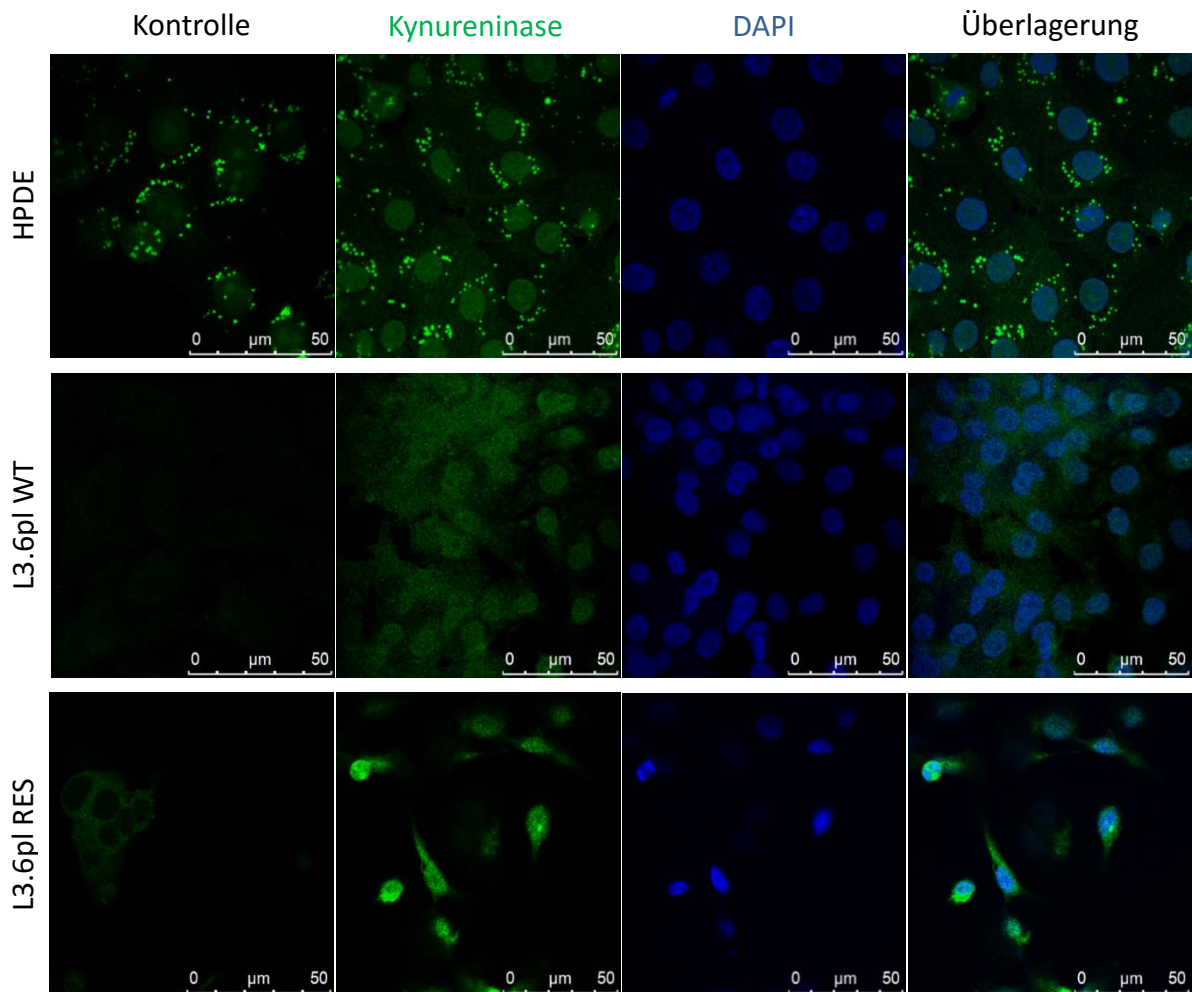


Abb. 4.3.1 **Immunzytochemische Darstellung von Kynureninase in den Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.**

Kynureninase (grün) wurde mit einem Kynureninase-Epitop bindenden Antikörper markiert. Die Fluoreszenzsignale des Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers (Alexa-488) wurden mittels konfokaler Mikroskopie detektiert und dokumentiert. Die Kerne der Zellen (blau) sind mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gegengefärbt.

Zur weiteren Analyse der intrazellulären Lokalisation der Kynureninase wurden Zelllysate der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES gewonnen, welche anschließend nach ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Zellfraktionen aufgetrennt wurden. Dabei entstanden die Fraktionen Zytoplasmatischer Extrakt (CE), Membranöser Extrakt (ME), Nukleärer Extrakt (NE), Chromatin bindender nukleärer Extrakt (CBNE) und Zytoskelett assoziierter Extrakt (CSE). Diese Methode offenbarte ein starkes Vorkommen der Kynureninase im Zytoplasma der Linie L3.6pl RES. Im Zytoplasma der Linie L3.6pl WT war Kynureninase schwächer detektierbar, in der HPDE Linie hingegen nicht. Zusätzlich waren auf dem Western-Blot

Banden in den Kernfraktionen aller Linien auf einer Höhe von rund 100kDa vorhanden. Dies spricht für eine Kernlokalisierung der Kynureninase. Diese vorgefundene Größe des Proteins war für Kynureninase oder eine ihrer Isoformen jedoch nicht beschrieben. In Anbetracht der genau doppelt so groß wie erwartet vorgefunden Proteinmasse, wäre das Vorliegen eines Proteindimers der Kynureninase, ansonsten einer posttranslational modifizierten Form wahrscheinlich. Bekannt war das Vorhandensein von Kynureninase in purifizierter Form als Homodimer. (Walsh & Botting, 2002).

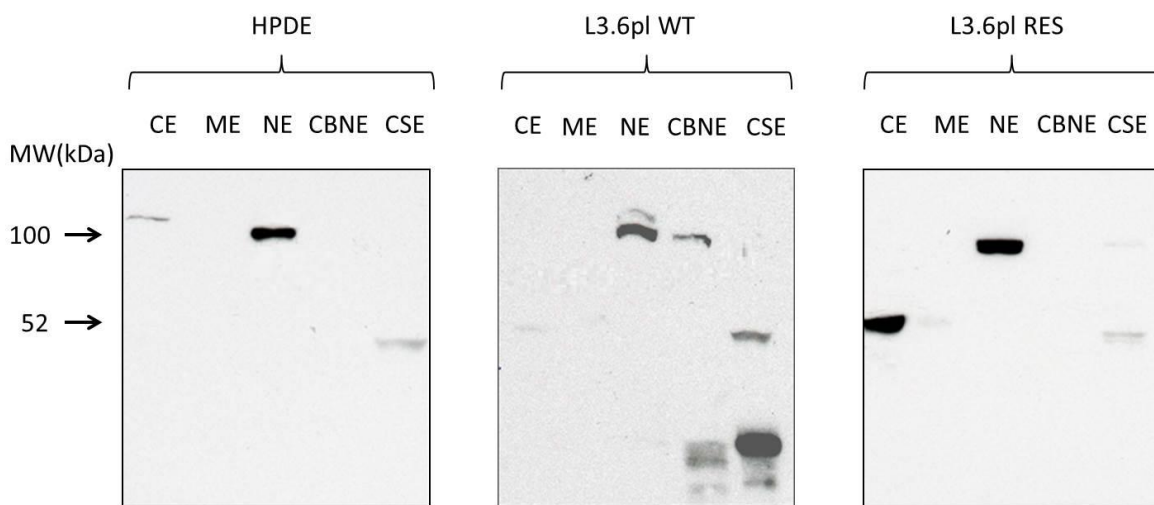


Abb. 4.3.2 Zellfraktionierung aus Proteinlysaten der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.

Western-Blot der Proteinfractionen. Die Fraktionen wurden mit einem Kit (Subcellular Protein Fraction Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific) separiert. Der Western-Blot wurde mit Kynureninase-spezifischem Antiserum inkubiert. CE: Zytoplasmatischer Extrakt, ME: Membranöser Extrakt, NE: Nukleärer Extrakt, CBNE: Chromatin bindender nukleärer Extrakt, CSE: Zytoskelett assoziierter Extrakt.

Um eine posttranslationale Glykosylierung als möglichen Grund für die Größenzunahme der Proteinbanden zu untersuchen, wurden die fraktionierten Proteinextrakte einem Deglykosylierungs-Verdau zugeführt. Die verdauten Proteinproben wurden erneut mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert, siehe Abb. 4.3.3. Erkenntlich war ein Unterschied der verdauten und unverdauten Proteine in den zytoplasmatischen Fraktion aller Linien. Es fand sich eine vermeintliche Größenzunahme des Proteins in der Spur L3.6pl RES Deglyc.. Auch in der Membranfraktion waren nach stattgefundener Deglykosylierung Veränderungen der Banden festzustellen. In der Kernfraktion waren keine Größenänderungen der Proteinbanden sichtbar. Dies schloss die posttranslationale Glykosylierung als Grund für die Größenzunahme der Kynureninase in der Kernfraktion aus.

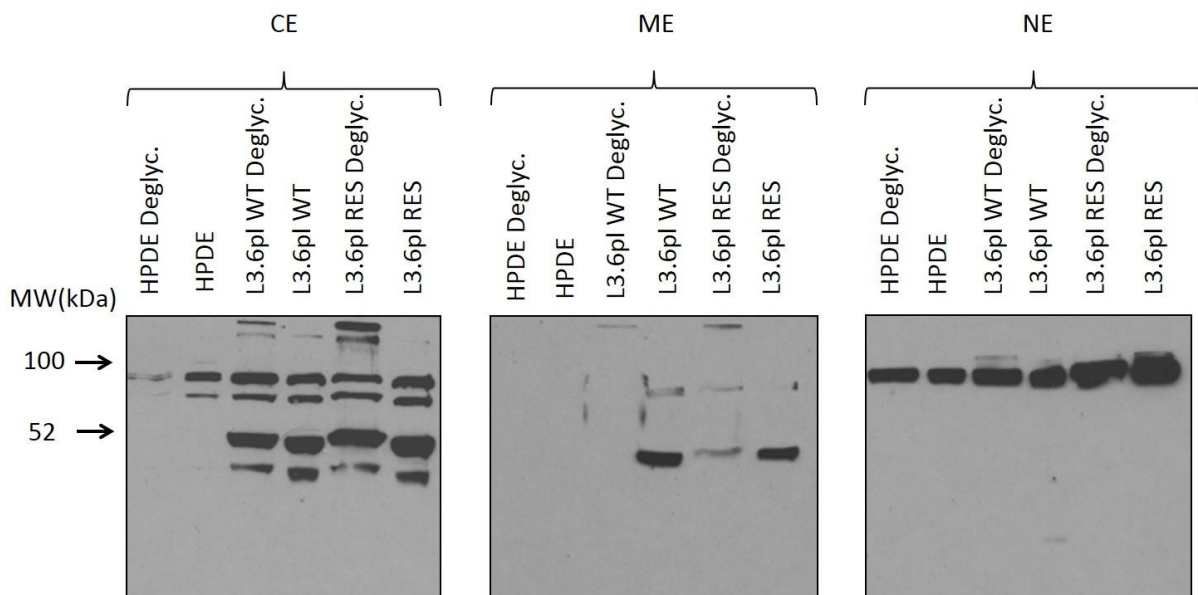


Abb. 4.3.3 Deglykosylierung der Zellfraktionen der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.

Western-Blot der verdauten und unverdauten Proteine der Fraktionierung. Verwendet wurde ein Protein Deglykosylierungs-Mix des Herstellers New England BioLabs. Enthaltene Enzyme: O-Glykosidase, PNGase F, Neuraminidase, β 1-4 Galaktosidase und β -N-Acetylglukosaminidase. CE: zytoplasmatischer Extrakt, ME: Membranöser Extrakt, NE: Nukleärer Extrakt.

4.4 Sekretion der Kynureninase in den extrazellulären Raum

Kynureninase war in Vorarbeiten zu dieser Arbeit im Medium der chemotherapieresistenten Zelllinie L3.6pl RES vermehrt nachgewiesen worden. Um dies zu bestätigen, wurde die Kynureninase-Sekretion der Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES verglichen. Hierzu wurde das Kulturmedium nach 24-stündiger Inkubation gewonnen und mittels Ultrafiltration eingengt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot analysiert. Abb. 4.4.1 bildet die Detektion der Kynureninase im Zellkulturmedium der verschiedenen Zelllinien ab. In der Proteinspur der Linie HPDE war kein Signal der Kynureninase nachweisbar. In den Proben der Linie L3.6pl WT war Kynureninase mittels Western-Blot im Medium schwach nachweisbar. Die Kynureninase-Sekretion durch L3.6pl WT wurde durch L3.6pl RES deutlich übertroffen. Hier waren intensive Signale der Kynureninase in der Proteinspur detektierbar. Damit wurde die stärkere Kynureninase-Sekretion der chemotherapieresistenten Linie L3.6pl RES im Vergleich zur Ursprungslinie gezeigt. Es war keine Kynureninase-Sekretion der Referenzzelllinie benigner Dignität nachzuweisen. Die Ergebnisse deckten sich mit den intrazellulär nachgewiesenen Kynureninase-Proteinmengen (Abb. 4.1.1).

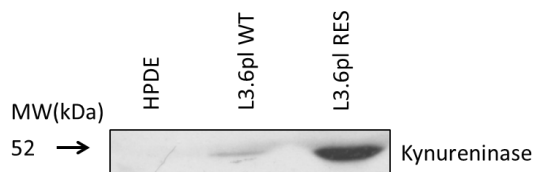


Abb. 4.4.1 **Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium.**

SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot der eingegengten Zellkulturüberstände (150µg Protein) der Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES. Der Western-Blot wurde mit spezifischem Antiserum gegen Kynureninase hybridisiert.

4.5 Die Hemmung der Kynureninase-Expression beeinträchtigt die Zellproliferation von Pankreaskarzinomzellen

Um nach ersten Erkenntnissen zur Expression und Lokalisation der Kynureninase auch funktionelle Aspekte des Proteins im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom zu untersuchen, wurde dessen Expression mittels RNA-Interferenz in der Linie L3.6pl RES herunterreguliert. Die entsprechenden shRNA-Plasmide wurden unter Hinzunahme retroviraler Vektoren in das Genom der Zielzellen transduziert. Die Transduktion erfolgte mit fünf shRNA Vektoren der Firma Origene, einschließlich eines Kontroll-Vektors. Es waren pro Vektor 500 bzw. 1000µl Virusüberstand zur stabilen Transduktion eingesetzt worden. Vor der stabilen Transduktion waren Vorversuche mit transienten Transduktionen durchgeführt worden. Es waren dort auch niedrigere Mengen an eingesetztem Virusmedium (50ml und 500ml) erprobt worden (Daten nicht gezeigt), welche weniger effiziente Depletionen erbracht hatten. Das Ausmaß der Genstilllegung wurde mittels Western-Blot aus Proteinlysaten und quantitativer Real-Time-PCR für jeden Vektor verglichen. Der effizienteste Knockdown der Kynureninase ließ sich durch die Verwendung der Plasmide C in Konzentrationen von 500 und 1000µl erreichen. Dies entsprach einer Reduktion von ca. 40% der Kynureninase-Expression auf mRNA-Ebene, siehe Abb. 4.5.1. Trotz Optimierung des Transduktionsprotokolls und des Einsatzes vierer verschiedener Zellklone in drei verschiedenen Konzentrationen war kein stärkerer Knockdown des Kynureninase Gens zu erreichen. Zunächst wurden alle zehn in Abb. 4.5.1. A. gezeigten Klone in mit 1µg/ml Puromycin supplementiertem Kulturmedium selektiert. Der effektivste Knockdown fand sich in den Linien L3.6pl RES C 500-, und C 1000, welche zur Weiterarbeit verwendet wurden.

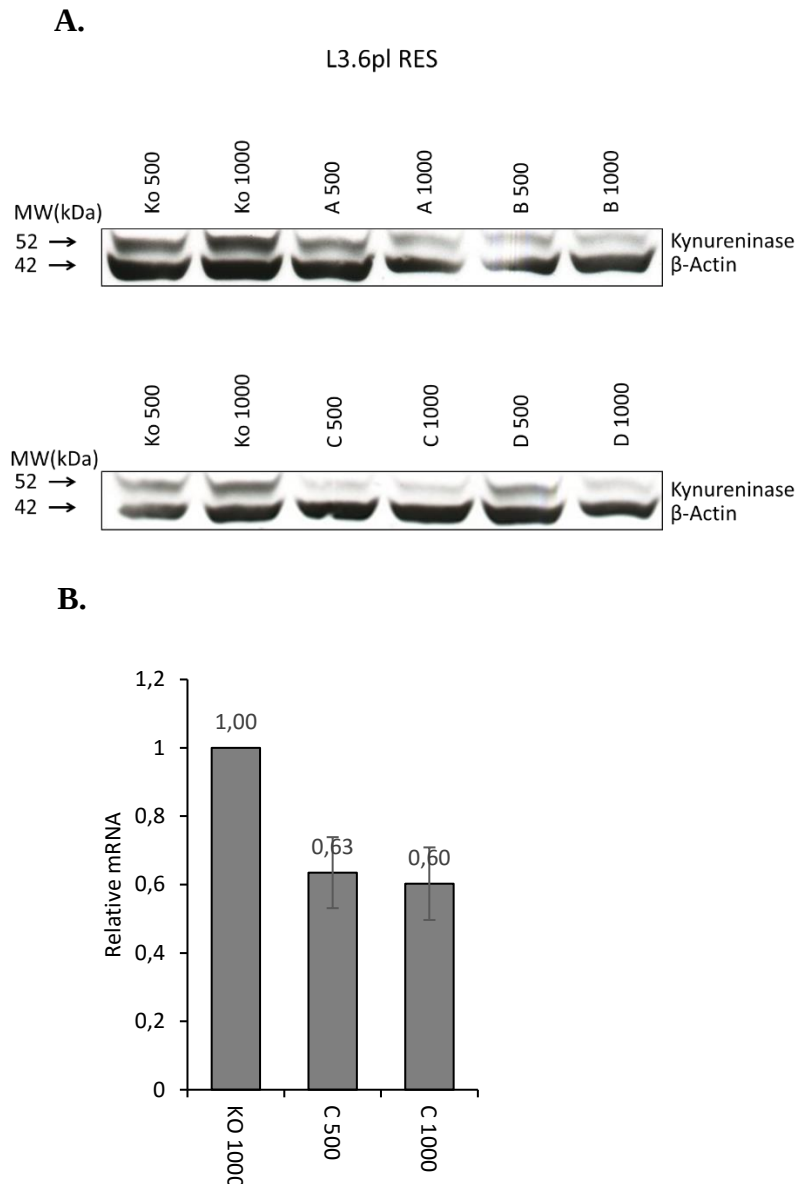


Abb. 4.5.1 Kynureninase-Depletion in der Linie L3.6pl RES.

- A.** Western-Blot aus Zelllysaten retroviral infizierter L3.6pl RES Zellen. Es wurden HEK293-T Zellen jeweils mit den shRNA Plasmiden A-D und einem Leervektor zur Kontrolle, sowie viralen Verpackungsplasmiden kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde der Kulturüberstand entnommen und je 500 bzw. 1000µl hiervon auf L3.6pl RES Zellen enthaltende Zellkulturschalen verteilt. Die L3.6pl RES Zellen wurden für weitere 24 Stunden im virenhaltigen und mit Polybrene (0,1%) versetzten Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion in 1,0µg/ml Puromycin. Die Hybridisierung des anschließend durchgeführten Western-Blots erfolgte mit Kynureninase-spezifischem Antiserum aus Kaninchen (obere Bande). Die Ladekontrolle wurde mit β-Actin-bindendem Antiserum aus Mäusen durchgeführt (untere Bande). Die Klone L3.6pl RES C 500- und C 1000 weisen den effektivsten Knockdown auf.
- B.** Real-Time-PCR Daten der Kynureninase-Depletion in den ausgewählten Knockdown Zell-Klonen C 500 und C 1000. Säulendiagramm der relativen mRNA Expression mit L3.6pl RES KO 1000 als Referenz. Die Amplifikation wurde mit Kynureninase-spezifischen Primern durchgeführt. Die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen wurden auf GAPDH Mittelwerte normiert. Der Versuch wurde mit einem weiteren unabhängigen Primerpaar für Kynureninase reproduziert (Daten nicht gezeigt).

Die Inhibition der Kynureninase in L3.6pl RES Zellen führte zu folgenden phänotypischen Veränderungen: Im Vergleich zur Wildtyp- und Kontroll-Zelllinie zeigten die Kynureninase-depletierten Karzinomzellen eine deutlich langsamere Proliferation unter fortlaufender Behandlung mit Gemcitabin. Die folgende Abb. 4.5.2 zeigt die Proliferationsbestimmung der Zelllinien L3.6pl RES, L3.6pl RES KO 1000, L3.6pl RES C 500 und L3.6pl RES C1000. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Einzelversuchen. Für die Messungen wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Nach 96 Stunden zeigte der Kynureninase-Knockdown-Zellklon L3.6pl RES C 1000 eine Wachstumsinhibition von 43,3% im Vergleich zum Zellklon KO 1000 ($p=0,0069$). Auch der zweite Knockdown-Klon (L3.6pl RES C 500) war nach 96 Stunden signifikant weniger proliferiert ($p=0,021$). Die Proliferation der Knockdown-Zellklone war ebenso bereits 72h nach Aussaat signifikant geringer als die der Kontroll-Klone ($p=0,0085$; $p=0,0381$). Die Aktivität der mit Kontroll-shRNA transduzierter Zellklone (L3.6 RES KO 1000) war nach 96 Stunden um 3193% gestiegen, die Aktivität der Kynureninase-depletierten Zellklone um 1810% und 2217% für L3.6 RES C 500 bzw. L3.6 RES C 1000. Damit konnte eine durch den Knockdown der Kynureninase-induzierte Wachstumsinhibition von bis zu 43,3% innerhalb von 96 Stunden nachgewiesen werden.

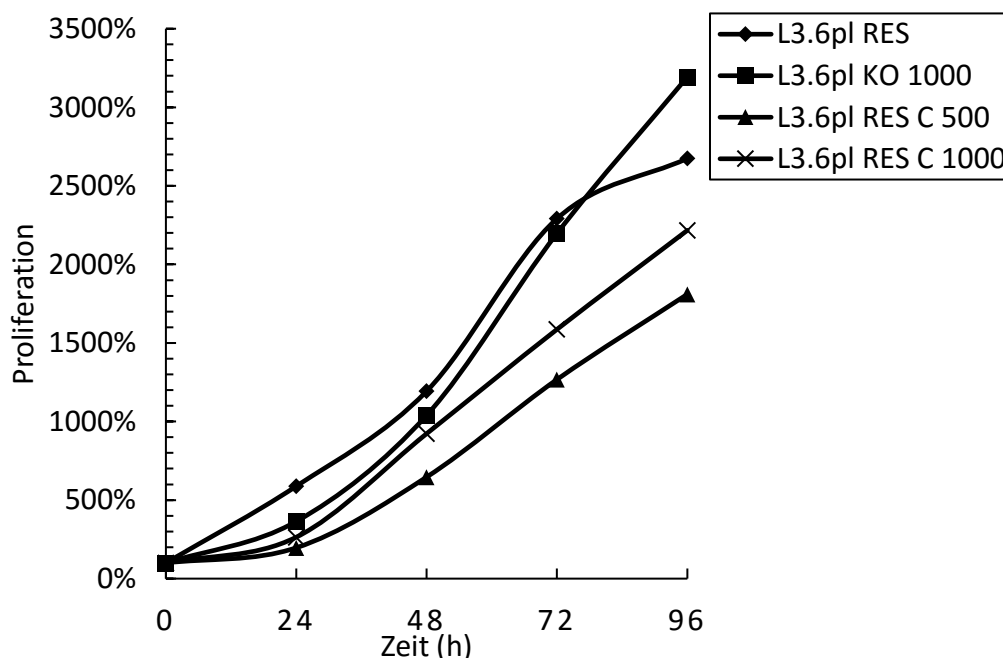


Abb. 4.5.2 Einfluss der Kynureninase-Depletion auf die Proliferation von L3.6pl RES Zellen unter chemotherapeutischer Behandlung.

Das Diagramm zeigt die Daten eines MTT-Zellproliferationsassays. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis reproduziert. Abgebildet ist die relative Anzahl stoffwechselaktiver L3.6pl RES Kynureninase-Knockdown Zellen (L3.6pl RES C 500, Dreiecke; und L3.6pl RES C 1000, Kreuze). Im Vergleich hierzu ist die

Aktivität von L3.6pl RES Zellen und mit einem Kontrollvektor transduzierter L3.6pl RES KO 1000 Zellen gezeigt (L3.6pl RES, Rauten; und L3.6pl KO 1000, Quadrate). Nach 72 Stunden zeigten die Kynureninase-Knockdown Zellen eine Proliferationsinhibition von bis zu 43,3% für den Zellklon L3.6pl RES C 1000 im Vergleich zur Kontrolle ($p=0.0081$). Der Versuch erfolgte unter fortlaufender chemotherapeutischer Behandlung mit $2\mu\text{M}$ Gemcitabin.

4.6 Die Hemmung der Kynureninase-Expression beeinflusst die Zellmigration nicht

Um den veränderten Phänotyp der Kynureninase-depletierten Zellen weiter zu untersuchen, wurden die Zellen auf ein verändertes Migrationsverhalten, und damit eine möglicherweise veränderte Metastasierungstendenz hin überprüft. Um das Migrationsverhalten quantitativ zu bestimmen, wurden die Knockdown- und Referenzzellen einem Zellmigrationsassay, dem sogenannten Transwell®-Assay, zugeführt. Dabei wurden die Karzinomzellen auf einer $8\mu\text{m}$ weite Poren enthaltenden semipermeablen Membran ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde anschließend bestimmt. Folgende Abb. 4.6.1 zeigt die gemittelten Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. Quantifiziert wurden erfolgreich durch die semipermeable Membran migrierte Zellen. Die Zellen wurden hierfür mit DAPI angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop randomisiert ausgezählt. Die Ordinate gibt die durchschnittlich gezählte Zellzahl pro Gesichtsfeld der erfolgreich migrierten Zellen an. Auf den Membranen der Referenzlinie L3.6pl RES KO 1000 wurden pro Gesichtsfeld im Durchschnitt 9,5 Zellen gezählt. Im Falle der Knockdown Linien L3.6pl RES C 500 und L3.6pl RES C1000 belief sich die Zahl erfolgreich migrierter Zellen auf 10,4 bzw. 8,1. Die Differenzen hielten sich in einem Bereich jenseits der statistischen Signifikanz auf ($p=0,87$ bzw. $p=0,47$). Damit konnte kein Einfluss der Kynureninase-Expression auf das Migrationsverhalten der untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

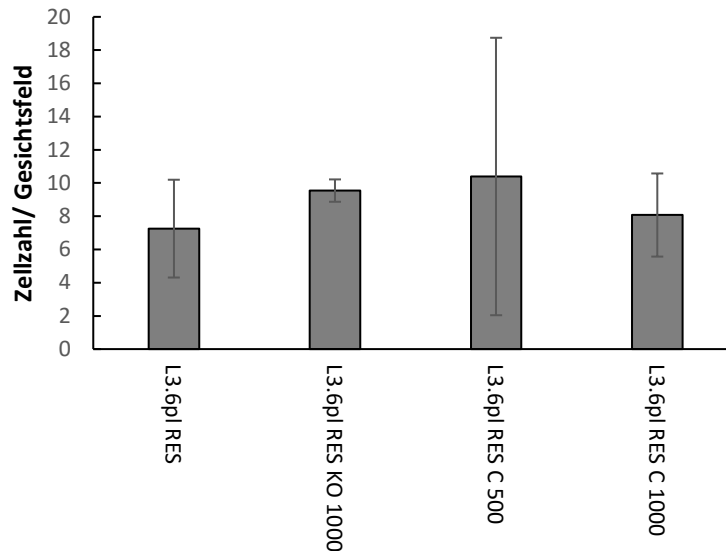


Abb. 4.6.1 Einfluss der Kynureninase-Depletion auf die Zellmigration von L3.6pl RES Zellen.

Dargestellt sind die Daten aus Transwell®-Assays mit den Kynureninase-depletierten Zellklonen L3.6pl RES C 1000 und L3.6pl RES C 500. Im Vergleich hierzu ist das Migrationsverhalten der Linien L3.6pl RES und L3.6pl RES KO 1000 abgebildet. Das Diagramm zeigt die gemittelten Daten aus drei unabhängigen Transwell®-Assays. Die Zellen wurden für 24 Stunden auf 8µm weite Poren enthaltenden semipermeablen Membranen inkubiert. Die hindurchmigrierten Zellen wurden mit DAPI angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt. Angegeben ist die durchschnittlich gezählte Zellzahl pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung. Diese Versuche zeigten für die Kynureninase Knockdown Zellen keine signifikant verminderte Zellmigration im Vergleich zur Kontrolle.

Da es trotz mehrfacher Wiederholung dieses Experiments methodisch bedingt zu großen Varianzen der Messergebnisse kam, wurden die Versuche zur Zellmigration mit einer weiteren Methode wiederholt. Dabei wurde wiederum das Transwell®-Zweikammersystem eingesetzt. Jedoch wurden die erfolgreich migrierten Zellen anschließend in Lösung gebracht und mit Calcein gegengefärbt. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte photometrisch. Auch mit dieser Methode war kein signifikant vermindertes Migrationsverhalten der Kynureninase-Knockdown-Zellen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

4.7 Die chemotherapeutische Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Gemcitabin steigert die Kynureninase-Expression

In der chemotherapieresistenten Karzinomlinie L3.6pl RES konnte die konstitutive Überexpression der Kynureninase mit einem proliferationsfördernden Phänotyp in Verbindung gebracht werden. Ferner wurde in vorliegender Arbeit die kurze, 72-stündige Behandlung weiterer Pankreaskarzinomzelllinien mit Gemcitabin auf die Veränderung der Expression von

Kynureninase hin untersucht. Dies geschah unter der Vermutung, die Kynureninase-Expression würde auch in der akuten Stresssituation der Karzinomzellen zu deren Überlebensvorteil gesteigert. Für diesen Versuch wurden drei Zelllinien mit von vornherein schwacher (Panc-1), mittlerer (BxPC3) oder starker Kynureninase-Expression (PaCa 5061) gewählt. Die jeweiligen Zellen wurden 72 Stunden lang in mit Gemcitabin (0,25 bzw. 0,5 μ M) versetztem Medium kultiviert und anschließend mittels Real-Time-PCR auf ihren Kynureninase-mRNA Gehalt hin überprüft. Dieser chemotherapeutische Stress führte bei Panc-1 Zellen, welche im Normalzustand sehr wenig Kynureninase exprimierten, zu einer über 8-fach gesteigerten Kynureninase-Expression. Abb. 4.7.1 stellt die gemittelten Ergebnisse des dreimalig durchgeführten Experiments graphisch dar. Auch für die ohnehin schon mittelstark bzw. stark Kynureninase exprimierenden Zelllinien war eine Zunahme der Expression messbar, wenngleich diese schwächer ausfiel. Sie betrug das 1,8- und 1,4-fache im Falle der BxPC3 bzw. den sehr stark Kynureninase exprimierenden PaCa 5061 Zellen. Panc-1 Zellen zeichnen sich natürlicherweise durch eine ausgeprägte Chemotherapieresistenz aus und tolerierten die 72-stündige Behandlung mit 0,5 μ M Gemcitabin problemlos.

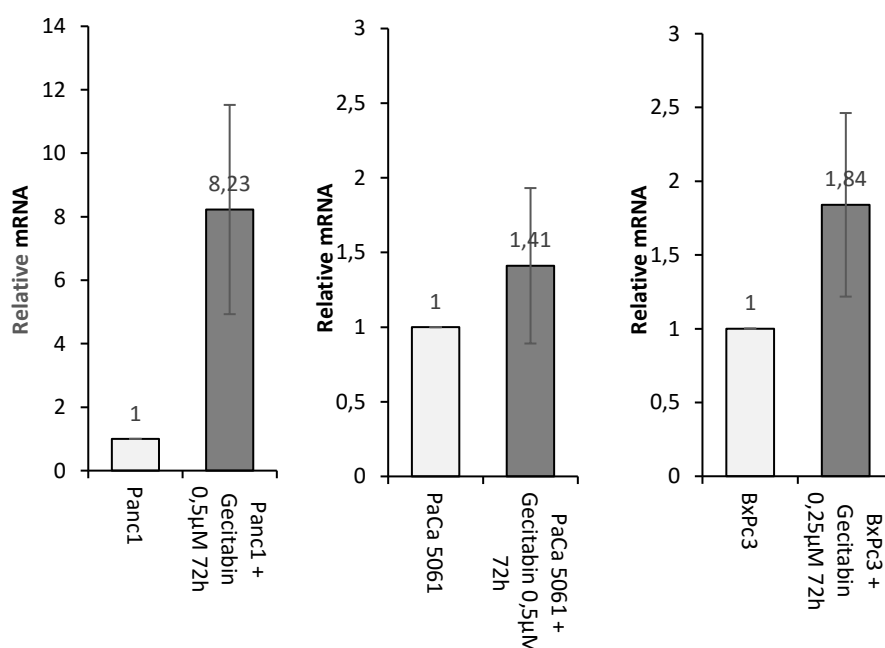


Abb. 4.7.1 Kynureninase-mRNA-Expression in Panc-1, BxPC3 und PaCa 5061 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 0,5 μ M bzw. 0,25 μ M Gemcitabin.

Die Amplifikation wurde mit Kynureninase-spezifischen Primern durchgeführt. Die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen wurden auf GAPDH Mittelwerte normiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Folgende Abb. 4.7.2 zeigt einen Western-Blot der Panc-1 Zelllysate vor und nach 72-stündiger Behandlung mit Gemcitabin. Auf dem mit Kynureninase-spezifischem Antiserum inkubierten Western-Blot zeigte sich der Zugewinn einer distinkten Bande einer Proteingröße von rund 60kDa. Das Protein dieser Bande war somit leicht größer als das ansonsten auf einer Höhe von 52kDa detektierbare bekannte Kynureninase-Protein.

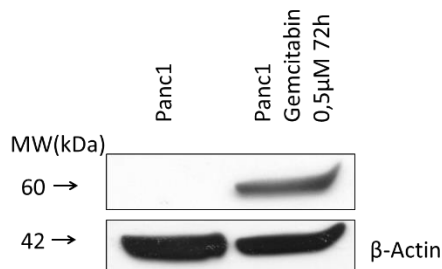


Abb. 4.7.2 **Kynureninase-Proteinexpression nach 72-stündiger Inkubation von Panc-1 Zellen mit 0,5μM Gemcitabin.**

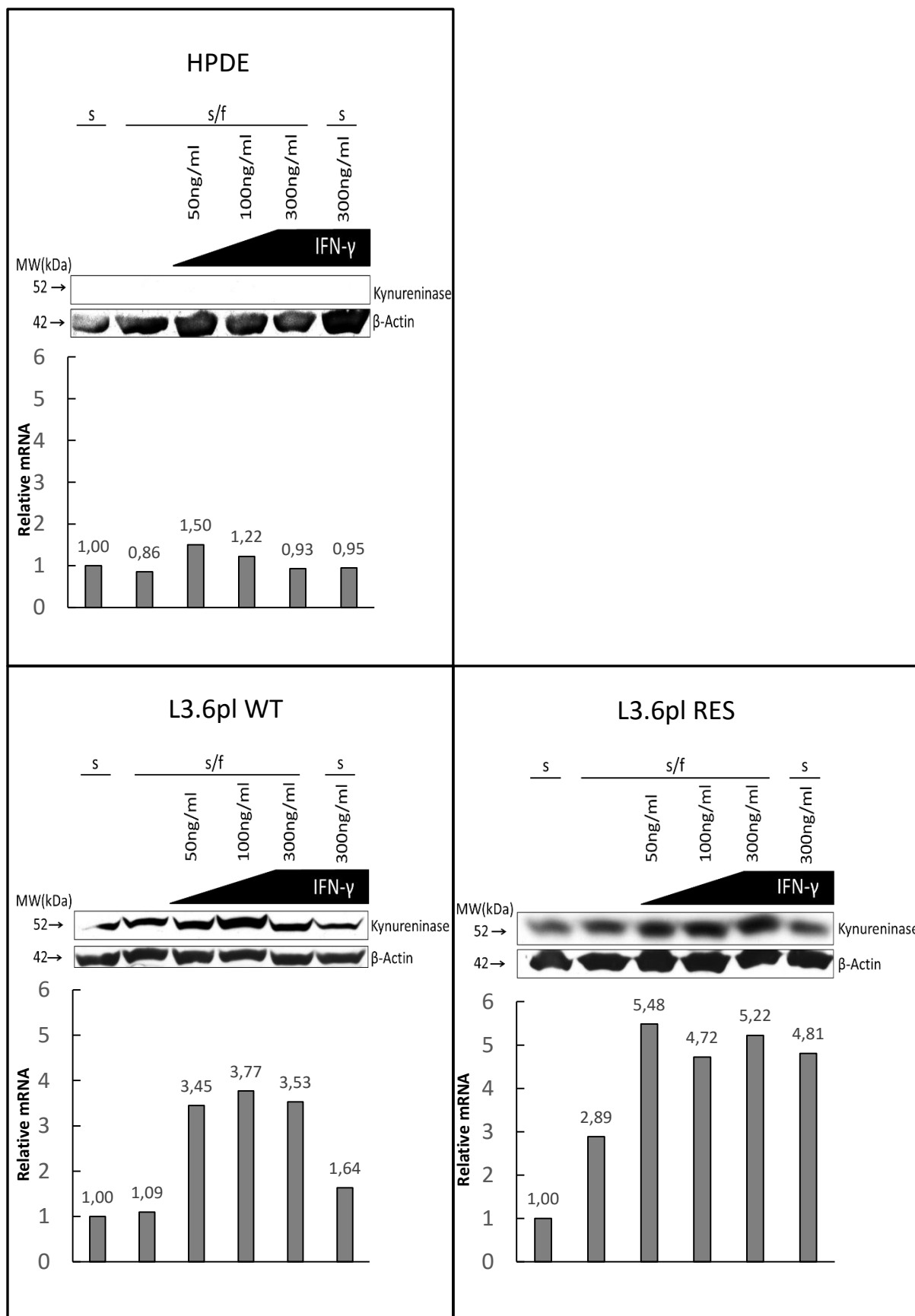
Die Zellen wurden für 72 Stunden in 0,5μM Gemcitabin-haltigem Kulturmedium inkubiert und anschließend lysiert. Der abgebildete Western-Blot wurde mit Kynureninase-spezifischem Antiserum aus Kaninchen inkubiert. Es zeigte sich der Zugewinn einer distinkten Bande in der mit Gemcitabin behandelten Proteinspur auf einer Höhe von rund 60kDa. Eine Detektion mit β-Actin-spezifischem Antikörpern diente als Ladekontrolle.

4.8 Interferon-γ steigert die Kynureninase-Expression in Pankreaskarzinomzellen

In der Fachliteratur ist die Expressionsinduktion der Indolamin-2,3-Dioxigenase, des bekanntesten Enzyms des Tryptophanabbaus, durch die Stimulation mit Interferon-γ (IFN-γ) beschrieben (Yoshida, Imanishi, Oku, Kishida, & Hayaishi, 1981). Diese Stimulierbarkeit ist unter anderem für einige Zelllinien der Entitäten Blase, Leber, Lunge, Niere, Blut und Mikroglia bekannt (Taylor & Feng, 1991). Weiterhin ist die IFN-γ-abhängige Regulation der gesamten Degradierung von Tryptophan nachgewiesen (Alberati-Giani, Ricciardi-Castagnoli, Köhler, & Cesura, 1996). Hierbei wurde auch die IFN-γ-abhängige Aktivität der Kynureninase in murinen MT2 Makrophagen bewiesen. Diesem Effekt unterlagen aber längst nicht alle Zelltypen. Die Stimulation von Pankreaskarzinomzellen durch IFN-γ war mit dieser Fragestellung bislang nicht durchgeführt worden. In vorliegender Arbeit wurde die Kynureninase-Expression von Pankreaskarzinomzellen nach der Stimulation mit IFN-γ gemessen, um Einblicke in die Regulation der Expression der Kynureninase zu erhalten.

Hierfür wurden die Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES in 10cm Zellkulturschalen ausgesät und für 16 Stunden serumfrei inkubiert. Es folgte die eintägige Behandlung der Zellen

mit IFN- γ in aufsteigenden Dosen (50, 100 und 300ng/ml). Die Zellen wurden anschließend pellettiert, um Proteinlysate und mRNA zu gewinnen. Die Protein- und Genexpression der Kynureninase wurde anschließend mittels Western-Blot und Real-Time-PCR untersucht und auf die Induzierbarkeit durch IFN- γ hin geprüft. Die Stimulationsreihe mit IFN- γ in ansteigenden Konzentrationen wurde zweimalig durchgeführt, auf Proteinebene analysiert und reproduziert. Die entsprechenden mRNA-Quantifikationen mittels Real-Time-PCRs wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und mit einem weiteren Primerpaar reproduziert. Hierbei ergaben sich folgende, in Abb. 4.8.1 dargestellten Ergebnisse. In der benignen Zelllinie HPDE war keine Steigerung der ohnehin negativen Expression der Kynureninase durch die Behandlung mit IFN- γ möglich. Dieses Ergebnis war dem korrespondierenden Western-Blot ebenfalls zu entnehmen. Hier war erneut keine Expression der Kynureninase detektierbar. Die Stimulation mit IFN- γ ergab für die Karzinomlinien L3.6pl WT und L3.6pl RES folgendes Ergebnis. Die Menge an für Kynureninase kodierender mRNA ließ sich in der Linie L3.6pl WT durch die Stimulation mit dem Zytokin steigern. Die Augmentation der Proteinmenge blieb bei Zunahme der Konzentration an IFN- γ gleich. Der Zuwachs variierte zwischen dem 3,5- und 3,8-fachen der Ausgangsmenge. Imponierend war der schwächer ausgeprägte Anstieg unter mit Serum und Interferon supplementiertem Medium. Diese Erkenntnisse deckten sich mit den Resultaten des entsprechenden Western-Blots. Auch hier war eine Intensitätszunahme der Proteinbanden nach Stimulation erkennbar, insbesondere nach Behandlung mit 100ng/ml IFN- γ . Des Weiteren war eine Abnahme der Proteinmenge in der letzten Spur, unter Stimulation sowohl mit IFN- γ (300ng/ml), als auch mit Serum, sichtbar. Das Kynureninase-Expressionslevel der L3.6pl RES Zelllinie ließ sich im Vergleich zur Linie L3.6pl WT durch den Zytokinstimulus stärker induzieren. Auffällig war zunächst ein mRNA Expressionsanstieg um das 2,89-fache in den unter Serumkarenz inkubierten Zellen. Weiterhin stieg die Kynureninase-Expression auf das bis zu 5,5-fache unter IFN- γ -Behandlung an. Auch hier ließ sich durch die weitere Steigerung der Konzentration des Zytokins kein Mehrgewinn der Kynureninase-mRNA-Menge erzielen. Im Gegensatz zur Zelllinie L3.6pl WT fiel die Kynureninase-Expression unter Inkubation in serumhaltigem Medium nur wenig ab (4,8-fache Expression). Der dazugehörige Western-Blot reproduzierte diese Ergebnisse.

Abb. 4.8.1 Kynureninase-Expression nach Serumentzug und Behandlung mit Interferon- γ .

Die Zellen wurden 16 Stunden lang serumfrei (s/f) in 10cm Schalen inkubiert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Behandlung mit IFN- γ . Die Stimulation erfolgte in den Konzentrationen 50, 100 und 300mg/ml Kulturmedium. Anschließend wurde das Experiment beendet und Proteinlysate sowie mRNA der Zellen gewonnen. Die Stimulationsreihe wurde mit den Zellen HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES durchgeführt. Jeweils unterhalb sind die relativen mRNA Expressionen der Kynureninase dargestellt. Diese wurden mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Die Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und mit einem weiteren, unabhängigen Primerpaar verifiziert (Daten nicht gezeigt). Jeweils oben sind Western-Blots aus Proteinlysaten abgebildet. Die Hybridisierung der Western-Blots erfolgte mit Kynureninase-spezifischem Antiserum aus Kaninchen (obere Bande). Die Ladekontrolle wurde mit β -Aktin-bindendem Antiserum aus Mäusen durchgeführt (untere Bande). Für alle drei Zelllinien deckten sich die Ergebnisse aus den Real-Time-PCR Daten mit denen der Western-Blots. In der HPDE Linie war unter IFN- γ -Stimulation keine Zunahme der Expression der Kynureninase detektierbar. In der Linie L3.6pl WT ließ sich die Kynureninase-Expression auf das 3,8-fache der ursprünglichen mRNA Expression induzieren. Die Linie L3.6pl RES zeigte eine um bis zu 5,5-fach gesteigerte mRNA Expression der Kynureninase.

4.9 Hypoxie induzierter Stress steigert intra- und extrazelluläre Mengen der Kynureninase

Neben der chemotherapeutischen Behandlung wurden weitere Zusammenhänge zwischen der Kynureninase und zellulärem Stress untersucht. Die enzymatische Aktivität der Kynureninase wirkt im Stoffwechsel des Energielieferanten NAD⁺ mit. Damit könnte Kynureninase abgesehen von der Chemotherapieresistenz weitere Überlebensvorteile der Tumorzellen unter erschwerten Wachstumsbedingungen begünstigen. Auch ist eine prominente Hypovaskularisierung und folglich Hypoxie ein charakteristisches Merkmal des Pankreaskarzinoms. Um die Rolle der Kynureninase im Überleben von Tumorzellen unter hypoxischen Wachstumsbedingungen zu charakterisieren, wurden diese hypoxischen Bedingungen in einem *in vitro*-Modell durch Sauerstoff- und Nährstoffentzug nachgestellt. Die Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES wurden hierzu für 48 Stunden unter hypoxischen (1% O₂) und serumfreien Bedingungen inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Experiment beendet, und es wurden sowohl Proteinlysate als auch Kulturüberstände gewonnen. In

Abb. 4.9.1 sind die Proteinverhältnisse der Kynureninase nach Inkubation der Pankreaskarzinomzellen unter Normoxie und Hypoxie sowie Serumsupplementation und Serumkarenz dargestellt. In den Lysaten der Linie HPDE zeigte sich keine induzierbare Proteinexpression der Kynureninase. In den Karzinomlinien zeigte sich hingegen eine Zunahme der Kynureninase-Proteinmengen unter hypoxischen Wachstumsbedingungen, sowohl im serumfreien als auch im serumhaltigen Kulturmedium. Unter Serumkarenz sank die Kynureninase-Proteinmenge in der Linie L3.6pl WT ab. Anschließend wurde der Versuch wiederholt und die Kynureninase-mRNA Expression mittels Real-Time-PCR quantifiziert.

Hier offenbarte sich, anders als erwartet, ein starker Abfall an Kynureninase-mRNA unter hypoxischen Wachstumsbedingungen (Daten nicht gezeigt).

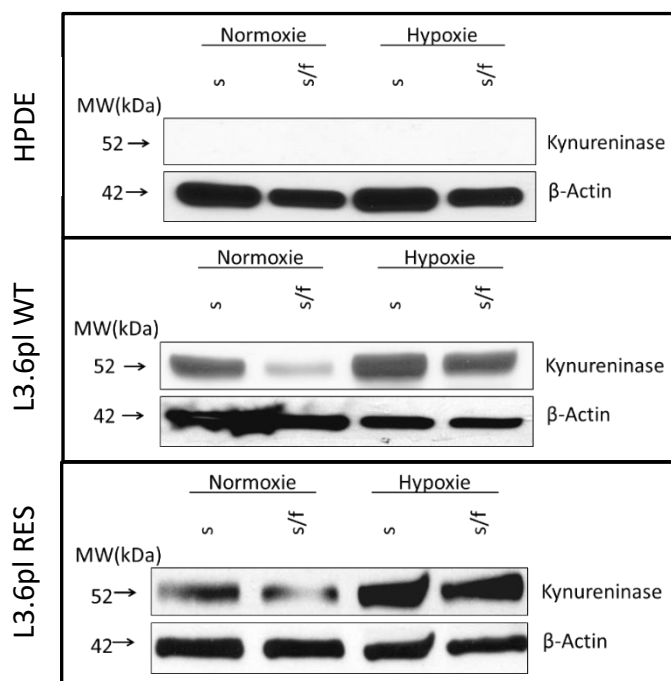


Abb. 4.9.1 Western-Blot der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES nach 48h unter hypoxischen, normoxischen, serumfreien und serumhaltigen Wachstumsbedingungen.

Die Zelllinien wurden 48 Stunden lang im serumfreien (s/f) Kulturmedium und unter 1% O₂ Raumluftgehalt inkubiert und anschließend lysiert. Der Western-Blot zeigt in ihrer Intensität zunehmende spezifische Banden für Kynureninase nach Inkubation unter Hypoxie, verglichen zur Inkubation unter Normoxie.

Abb. 4.9.2 zeigt die Proteinverhältnisse der sezernierten Kynureninase im Kulturmedium nach 48-stündiger Inkubation unter sauerstoffarmen Bedingungen. Die unter Hypoxie inkubierten Tumorzellen offenbarten eine stärkere Sekretion der Kynureninase. Insgesamt fand sich im Medium der Zellen L3.6pl RES mehr sezerniertes Kynureninase-Protein. In Abb. 4.9.2 ist die zeitabhängige Zunahme des sezernierten Kynureninase-Proteins unter Hypoxie abgebildet.

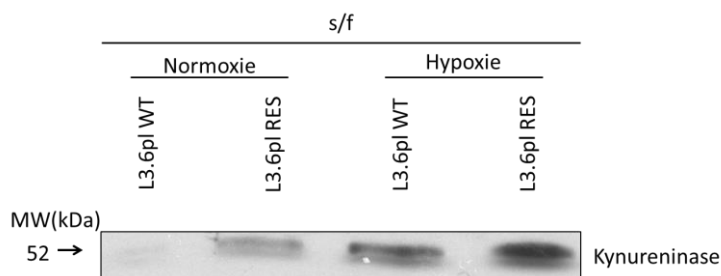


Abb. 4.9.2 Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium nach Inkubation im normoxischen und hypoxischen Wachstumsmilieu.

SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot der eingegangenen Zellkulturüberstände der Zelllinien L3.6pl WT und L3.6pl RES. Der Western-Blot wurde mit spezifischem Antiserum gegen Kynureninase hybridisiert. Die Zelllinien wurden zuvor 48h lang unter serumkarenten und normoxischen bzw. hypoxischen (5% O₂) Bedingungen inkubiert.

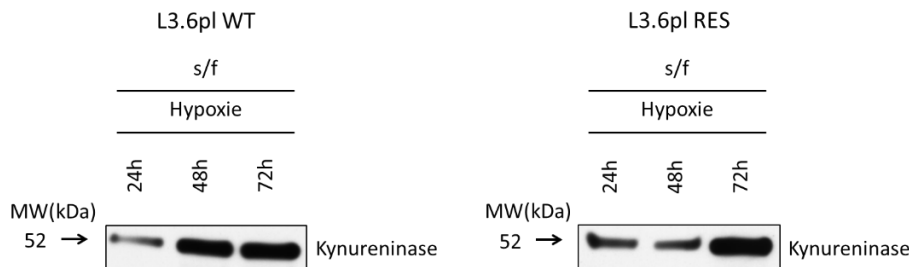


Abb. 4.9.3 Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium von L3.6pl Karzinomzellen nach Inkubation im hypoxischen Wachstumsmilieu nach 24, 48 und 72 Stunden.

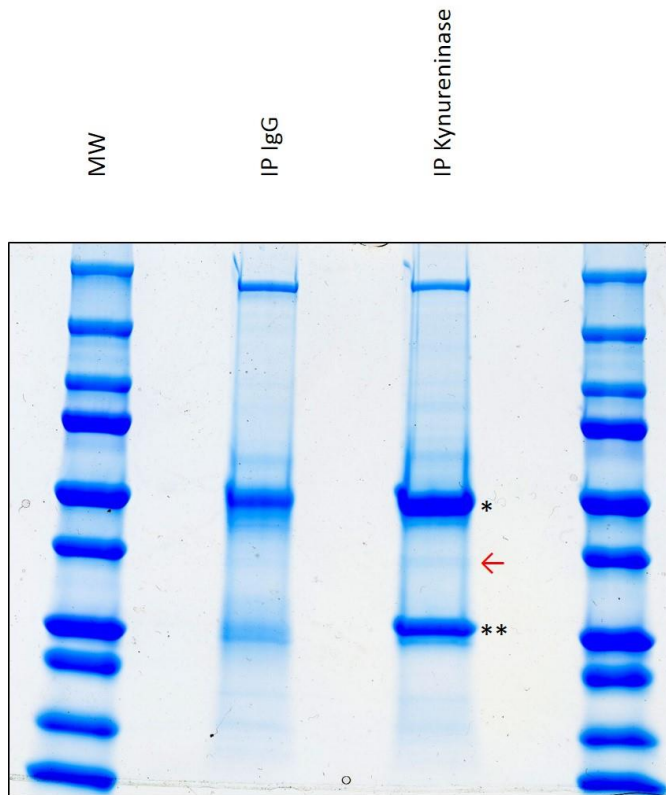
Die Zelllinien wurden zuvor 24, 48 und 72h lang unter serumkarenten und hypoxischen (1% O₂) Bedingungen inkubiert. Der Western-Blot wurde mit spezifischem Antiserum gegen Kynureninase hybridisiert.

4.10 Identifikation neuer Kynureninase-interagierender Proteine im Pankreaskarzinom

Um unbekannte Interaktionspartner der Kynureninase zu identifizieren und deren Wirkmechanismus besser zu verstehen, wurde initial eine Immunpräzipitation mit Kynureninase-spezifischem Antikörper in L3.6pl RES Zelllysaten durchgeführt. In diesem „pull down assay“ sollte Kynureninase mit allen daran verweilenden Interaktionspartnern aufgereinigt werden, um die Proteine anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie zu identifizieren. Eine Verifizierung der erfolgreichen Anreicherung mittels Western-Blot war aufgrund der Laufhöhe der Kynureninase bei 52kDa und der daraus resultierenden Überlagerung durch die IgG-Leichtketten nicht möglich. Abb. 4.10.1 zeigt die mit Coomassie-Blau angefärbten SDS-Gele zweier unabhängiger Versuche. Im ersten Versuch war eine zusätzliche Bande in der Kynureninase-Spur auf einer Höhe von rund 37kDa ersichtlich (roter Pfeil), welche zur Analyse extrahiert, und auf ihre enthaltenden Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert wurde (Core-Facility, UKE). Gleichzeitig wurde der Bereich der entsprechenden Laufhöhe der Maus-IgG-Kontrollspur mitentfernt und massenspektrometrisch überprüft. Anschließend wurde eine Liste aller Proteine erstellt, welche nur in der Kynureninase-Proteinspur, nicht aber in der Kontrollspur vorhanden waren. Dieser Versuch wurde unter Einsatz erhöhter Protein- und Antikörpermengen wiederholt (Abb. 4.10.1 B.). Auf diese Weise wurden in beiden Versuchen insgesamt 405 Proteine identifiziert. Nach

Auswertung der massenspektrometrischen Ergebnisse, bereits publizierter Interaktionsstudien, und den Proteinfunktionen der potenziellen Kynureninase-Interaktoren, sind in Tab. 4.10.1 fünf der wahrscheinlichsten Interaktionspartner von Kynureninase dargestellt. Die Proteine BCCIP, GDA und CHORDC1 wurden im ersten Versuch identifiziert, siehe Tab. 4.10.1. Diese Interaktionen waren im Rahmen einer Hochdurchsatz-Proteomstudie bereits identifiziert und publiziert worden (Kristensen, Gsponer, & Foster, 2012). BCCIP, das *BRCA2 and CDKN1A-interacting protein* ist ein wichtiger Kofaktor des DNA Reperaturenzym BRCA2 und nimmt in der Tumorentstehung eine Rolle als Tumorsuppressor ein. Die Expression von BCCIP inhibiert die Proliferation von Brustkrebs- und Hirntumorzellen (Liu J. , Yuan, Huan, & Shen, 2001). GDA, das Enzym Guanin Desaminase katalysiert die Reaktion von Guanin zu Xanthin. Einer Spleißvariante der GDA konnte experimentell eine Rolle im Aufbau der Mikrotubuli zugewiesen werden (Akum, et al., 2004). CHORDC1, das *cysteine and histidine-rich domain containing Protein 1*, ist ein Hitze-Schock Protein 90 bindendes Protein (Wu, Luo, Jiang, & Li, 2005). Durch die Regulation der Zentrosom-Amplifikation besitzt es eine tumorsupprimierende Wirkung (Ferretti R. , et al.). Die Expression von CHORDC1 verstärkt die Antigen-Expression, Transkription und Replikation von Hepatitis B Viren (Zhao, et al., 2014).

In einem zweiten Versuchsdurchgang (Abb. 4.10.1 B.) wurde eine zusätzliche Proteinbande wenig oberhalb der IgG-Leichtketten-Proteinspur detektiert (roter Pfeil), und zur weiteren Analyse extrahiert. Zwei hierbei identifizierte mögliche Interaktoren sind CBR1 und GSTP1. Das Protein Carbonyl-Reduktase 1 (CBR1), eine NADPH abhängige Oxidoreduktase, fördert die Resistenz von Pankreaskarzinomzellen gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung mit Anthrazyklinen (Plebuch, Soldan, Hungerer, Koch, & Maser, 2007). Glutathion-S-Transferase 1 (GSTP1) katalysiert als Entgiftungsenzym die Bindung von Glutathion an Xenobiotika. Funktionell unterschiedliche Formen der GSTP1 führen zu Alterationen in der Suszeptibilität für Krebserkrankungen. Die Expression von GSTP1 begünstigt darüber hinaus die Resistenz von Ovarialkarzinomzellen gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika (Sawers, et al., 2014).



B.

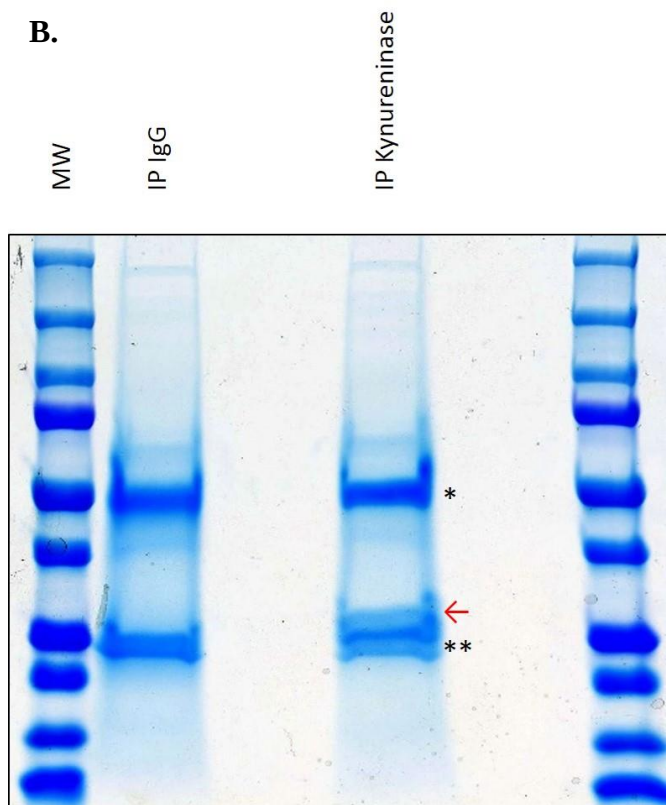


Abb. 4.10.1 Immunpräzipitation zur Identifikation neuer Proteininteraktoren der humanen Kynureninase.

A. Immunpräzipitation aus L3.6pl RES Zelllysaten mit Kynureninase-spezifischem Antikörper. Die Immunpräzipitation erfolgte nach einer Vorabreinigung mit Maus-IgG und dem Ausschluss der

unspezifischen IgG-abhängigen Bindungen. Für die Kynureninase-Anreicherung fanden 1000µg Protein Einsatz, sowie je 6µg IgG-Maus- und 6µg Kynureninase-Maus-Antikörper. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. In der Kynureninase-Proteinspur zusätzlich auftretende Proteinbanden (rote Pfeile) wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch auf die enthaltenen Proteine hin untersucht. * schwere Ketten der IgG, ** leichte Ketten der IgG.

B. Wiederholung des Experiments unter Einsatz von 3000µg Protein sowie 10µg Antikörper.

Proteinname	Abkürzung	MW	Spezifische Peptide	Beschreibung
BRCA2 and CDKN1A-interacting Protein	BCCIP	36,0	3	Intranukleäres, mit BRCA2 und CDKN1a interagierendes Protein, tumorsupprimierend
Guanine Deaminase	GDA	44,2	3	Katalyse der Deaminierung von Guanin zu Xanthin
Cysteine and histidine-rich domain	CHORDC1	37,5	5	Regulation der Zentrosom-Duplikation, tumorsupprimierend
Carbonyl reductase	CBR1	30,4	11	Katalyse der Reduktion von Carbonylbestandteilen. Abbau von Anthrazyklinen, Chemoresistenz
Glutathione S-transferase	GSTP1	23,3	6	Entgiftung

Tab. 4.10.1 Liste potentieller, experimentell identifizierter Proteininteraktoren der humanen Kynureninase.

Es wurde eine Liste aller Proteine erstellt, welche nach der Immunpräzipitation ausschließlich in der Kynureninase-Proteinspur, nicht aber in der Kontrollspur vorzufinden waren. Nach Beurteilung der massenspektrometrischen Ergebnisse, vorheriger Publikationen zu Proteininteraktionen der Kynureninase und den Proteinfunktionen der potentiellen Interaktoren, wurden fünf Proteininteraktoren ausgewählt. Diese sind BCCIP, GDA und CHORDC1 (Versuch Abb. 4.10.1) sowie CBR1 und GSTP1 (Versuch Abb. 4.10.1).

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8% die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität. Aus klinischer Sicht bedingen sowohl die schwere und im Mittel späte Diagnosestellung, als auch die unzureichenden therapeutischen Mittel die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms. Daher ist die Suche nach Biomarkern, als neue diagnostische Mittel, und nach molekularen Ansatzpunkten für eine effektivere Chemotherapie klinisch von großer Relevanz. Als sezerniertes und potentiell mit Chemotherapieresistenz assoziiertes Protein, war die weitergehende Charakterisierung von Kynureninase in beiderlei Hinsicht im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom daher von großer Priorität. Kynureninase war mit Hilfe von Northern-Blot Analysen in den Organen Leber, Plazenta und Lunge als stark exprimiert nachgewiesen worden. Eine schwächere Expression war für die Organe Herz, Skelettmuskel und Pankreas beschrieben gewesen (Alberati-Giani, et al., 1996). In vorliegender Arbeit konnte die schwache Expression der Kynureninase in gutartigem Pankreasepithel ebenfalls aufgezeigt werden, sowohl in Gewebeschnitten, als auch in der benignen Pankreasepithelzelllinie HPDE. Damit konnten bisherige Expressionsanalysen in Pankreasgewebe auf Transkriptomebene nun auf Proteinebene reproduziert werden. Bisherige Arbeiten über die Rolle der Kynureninase im Tumorgeschehen des Pankreas waren auch nach eingehender Literaturrecherche nicht zu finden. In Vorarbeiten konnte Kynureninase im Zellkulturmedium stark chemotherapieresistenter Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu chemotherapiesensiblen Pankreaskarzinomzellen der Referenz als vermehrt nachgewiesen werden. In vorliegender Arbeit wurde weiterhin die Überexpression der Kynureninase in 50% der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien festgestellt. Diese Aussage ließ sich durch die Auswertung der Gewebepräparate bestätigen. Interessanterweise, wiesen 67% der gutartigem Pankreasgewebe entstammenden Proben keine oder lediglich eine geringe Immunfärbung der Kynureninase auf. Im Falle der Pankreaskarzinomproben offenbarten 69% der Präparate hingegen eine moderate bzw. starke Anfärbung. Da die Auswertung immunhistochemisch gefärbter Proben mitunter der Subjektivität des Untersuchers unterliegt, ist hier eine Schwäche der angewandten Methode erkenntlich. Wir versuchten dieser Problematik durch die einheitliche Vorgabe objektiver Kriterien für das Vorliegen eines Färbereignisses, sowie der Beurteilung der Präparate durch zwei unabhängige Begutachter, zu begegnen. Mit sechs Präparaten ist vor allem die Fallzahl an gutartigen Gewebeproben für den Nachweis eines signifikanten Unterschieds als zu gering anzusehen. Dennoch verdeutlichen diese Daten, ebenso wie die *in vitro* Daten zur Expression, die statistisch häufige Hochregulation der

Kynureninase im Pankreaskarzinom. Des Weiteren wird Kynureninase in den Karzinomzellen differentiell exprimiert, und in mindestens 50% der Fälle überexprimiert. Vergleichbare Expressionsdaten sind für Kynureninase bislang nicht vorhanden. Für die Indolamin-2,3-Dioxygenase, ein bereits gut untersuchtes und erwiesenermaßen stark in der Tumorprogression und Immunsuppression involviertes Enzym des gleichen Stoffwechselwegs wie Kynureninase, ist eine ähnlich ausgeprägte heterogene Expression in Pankreaskarzinomen bekannt (Witkiewicz, et al., 2008). Diese Expressionsdaten für Kynureninase im Pankreaskarzinom liefern die Rechtfertigung und Grundlage für weitere klinische und grundlagenorientierte Forschung an diesem Enzym. Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieser Expressionsdaten die Überexpression der Kynureninase in der chemotherapieresistenten Tumorlinie bestätigt werden, und Kynureninase zum Ziel weiterer Nachforschungen auf diesem Gebiet werden lassen.

Zur weiteren Charakterisierung der Kynureninase im Pankreaskarzinom, wurde zunächst deren intrazelluläre Lokalisation begutachtet. Aus bisherigen Untersuchungen gingen die zytoplasmatische und mitochondriale Lokalisation der Kynureninase hervor (Inada, Okuno, Kimura, & Kido, 1984). Studien zur Lokalisation der Kynureninase in Pankreasepithelzellen oder Pankreaskarzinomzellen lagen seither nicht vor. Die in vorliegender Arbeit beschriebene Kernlokalisierung der Kynureninase ist für dieses Stoffwechselenzym bislang nicht bekannt gewesen und ist für diesen Proteintypus ungewöhnlich. Auch konnte die vermehrte Anreicherung von Kynureninase im Zellkern der chemotherapieresistenten L3.6pl RES Karzinomlinie im Vergleich zur therapiesensitiven Schwesterlinie gezeigt werden. Die Kernlokalisierung wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden, der Immunzytochemie und der subzellulären Fraktionierung nachgewiesen, wodurch Zweifel an diesem Ergebnis zerstreut werden konnten. Dennoch wurde auch die zytoplasmatische und enzymtypische Lokalisation der Kynureninase weiterhin nachgewiesen, sowohl durch die Methoden der Immunzytochemie und Zellfraktionierung, als auch mittels Immunhistochemie. Durch die potentielle Vermittlung von Tumorprogredienz und Chemoresistenz ist die Kernlokalisierung der Kynureninase wiederum als schlüssig anzusehen. Im Zellkern ist die Beteiligung des Enzyms an Prozessen der Zellzykluskontrolle oder DNA-Reparatur möglich. Auch durch *in silico* Analysen konnte dieses Ergebnis durch das Auffinden von Kernlokalisierungsdomänen in der Proteinsequenz der Kynureninase untermauert werden. Das mutmaßliche Vorliegen der Kynureninase in den Nukleus zugehörigen Zelllysaten auf einer bislang unbekannten Laufhöhe von rund 100kDA, lässt Spekulationen über die Modifikation und Konfiguration der hier befindlichen Form zu.

Eine posttranslationale Glykosylierung konnte experimentell als Ursache der vermeintlichen Größenzunahme der kernspezifischen Form ausgeschlossen werden. Aufgrund der exakt doppelten Größe der bekannten 52kDA liegt das Vorkommen eines Proteindimeres nahe. Das Anfallen von Proteindimeren der Kynureninase in purifizierter Form ist bereits beschrieben und lässt sich mit dem vorgefundenen Ergebnis vereinen (Walsh & Botting, 2002).

Neben der intrazellulären Lokalisation geben die Daten vorliegender Arbeit Aufschluss über die bislang nicht bekannte Sekretion der Kynureninase. Die im Extrazellulärmilieu der Zelllinie L3.6pl RES vorgefundenen Mengen an Kynureninase übersteigen die der therapieaffinen Schwesterlinie L3.6pl WT deutlich. Dies bestätigte die in Vorarbeit massenspektrometrisch erhobenen Erkenntnisse. Ebenso decken sich die Ergebnisse mit den zuvor intrazellulär ermittelten Protein- und mRNA-Verhältnissen. Eine Sekretion durch die Referenzzelllinie benigner Dignität (HPDE) war nicht nachweisbar. Dies verdeutlicht abermals die tumorspezifische Relevanz der Kynureninase. Die extrazelluläre Präsenz könnte darüber hinaus die Voraussetzung für immunmodulatorisch tumorfördernde Eigenschaften der Kynureninase sein, welche für die Inolamin-2,3-Dioxygenase bereits bekannt sind (Fallarino, et al., T cell apoptosis by tryptophan catabolism, 2002). Durch die Eigenschaft, von Tumorzellen sezerniert zu werden, erfüllt Kynureninase darüber hinaus ein unabdingbares Kriterium für einen potentiellen Tumormarker.

Funktionelle Erkenntnisse der Kynureninase im Tumorgeschehen konnten durch die im Rahmen vorliegender Arbeit durchgeführte Genstilllegung gewonnen werden. Hierzu wurde die Verfahrensweise der RNA-Interferenz gewählt. Die RNA-Interferenz ist eine weitverbreitete und moderne Methode zum Gen-Knockdown. Durch die wiederholte Anpassung dieser Methode mit dem Ziel bester methodischer Ergebnisse, konnte ein Knockdown von ca. 40% erreicht werden. Es kommen vielfältige Gründe für die limitierte Effizienz der Genstilllegung in Frage. Zunächst liegen Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien in der Suszeptibilität für Gentransfers vor. Da für die Zelllinie L3.6pl RES die eingeschränkte Empfänglichkeit für Gentransfers via chemischer Transfektionsmethoden, wie der Lipofektion, laborintern bekannt gewesen war, wurde in vorliegender Arbeit die retrovirale Transduktion bevorzugt. Ferner hängen die eingesetzte Menge an Viruspartikeln und die Effizienz des resultierenden Knockdowns voneinander ab. Mit zunehmender Kopienanzahl pro Genom nimmt die Effizienz des Knockdowns, aber auch die Wahrscheinlichkeit der Induktion von Nebeneffekten durch die Genintegration zu. Durch die Durchführung mehrerer Vorversuche zwecks der Ermittlung der optimalen Virusmenge, sowie dem Einsatz eines

Kontrollvektors, wurde versucht dieser Problematik zu begegnen. Auch bedingt die Reduktion des Gentranskripts nicht unbedingt gleichermaßen die Reduktion des Zielproteins, sowie das Auftreten funktioneller Ergebnisse. Dies liegt an der unterschiedlichen Kinetik der mRNA und Proteinexpression. Des Weiteren kann eine kompensatorische Stabilitätserhöhung der Translation auftreten. Auch von dem Zielprotein unabhängige, weitere Proteine könnten potentiell funktionelle Rollen des ausgeschalteten Proteins übernehmen. Um einen noch effizienteren Knockdown der Kynureninase zu erzielen, wäre der Einsatz einer weiteren Methode möglich. Eine neue Strategie zum Erreichen eines effizienteren Genknockdowns besteht in der Verwendung sogenannter TALENs (*activator-like effector nucleases*), spezifischer Endonukleasen, welche Gensequenzen an gewünschter Position eliminieren, oder CRISPR/CAS (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Jinek, et al., 2012). Dennoch konnte mit Hilfe der shRNA vermittelten Depletion der Kynureninase die tumorproliferative Wirkung dieser aufgezeigt werden. Der durch den Knockdown erreichte antiproliferative Effekt von bis zu 43,3% innerhalb von 96h zeigt die funktionelle Rolle der Kynureninase im Pankreaskarzinom. Es ist denkbar, dass die Proliferationsinhibition durch einen effizienteren Knockdown nochmals stärker ausgefallen wäre. Durch die Ergebnisse vorliegender Arbeit wird die Annahme gestärkt, dass die Überexpression der Kynureninase im Pankreaskarzinom mit vermehrtem Zellwachstum einhergeht. Eine Proliferationsinhibition der Karzinomzellen ist ebenfalls durch die Antagonisierung der im Tryptophanabbauweg beteiligten Enzyme Indolamin-2,3-Dioxygenase und Quinolinsäure-Phosphorybosyl-Transferase bekannt (Uyttenhove, et al., 2003), (Sawers, et al., 2014). Die hier beschriebenen Ergebnisse fügen sich somit gut in die bisherigen in der Fachliteratur beschriebenen Erkenntnisse über die Relevanz des Tryptophanstoffwechsels im Tumorgeschehen ein. Es wären vielfältige Mechanismen für die tumorproliferationsfördernde Eigenschaft der Kynureninase denkbar. Durch den exzessiven Abbau der Aminosäure Tryptophan könnte das Enzym zum Energiegewinn der Zellen beitragen. Des Weiteren mündet der Kynurenin-Abbauweg in der Synthese des Energielieferanten NAD^+ . NAD^+ ist ein wichtiger enzymatischer Kofaktor, auch für Enzyme der DNA-Reparatur, wie z.B. der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase. Enzyme der DNA-Reparatur tragen zur Bewältigung zellulären Stresses durch Noxen, wie Chemotherapeutika bei. Bei der untersuchten Zelllinie handelte es sich um eine chemotherapieresistente Karzinomlinie, welche durch die Kynureninase-Depletion unter fortlaufender chemotherapeutischer Behandlung an Wachstum einbüßte. Der beobachtete Effekt wäre demnach auch durch die Beteiligung der Kynureninase an Mechanismen der Chemotherapieresistenz zu erklären. Auch die Interaktion der Kynureninase mit Proteinen der

Zellzykluskontrolle wäre vorstellbar, zumal Kynureninase in den untersuchten Pankreaskarzinomzellen nukleär lokalisiert ist. Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis über die proliferationsfördernde Eigenschaft der Kynureninase im Pankreaskarzinom macht sie daher zu einem interessanten Ziel weiterer grundlagenwissenschaftlicher und klinischer Forschung, in dem Bestreben neue Ansatzpunkte für eine effektive Behandlung dieser Erkrankung zu finden.

Nachfolgend wurde der Einfluss der Kynureninase-Depletion auf das Migrationsverhalten der Karzinomzellen hin untersucht. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Migrationstendenz der inhibierten und nicht inhibierten Zellen feststellen. Da die Standardabweichung der Messwerte trotz der Auswertung durch zwei unabhängige Begutachter sehr hoch blieb, wurde der Versuch mit Hilfe einer weiteren Methode ausgewertet. Auch hierbei stellten sich keine positiven Ergebnisse ein. Eine experimentell bedingte Ursache für das Ausbleiben aussagekräftiger Messergebnisse wäre eine zu geringe Effizienz des Knockdowns für den Eintritt eines veränderten Migrationsverhaltens. Dies war bei der Messung der Zellproliferation jedoch nicht der Fall gewesen. Möglich wäre auch die Kompensation promigrativer Funktionen der Kynureninase durch weitere Proteine. Ein Nachteil der Methode und damit eine potentielle Fehlerquelle ist die nur punktuell mögliche Beurteilung der stattgefundenen Zellmigration zu einem festgelegten Endpunkt. Die Beobachtung der Dynamik der Zellmigration über eine Zeitdauer hinweg ist nicht möglich. Darüber hinaus ist das hier eingesetzte *in vitro*-Modell nur bedingt in der Lage, den komplexen Vorgang der Metastasierung nachstellen. Für aussagekräftigere Ergebnisse diesbezüglich wäre die Durchführung von *in vivo* Versuchen nötig.

Nur 25% der Pankreaskarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung operabel. Daher kommt der Chemotherapie ein großer Stellenwert bei der Behandlung dieser Erkrankung zu. Die dennoch sehr schlechte Prognose des inoperablen Pankreaskarzinoms wird durch die native und erworbene Resistenz gegenüber den eingesetzten Therapeutika bedingt. Ziel aktueller und zukünftiger Forschung ist daher die Identifikation molekularer Mechanismen der Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms, um diese therapeutisch gezielt auszuschalten. Um ferner einen Zusammenhang zwischen der Kynureninase und der Chemotherapieresistenz im Pankreaskarzinom zu untersuchen, wurde die mRNA und Proteinexpression dieser vor und nach der Behandlung weiterer Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Die Ergebnisse zeigten in einer von drei getesteten Linien (Panc-1) eine sehr starke, sowie in zwei Linien (BxPC3 und PaCa 5061) eine leichte Induktion der Kynureninase durch die Behandlung mit Gemcitabin.

Die Linie Panc-1 verfügt über eine native Chemotherapieresistenz und tolerierte die Behandlung in der Dosis von 0,5µM problemlos. Für diese Linie war vor der Durchführung vorliegender Versuche jedoch keine vermehrte Kynureninase-Expression nachgewiesen worden. Durch den Nachweis der über 8-fach gesteigerten Kynureninase-Expression konnte hier dennoch ein Zusammenhang mit der Chemotherapiebehandlung gefunden werden. Die Linie PaCa 5061 war ebenfalls gegenüber der Chemotherapiebehandlung mit Gemcitabin in gängigen Dosen unempfindlich (Kalinina, et al., 2010), verfügte aber ohnehin über eine stark erhöhte Kynureninase-Expression. Eine chemotherapieaffinere Linie ist BxPC3, welche über eine moderate Kynureninase-Expression verfügte, die sich leicht steigern ließ. Die beobachtete starke Überexpression durch die Linie Panc-1 konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Diese Ergebnisse machen die Beteiligung der Kynureninase an Mechanismen der Chemotherapieresistenz wahrscheinlich. Für die Indolamin-2,3-Dioxygenase ist die immununabhängige Förderung der Chemotherapieresistenz ebenfalls bereits bekannt (Vareki, et al., 2014). Weiterhin wird durch diese Resultate deutlich, dass Kynureninase nicht nur wie im Falle der Linie L3.6pl RES durch die lange, fortdauernde Chemotherapie konstitutiv, möglicherweise durch Selektion überexprimiert wird. Diese Ergebnisse offenbaren, dass die Expressionszunahme außerdem als eine akute Reaktion auf die Chemotherapie eintritt. Dies macht die zur gängigen Chemotherapie zusätzliche Inhibition der Kynureninase als weiter zu erforschende therapeutische Option denkbar.

Die Absicht vorliegender Arbeit war es ferner, Mechanismen zu finden, welche zur Aktivierung der Kynureninase führen, und den nachgewiesenen tumorproliferativen Effekt fördern könnten. Die Induktion der Enzyme des Kynureninstoffwechselwegs durch Interferon-γ war bereits beschrieben (Yoshida, Imanishi, Oku, Kishida, & Hayaishi, 1981) (Taylor & Feng, 1991) (Alberati-Giani, Ricciardi-Castagnoli, Köhler, & Cesura, 1996). Diese Beobachtung konnte nun für die Kynureninase im Pankreaskarzinom erweitert werden. Dadurch konnte weiterer Aufschluss über die Regulation der Genexpression dieses Enzyms im Pankreaskarzinom gewonnen werden. Im Falle der benignen Linie duktales Pankreasepithels, HPDE, war kein Anstieg der Kynureninase-Expression durch die Stimulation zu vermerken. In beiden Karzinomlinien konnte die ohnehin moderate bis starke Kynureninase-Expression zusätzlich gesteigert werden. Die stärkste Steigerung war in der chemotherapieresistenten Linie L3.6pl RES möglich. Hier zeigte sich bereits eine Induktion des Enzyms unter serumfreien Kulturbedingungen. Dieser Effekt ist als akute Reaktion der Zellen auf die Nährstoffdeprivation und dem damit verbundenen zellulären Stress zu werten, unter der Annahme, dass

Kynureninase den Zellen in dieser Situation Überlebensvorteile bietet. Das Zytokin Interferon- γ ist ein Aktivator der Immunantwort auf mikrobielle und virale Erreger. Es wird durch CD4 und CD8 positive T-Zellen durch die Aktivierung des T-Zellrezeptors durch Antigene ausgeschüttet. Auch Natürliche Killerzellen können Interferon- γ sezernieren und die Immunantwort verstärken. Die durch Interferon- γ vermittelten immunitätsfördernden Effekte werden unter anderem durch die Aktivierung von Phagozyten, oder die vermehrte Präsentation von MHC-I und -II Molekülen erreicht. Somit kommt Interferon- γ eine wichtige Rolle in der Bewältigung von Infektionskrankheiten zu (Boehm, Klamp, Groot, & Howard, 1997). Überdies besitzt das Zytokin eine antitumorale Wirkung (Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Neben der vermutlich auch immunabhängigen antitumoralen Wirkung von IFN- γ *in vivo* (Dighe, Richards, Old, & Schreiber, 1994), besitzt das Zytokin auch vom Immunsystem unabhängige antiproliferative und pro-apoptotische Qualitäten. Diese werden unter anderem durch die STAT Aktivierung und die daraus resultierende p21 Expression erzielt (Chin, Kitagawa, Su, You, & Iwamoto Y, 1996). Andererseits steht die IFN- γ unterstehende IDO Expression wiederum mit Mechanismen der Immunresistenz in Zusammenhang (Fallarino, et al., T cell apoptosis by tryptophan catabolism, 2002), (Frumento, et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch IFN- γ gesteigerte IDO Expression dendritischer Zellen die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Reg-Zellen fördert (Jürgen, Hainz, Fuchs, Felzmann, & Heitger, 2009). Somit wäre es denkbar, dass auch die durch IFN- γ gesteigerte Expression von Kynureninase den überwiegend antitumoralen Effekten des Zytokins entgegenwirkt. Daraus könnten sich Überlebensvorteile für Pankreaskarzinomzellen vor allem unter steter Bekämpfung durch Zellen des Immunsystems ergeben. Ein solcher Mechanismus wäre gerade durch die festgestellte Sekretion des Enzyms denkbar. Potentiell könnte auch hierdurch der Abbau der für Immunzellen wichtigen Aminosäure Tryptophan zu toxischen Metaboliten vorangetrieben werden. Um einen supprimierenden Effekt der Kynureninase auf Immunzellen zu untersuchen, bedürfte es weiterer Ko-Kultur-Experimente bzw. *in vivo* Mausmodel-Versuche.

Neben der chemotherapeutischen Behandlung wurde auch die Hypoxie, als weitere Form zellulären Stresses im Zusammenhang mit der Kynureninase-Expression untersucht. Hypoxie verhindert die Apoptose von Tumorzellen, verstärkt Rezeptortyrosinkinasen vermittelte Signalwege, fördert die Angiogeneese, die Epithelial-Mesenchymale-Transition, die Metastasierung und supprimiert Immunreaktionen (Wilson & Hay, 2011). Diese Effekte werden zum einen durch die Akkumulation des Hypoxie-induzierten-Faktors (HIF-1,-2) vermittelt, welcher als Transkriptionsfaktor agiert. Unter normaler Sauerstoffversorgung ist

HIF hydroxiliert und wird durch das Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein abgebaut. Weitere Signalkaskaden werden durch die Auslösung der sogenannten Antwort auf ungefaltete Proteine (*Unfolded Protein Response*, UPR) aktiviert. Hypoxie führt zur Ansammlung fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum. Die sogenannte *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK), sowie das *Inositol-requiring-enzyme-1* (IRE1) sind hieran beteiligt (Wilson & Hay, 2011). In vorliegender Arbeit konnte das vermehrte Vorkommen des Kynureninase-Proteins sowohl intrazellulär, als auch im sezernierten Kulturmedium, nach vorheriger Inkubation der Karzinomzellen unter Hypoxie nachgewiesen werden. Dabei stieg die Menge sezernierten Proteins mit der Zunahme der Zeit unter hypoxischen Wachstumsbedingungen. Bekannt ist eine mit dem schlechten Oxygenierungsstatus einhergehende Chemo- und Radiotherapieresistenz solider Tumoren (Cosse & Michiels, 2008). Ein durch Kynureninase vermittelter Mechanismus, der einen Überlebensvorteil der Tumorzellen unter Hypoxie bedeuten könnte, wäre die vermehrte Bereitstellung intrazellulären NAD^+ s. Der vermehrte Abbau von Tryptophan, unter anderem durch Kynureninase könnte intrazelluläre Energiepools auf alternativem Stoffwechselweg auffüllen. Im Gegensatz zum intra- und extrazellulären Proteingehalt, nahm die Menge an für Kynureninase kodierender mRNA unter hypoxischen Wachstumsbedingungen ab. Somit war die Zunahme an Kynureninase-Protein nicht direkt durch die Transkriptionsförderung durch Transkriptionsfaktoren wie HIF zu erklären. Eine Erhöhung der Kynureninase Menge könnte durch die verbesserte Proteinstabilisierung, oder den verminderte Abbau von Kynureninase im Proteasom bedingt sein. Diese Vermutungen sind bislang jedoch spekulativ und bedürfen weiterer experimenteller Abklärung.

Ein weiteres Ziel vorliegender Arbeit an diesem Enzym ist die Entschlüsselung molekularer Mechanismen, über welche Kynureninase seine tumorfördernden Wirkungen entfaltet, was auch möglicherweise Gegenstand zukünftiger Arbeiten werden kann. Eine Erklärung für deren proliferationsfördernde Wirkung, die Beteiligung an Mechanismen der Chemotherapieresistenz und die vermehrte Präsenz unter Hypoxie ist die Rolle von Kynureninase als Energielieferant unter erschwerten Überlebensbedingungen. Der Abbau der Stoffwechselprodukte der Kynureninase mündet in der Synthese von NAD^+ , eines essentiellen Energieträgers. Diesem kommt besonders in der Bewältigung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu. Jedoch ist auch die Einflussnahme des Enzyms auf proliferationsfördernde und anti-apoptotisch wirkende Signalkaskaden möglich. Auch klassenuntypische weitere Funktionen des Enzyms außer dem Abbau von Kynurenin wären möglich. So spräche insbesondere die vorgefundene

Kernlokalisation der Kynureninase für weitere Funktionen außerhalb des Aminosäure-Stoffwechsels. Die Entfaltung tumorfördernder Eigenschaften könnte somit durch die Einflussnahme der Kynureninase auf tumorfördernde Signalkaskaden geschehen. Um nach Interaktion zwischen Kynureninase und zu diesen Signalwegen zugehörigen Proteinen zu suchen, wurden Immunpräzipitationen an Lysaten aus L3.6pl RES Zelllinien durchgeführt. Die Immunpräzipitation ist eine schnelle Methode zur Identifikation neuer Proteininteraktoren und kann zunächst viele, für eine Interaktion in Frage kommende Proteine identifizieren. Daher sollten die Interaktion zwischen den ausfindig gemachten Proteinen und Kynureninase einzeln und spezifisch reproduziert werden. Die Suche nach Proteininteraktoren der Kynureninase sollte also einen Ausblick geben, und Ansatzpunkte für noch folgende Forschung an diesem Protein liefern. Die Bestätigung der erfolgreichen Anreicherung der Kynureninase durch die Immunpräzipitation war mittels Western-Blot leider nicht möglich. Die Laufhöhe der Kynureninase im SDS Gel deckte sich mit der Laufhöhe der schweren IgG-Antikörperkette, sodass die Detektion von Kynureninase-Banden experimentell bedingt nicht möglich war. Nichtsdestotrotz lieferte die massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden im SDS-Gel vielversprechende Ergebnisse. Hierbei wurde der Fokus auf die Suche nach Proteinen gerichtet, welche bekanntermaßen im Zusammenhang mit dem Tumorgeschehen, ferner der Zellzyklusregulation und der Chemotherapieresistenz stehen. Ein vielversprechendes Protein, dessen Interaktion mit Kynureninase in diesem Versuch festgestellt wurde ist BCCIP, das BRCA2 und CDKN1A-interagierende Protein. BCCIP inhibiert das Tumorstadium von Brust- und Hirntumorzelllinien (Liu J. , Yuan, Huan, & Shen, 2001). Es ist ein Tumorsuppressor und Kofaktor von BRCA2 (Liu J. , Yuan, Huan, & Shen, 2001). BRCA2 leitet durch die Bindung an RAD51 die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA ein (Thurslund & West, 2007). Mutationen im BRCA2 Gen erhöhen das Risiko für die Erkrankung an Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen (Couch, et al., 2007). Außerdem interagiert BCCIP mit dem CDK-Inhibitor-1 (CDKN1A) und vermindert auf diesem Wege das Zellwachstum (Meng, Liu, & Shen, 2004). Die Einflussnahme von Kynureninase auf BCCIP würde somit die beobachteten Effekte der Kynureninase erklären und würde im Einklang mit weiteren Ergebnissen vorliegender Arbeit stehen. Die Interaktion zwischen Kynureninase und BCCIP sowie den im Folgenden diskutierten zwei identifizierten Proteinen, ist in anderem Zusammenhang bereits beschrieben worden (Kristensen, Gsponer, & Foster, 2012). Damit ist der Nachweis über die Interaktion zwischen BCCIP und Kynureninase bereits unabhängig reproduziert worden. Als weiterer möglicher Interaktor wurde die Guanindesaminase (GDA) identifiziert. Die Guanindesaminase katalysiert die Desaminierung von Guanin zu Xanthin. Die Relevanz der

Guanindesaminase im Aufbau von Mikrotubuli konnte bereits nachgewiesen werden (Akum, et al., 2004). In der Krebstherapie kommt den Mikrotubuli eine besondere Bedeutsamkeit zu. Gängige Chemotherapeutika, darunter Vincristin oder Paclitaxel setzen therapeutisch an diesen Strukturen an und üben so ihre Wirkung als Mitosegifte aus. Die Entfaltung der Wirkung der Kynureninase durch die Interaktion mit der Guanindesaminase ist spekulativ und bedürfte weiterer experimenteller Abklärung. Jedoch ist auch für dieses Protein die Interaktion mit Kynureninase bereits von dieser Arbeit unabhängig festgestellt worden (Kristensen, Gsponer, & Foster, 2012). Ebenfalls wurde die Interaktion von Kynureninase mit CHORDC1, dem Cystein- und Histidin-reiche Domänen enthaltenden Protein 1, reproduziert. CHORDC1 ist sowohl als Proto-Onkogen als auch als Tumorsuppressorgen beschrieben. CHORDC1 ist in vielen Mammakarzinomzelllinien supprimiert. Die Herabregulation von CHORDC1 führte in murinen Fibroblasten durch die Steigerung der ROCK II Kinase Aktivität zu einer vermehrten Amplifikation der Zentrosomen. Außerdem erleichterte die CHORDC1 Reduktion die onkogene Transformation von Fibroblasten. In Mamma- und Bronchialkarzinomzellen konnte die gehäufte Suppression dieses Proteins gezeigt werden (Ferretti R. , et al.). CHORDC1 ist ein mit Heat-Shock-Protein-90 assoziiertes Protein (Wu, Luo, Jiang, & Li, 2005). Umgekehrt konnte auch eine onkogene Wirkungskomponente des Proteins gezeigt werden. In wenigen, CHORDC1 stark überexprimierenden Tumoren waren fortgeschrittene Tumorstadien und ein fortgeschrittener Lymphknotenbefall nachweisbar. Die Überexpression von CHORDC1 konnte in Brustkrebszelllinien die PTEN Expression erhöhen und die Zellen gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung sensibilisieren. Diese Effekte wurden über die Einflussnahme von CHORDC1 auf den PI3K/AKT Signalweg erreicht (Fusella, et al., 2014). Die Interaktion mit Kynureninase könnte auch im Falle dieses Proteins eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse sein. Die Interaktion zwischen Kynureninase und den drei letztgenannten Proteinen BCCIP, GDA und CHORDC1 ist bereits publiziert worden, wodurch die Validität der vorliegenden Ergebnisse erhöht wird. Überdies wurden im Rahmen vorliegender Arbeit zwei weitere, mögliche Proteininteraktoren identifiziert. Die Carbonylreduktase (CB1) ist ein zytoplasmatisches, von NADPH abhängiges Enzym, welches Carbonylbestandteile abbaut. Dabei katalysiert das Enzym unter anderem die Reduktion von Prostaglandinen, Steroiden und Xenobiotika (Forrest & Gonzalez, 2000). Die Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit für Carbonylreduktase kodierender cDNA erhöhte deren Chemotherapieresistenz gegenüber Daunorubicin (Plebuch, Soldan, Hungerer, Koch, & Maser, 2007). Zuletzt wurde auch die Gluthation-S-Transferase P (GSTP1) als möglicher Proteininteraktor mit Kynureninase gefunden. GSTP1 katalysiert die Bindung von reduziertem

Glutathion an Xenobiotika und besitzt somit eine Funktion als Entgiftungsenzym. Einige genetische Polymorphismen von GSTP1 erhöhen die Suszeptibilität für Krebserkrankungen (Harries, Stubbens, Forman, Howard, & Wolf, 1997). Außerdem erhöht die Herabregulation dieses Enzyms die Sensitivität von Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung mit Cis- oder Carboplatin (Sawers, et al., 2014). Die Identifikation dieser fünf potentiellen Proteininteraktoren eröffnet den Ausblick für weitere Forschung an der Kynureninase. Vor allem die Interaktionen von Kynureninase mit BCCIP oder CHORDC1, könnten einen Wirkungsmechanismus des Enzyms darstellen. Um dies zu belegen, wäre weiterhin die spezifische, experimentelle Bestätigung dieser Interaktionen notwendig.

In vorliegender Arbeit konnte bislang die Überexpression der Kynureninase in chemotherapieresistenten Pankreaskarzinomlinien, die Zunahme der Kynureninase-Expression unter Chemotherapie und die durch die Reduktion der Kynureninase vermittelte Abnahme der Zellproliferation unter Chemotherapie gezeigt werden. Somit konnte mit der Kynureninase ein potentielles Ziel zukünftiger Forschung und Therapie des Pankreaskarzinoms identifiziert und molekularbiologisch charakterisiert werden. In diesem Bestreben wäre weitere experimentelle Forschung an der Kynureninase nötig. So wäre es zunächst denkbar, die immunhistochemische Analyse von Kynureninase in Gewebeproben in größerem Maßstab durchzuführen. Mit Hilfe eines *Tissue-Microarrays* wäre es möglich die Kynureninase-Expression in Resektaten des Pankreas im Hochdurchsatzverfahren mit weiteren klinisch relevanten Verlaufsdaten zu vergleichen, in der Hoffnung auf signifikante Korrelationen mit der Dignität des Tumors, dessen Ausbreitung oder dem Patientenüberleben. Als sezerniertes und möglicherweise mit der Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms assoziiertes Protein verfügt Kynureninase über die Voraussetzungen für einen potentiellen Tumormarker. Es sind bereits Tumormarker bekannt, welche prognostische Relevanz für die Behandlung von am Pankreaskarzinomen erkrankten Patienten mit Gemcitabin besitzen. HENT1, der humane equilibrative Nucleoside-Transporter 1, ist ein kernmembranständiger Transporter, durch welchen Gemcitabin in die Kerne der Krebszellen gelangt (García-Mangeiga, Molina-Arcas, Casado, Mazo, & Pastor-Anglada, 2003). Die Expression von HENT1 korreliert mit dem Ansprechen auf die Therapie mit Gemcitabin und dem Gesamtüberleben unter Behandlung (Wang, Word, & Lyn-Cook, 2011) (Farrell, et al., 2009) (Maréchal, et al., 2009). Die Deoxycytidinkinase, dCK, überführt das *Prodrug* Gemcitabin durch Phosphorylierung in den entsprechend aktiven Metaboliten. Niedrige dCK Mengen gehen mit einem reduzierten Gesamtüberleben unter

chemotherapeutischer Behandlung einher (Sebastiani, et al., 2006). In ähnlicher Weise könnte auch die Messung von Kynureninase im Patientenserum Aufschluss über das Ansprechen auf eine Chemotherapie geben. Um einen solchen Zusammenhang zu bestätigen, könnten die Mengen an Kynureninase im Patientenserum mittels ELISA bestimmt und mit klinisch-prognostischen Daten und dem Überleben unter der Behandlung mit Gemcitabin verglichen werden. Darüber hinaus wäre die weitere Forschung am Wirkungsmechanismus der Kynureninase zum Verständnis molekularer Mechanismen der Chemotherapieresistenz im Pankreaskarzinom wichtig. Zunächst wäre es möglich, den intrazellulären NAD^+ Gehalt der Zellen vor und nach der Kynureninase-Depletion zu bestimmen. Somit könnte die Beeinflussung des NAD-Stoffwechsels durch die Kynureninase als Ursache für die erhöhte Proliferation und Chemotherapieresistenz der Karzinomlinien bestätigt werden. Um den genauen Wirkungsmechanismus der Kynureninase zu entschlüsseln, wäre es weiterhin denkbar, die gefundenen Interaktoren spezifisch auf funktionelle Einflüsse im Tumorgeschehen hin zu analysieren. Dazu wäre es zunächst möglich die identifizierten Proteine selbst im Zelllysatz anzureichern, um kopräzipitierte Kynureninase zu suchen. Den Wirkungsmechanismus der Kynureninase zu verstehen, könnte Grundlage für folgende *in vivo* Versuche sein. So wäre es möglich, immunvermittelte Funktionen der Kynureninase zu identifizieren und zu charakterisieren. Diese sind für Enzyme des gleichen Stoffwechselweges bereits beschrieben und tragen in größtem Umfang zu deren tumorproliferativen Effekten bei. Um einen Ausblick auf eine therapeutische Relevanz zu geben, könnten in diesem Rahmen chemische Inhibitoren der Kynureninase, wie O-Methylbenzoylalanin synthetisiert und auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen im Mausmodell getestet werden. Zusammenfassend konnte mit der Kynureninase in vorliegender Arbeit ein Vermittler der Proliferation und möglicherweise der Chemoresistenz im Pankreaskarzinom gefunden werden. Um die Wirkungsweise der Kynureninase genauer zu verstehen, wäre weitere experimentelle Forschung an diesem Enzym einschließlich zusätzlicher *in vivo*-Versuche nötig. Die gezielte Antagonisierung der Kynureninase könnte von therapeutischen Nutzen für am Pankreaskarzinom leidende Patienten werden.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1 Tumorprogressionsmodel des Pankreas (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000).	3
Abb. 1.3.1 Tryptophanstoffwechsel.	7
Abb. 1.4.1 Tertiärstruktur humaner Kynureninase (Lima, Kristoforov, Momany, & Phillips, 2007).	11
Abb. 1.4.2 Durch Kynureninase katalysierte Reaktion von Kynurenin zu Anthranilsäure und Alanin (Heiss, Anderson, & Phillips, 2003).	12
Abb. 4.1.1 Western-Blot der Kynureninase-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien.	48
Abb. 4.1.2 Real-Time-PCR Daten der Kynureninase-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien.	48
Abb. 4.2.1 Immunhistochemische Darstellung der Kynureninase in Pankreaskarzinomgewebe.	49
Abb. 4.2.2 Graphische Darstellung der Kynureninase-Expression in Patientengewebeschnitten.	51
Abb. 4.3.1 Immunzytochemische Darstellung von Kynureninase in den Zelllinien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.	52
Abb. 4.3.2 Zellfraktionierung aus Proteinlysaten der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.	53
Abb. 4.3.3 Deglykosylierung der Zellfraktionen der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES.	54
Abb. 4.4.1 Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium.	55
Abb. 4.5.1 Kynureninase-Depletion in der Linie L3.6pl RES.	56
Abb. 4.5.2 Einfluss der Kynureninase-Depletion auf die Proliferation von L3.6pl RES Zellen unter chemotherapeutischer Behandlung.	57
Abb. 4.6.1 Einfluss der Kynureninase-Depletion auf die Zellmigration von L3.6pl RES Zellen.	59
Abb. 4.7.1 Kynureninase-mRNA-Expression in Panc-1, BxPC3 und Paca 5061 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 0,5µM bzw. 0,25µM Gemcitabin.	60
Abb. 4.7.2 Kynureninase-Proteinexpression nach 72-stündiger Inkubation von Panc-1 Zellen mit 0,5µM Gemcitabin.	61
Abb. 4.8.1 Kynureninase-Expression nach Serumentzug und Behandlung mit Interferon-γ.	63
Abb. 4.9.1 Western-Blot der Linien HPDE, L3.6pl WT und L3.6pl RES nach 48h unter hypoxischen, normoxischen, serumfreien und serumhaltigen Wachstumsbedingungen.	65
Abb. 4.9.2 Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium nach Inkubation im normoxischen und hypoxischen Wachstumsmilieu.	66
Abb. 4.9.3 Western-Blot der Kynureninase im Zellkulturmedium von L3.6pl Karzinomzellen nach Inkubation im hypoxischen Wachstumsmilieu nach 24, 48 und 72 Stunden.	66
Abb. 4.10.1 Immunpräzipitation zur Identifikation neuer Proteininteraktoren der humanen Kynureninase.	68

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1.1 Liste der verwendeten Geräte.....	17
Tab. 3.1.2 Liste der verwendeten Materialien.....	18
Tab 3.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien.....	20
Tab. 3.1.4 Liste der verwendeten Lösungen und Medien.	21
Tab. 3.1.5 Liste der verwendeten Antikörper.	21
Tab. 3.1.6 Liste der verwendeten shRNA und Plasmide.	22
Tab. 3.1.7 Liste der verwendeten Zytokine.	22
Tab. 3.1.8 Liste der verwendeten Herstellerkits.	22
Tab 3.1.9 Liste der verwendeten Primer.	23
Tab. 3.1.10 Liste der verwendeten Bakterienstämme.....	23
Tab. 3.3.1 Beschreibung des verwendeten Real-Time-PCR Programms: Zyklussequenz, Zeit- und Temperaturprofil.	29
Tab. 4.2.1 Kynureninase-Expression in Patientengeweben.	50
Tab. 4.10.1 Liste potentieller, experimentell identifizierter Proteininteraktoren der humanen Kynureninase.	69

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten bekannten Tumorentitäten, woraus über Jahrzehnte klinischen Fortschritts hinweg weiterhin beinahe ebenso hohe Mortalitäts- wie Inzidenzraten dieser Erkrankung resultieren. Das Fehlen von Frühsymptomen, das schnelle infiltrative und metastasogene Wachstum dieses Tumors, sowie das schlechte Ansprechen auf herkömmliche Chemotherapieregime, stellen höchste Ansprüche an die interdisziplinäre Behandlung betroffener Patienten.

In unseren Studien wurde erstmalig die robuste Überexpression des am Tryptophanabbau maßgeblich beteiligten Enzyms Kynureninase in einem Großteil untersuchter Pankreaskarzinome enthüllt. Diese Studien wurden zur gegenseitigen Verifikation an Zellmaterial aus Kultur, sowie an Resektaten am Pankreas operierter Patienten durchgeführt. Hieraus erfolgt die Erkenntnis über die augmentierte Kynureninase-Expression vieler Karzinome gegenüber benignem Pankreasepithel, wie auch den Expressionszuwachs im Rahmen des Erwerbs der Chemotherapieresistenz gegenüber Gemcitabin bei Pankreaskarzinomzellen *in vitro*. Zur weiteren Charakterisierung wurde mit Hilfe von Immunzytologie und subzellulärer Proteinanalyse die Präsenz des Enzyms im Zytoplasma, wie auch im Zellkern, insbesondere imponierend im Falle der chemotherapieresistenten Pankreaskarzinomzellen, dargelegt. Auch ein extrazelluläres Vorkommen der Kynureninase wurde in ansteigendem Maße für Karzinomzellen und chemotherapieresistente Karzinomzellen, deckungsgleich zu den zuvor intrazellulär beobachteten Proteinverhältnissen, demonstriert. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Expression der Kynureninase im Pankreas vom Zytokin Interferon- γ , wie bereits für weite Teile des Stoffwechselweges beschrieben gewesen, bewiesen. Funktionelle Aufschlüsse über die Rolle der Kynureninase im Pankreaskarzinom ergab die Herabregulation dieser mittels shRNA. Die Blockade der Kynureninase-Expression führte in untersuchten Zellen zu einer signifikanten Proliferationshemmung unter fortwährender Behandlung mit Gemcitabin. Die Identifikation neuer Kynureninase-interagierender Proteine im Pankreaskarzinom gibt Ausblick auf experimentell zu belegende molekulare Wirkungsweisen der Kynureninase, abgesehen von der Mitwirkung bei der Bereitstellung des Energielieferanten NAD^+ . Die erhobenen Beobachtungen lassen die in diesem Kontext bislang vernachlässigte Kynureninase, als potentiellen Tumormarker und möglichen Mediator von Resistenzmechanismen gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung, und damit in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht, zu einem neuen Anhaltspunkt für weitere Forschung avancieren.

Abstract

Pancreatic cancer is among the most lethal diseases worldwide, still exhibiting almost equal mortality as incidence rates in spite of clinical advances over the last decades. The absence of early symptoms, rapid infiltrative and metastatic growth as well as the weak response of this tumour entity to common chemotherapeutic regimes demand high standards of interdisciplinary therapy.

Our study revealed for the first time the robust overexpression of kynureninase, an enzyme involved in the tryptophan degradation pathway, in pancreatic carcinomas. For mutual verification, this study was conducted with cells in culture and with specimen of patients who had undergone pancreatectomy at the university hospital Hamburg-Eppendorf. Our here shown results provide further insights into the augmented kynureninase-expression levels of cancer cells in comparison to benign epithelia of the pancreas, and the increment of expression of pancreatic cancer cells during acquisition of chemoresistance towards gemcitabine *in vitro*. For further characterisation, the presence of kynureninase in the cytoplasm and nucleus, impressively in case of chemoresistant cells, was shown by immunocytochemistry and subcellular protein fractionation. Even the extracellular secretion of kynureninase, with increased amounts for cancer cells and chemoresistant cancer cells was demonstrated, showing coherence with prior results. Additionally, the dependency between kynureninase-expression and stimulation with IFN- γ , as generally assumed for proteins involved in tryptophan degradation, was substantiated. For functional analysis of the role of kynureninase in pancreatic cancer, a shRNA mediated knockdown strategy was performed. The blockade of kynureninase expression in pancreatic cancer cells resulted in significantly decreased proliferation rates following chemotherapeutic treatment with gemcitabine in the analyzed cells. The identification of new kynureninase-interacting proteins in pancreatic cancer gives an outlook on prospective experiments for further characterisation of molecular mechanisms of kynureninase beyond its known impact by providing cells with the energy supplier NAD⁺. Taken together, these results define kynureninase as a potential tumour marker and mediator of chemoresistance and suggest novel strategies for further research on pancreatic cancer with respect to both diagnosis and therapy of this lethal disease.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, S., Teo, C., McDonald, K. L., Zinger, A., Bustamante, S., Lim, C. K., . . . Guillemin, G. J. (2014). Involvement of the Kynurenine Pathway in Human Glioma Pathophysiology. *Plos One*, 9(11).
- Akum, B. F., Chen, M., Gunderson, S. I., Riefler, G. M., Scerri-Hansen, M. M., & Firestein, B. L. (2004). Cypin regulates dendrite patterning in hippocampal neurons by promoting microtubule assembly. *Nature Neuroscience*, 7(2), S. 145-152.
- Alberati-Giani, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Köhler, C., & Cesura, A. M. (1996). Regulation of the Kynurenine Metabolic Pathway by Interferon- γ in Murine Cloned Macrophages and Microglial Cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), S. 996-1004.
- Alberati-Giani, D., Buchli, R., Malherbe, P., Broger, C., Lang, G., Köhler, C., . . . Cesura, A. M. (1996). Isolation and expression of a cDNA clone encoding human kynureninase. *European Journal of Biochemistry*, 239(2), S. 460-468.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant c-K-ras Genes. *Cell*, 53(4), S. 549-554.
- Aune, D., Greenwood, D. C., Chan, D. S., Vieira, R., Vieira, A. R., Navarro Rosenblatt, D. A., . . . Norat, T. (2012). Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology*, 23(4), S. 843-852.
- Bayer, E. A., Skutelsky, E., & Wilchek, M. (1979). The Avidin-Biotin Complex in Affinity Cytochemistry. *Methods in Enzymology*, 62, S. 308-15.
- Beard Shall, K., Morarji, Y., Bloom, S. R., Frost, G., Domin, J., & Calam, J. (1989). Saturation of fat and cholecystokinin release: Implications for pancreatic carcinogenesis. *The Lancet*, 2(8670), S. 1008-1010.
- Bellac, C. L., Coimbra, R. S., Christen, S., & Leib, S. L. (2006). Pneumococcal meningitis causes accumulation of neurotoxic kynurenine metabolites in brain regions prone to injury. *Neurobiology of Disease*, 24(2), S. 395-402.

- Bellac, C. L., Coimbra, R. S., Christen, S., & Leib, S. L. (2010). Inhibition of the Kynurenine-NAD⁺ Pathway Leads to Energy Failure and Exacerbates Apoptosis in Pneumococcal Meningitis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 69(11), S. 1096-1104.
- Belladonna, M. L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M. T., . . . Puccetti, P. (2008). Cutting Edge: Autocrine TGF- β Sustains Default Tolerogenesis by IDO-Competent Dendritic Cells¹. *The Journal of Immunology*, 181(8).
- Böcker, W., Denk, H., & Heitz, P. U. (2004). *Pathologie*. Urban & Fischer in Elsevier.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annual Review of Immunology*, 15, S. 749-495.
- Bomsel, M., & Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), S. 57-68.
- Breillout, F., Halida, F., Echinard-Garin, P., Lasceaux, V., & Poupon, M. F. (1987). Decreased rat rhabdomyosarcoma pulmonary metastases in response to a low methionine diet. *Anticancer Research*, 7(4B), S. 861-867.
- Bruns, C. J., Harbison, M. T., Kuniyasu, H., Eue, I., & Fidler, I. J. (1999). In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Neoplasia*, 1(1), S. 50-62.
- Bundesamt für Verbraucherschutz. (2011). *Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren*.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), S. 195-203.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), S. 642-655.

- Cellarier, E., Durando, X., Vasson, M. P., Farges, M. C., Demiden, A., Maurizis, J. C., . . . Chollet, P. (2003). Methionine dependency and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 29(6), S. 489-499.
- Chiarugi, A., Calvani, M., Meli, E., Traggiai, E., & Moroni, F. (2001). Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 120(1-2), S. 190-198.
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., & Iwamoto Y, X. Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*, 272(5262), S. 719-722.
- Christensen, M., Duno, M., Lund, A. M., Skovby, F., & Christensen, E. (2007). Xanthurenic aciduria due to a mutation in KYNU encoding kynureninase. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(2), S. 248-255.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbour (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cosse, J. P., & Michiels, C. (2008). Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(7), S. 790-797.
- Couch, F. J., Johnson, M. R., Rabe, K. G., Brune, K., de Andrade, M., Goggings, M., . . . Hruban, R. H. (2007). The Prevalence of BRCA2 Mutations in Familial Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16(2), S. 342-346.
- Cubilla, A. L., & Fitzgerald, P. J. (1985). Cancer of Exocrine Pancreas: The Pathologic Aspects. *Cancer Journal for Clinicians*, 35(1), S. 2-18.
- Cui, Y., & Andersen, D. K. (2012). Diabetes and pancreatic cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 19(5), S. 9-26.
- Day, J. D., Diguseppe, J. A., Yeo, C., Lai-Goldmann, M., Anderson, S. M., Goodman, S. M., . . . Hruban, R. H. (1996). Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Human Pathology*, 27(2), S. 119-124.

- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*, 1(6), S. 447-456.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., . . . Puccetti, C. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation*, 9, S. 1069-1077.
- Farrell, J. J., Elsaleh, H., Garcia, M., Lai, R., Ammar, A., Regine, W. F., . . . Mackey, J. R. (2009). Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Levels Predict Response to Gemcitabine in Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 136(1), S. 187-195.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden. *International Journal of Cancer*, 127(12), S. 2893-2917.
- Ferretti, R., Palumbo, V., Di Savino, A., Velasco, S., Sbroggiò, M., Sportoletti, P., . . . Brancaccio, M. Morgana/chp-1, a ROCK inhibitor involved in centrosome duplication and tumorigenesis. *Developmental Cell*, 18(3), S. 486-495.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), S. 806-811.
- Forrest, G. L., & Gonzalez, B. (2000). Carbonyl reductase. 129(1-2), S. 21-40.
- Fritzgerald, D. H., Muirhead, K. M., & Botting, N. P. (2001). A comparative study on the inhibition of human and bacterial kynureninase by novel bicyclic kynurenine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(4), S. 983–989.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., & Ferrera, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), S. 459-468.
- Fusella, F., Ferretti, R., Recupero, D., Rocca, S., Di Savino, A., Tornillo, G., . . . Brancaccio, M. (2014). Morgana acts as a proto-oncogene through inhibition of a ROCK–PTEN pathway. *Pathology*, 234(2), S. 152-163.

- García-Mangeiga, J., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (15. Oktober 2003). Nucleoside Transporter Profiles in Human Pancreatic Cancer Cells: The Role of hCNT1 in 2',2'-Difluorodeoxycytidine Induced Cytotoxicity. *Clinical Cancer Research*, 9(13), S. 5000-5008.
- Goode, G., Pratap, S., & Eltom, S. E. (7 2014). Depletion of the Aryl Hydrocarbon Receptor in MDA-MB231 Human Breast Cancer Cells Altered the Expression of Genes in Key Regulatory Pathways of Cancer. *Plos One*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0100103. eCollection 2014
- Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G., & Bockhorn, M. (2013). Pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), S. 849-854.
- Güngör, C., Zander, H., Effenberger, K. E., Vashist, Y. K., Kalinina, T., Izbicki, J. R., . . . Bockhorn, M. (2011). Notch Signaling Activated by Replication Stress-Induced Expression of Midkine Drives Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 71(14), S. 559-5019.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., & Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews. Genetics*, 2(2), S. 110-119.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), S. 244-251.
- Harries, L. W., Stubbens, M. J., Forman, D., Howard, G. C., & Wolf, C. R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18(4), S. 614-644.
- Heiss, C., Anderson, J., & Phillips, R. S. (2003). Differential effects of bromination on substrates and inhibitors of kynureninase from *Pseudomonas fluorescens*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(2), S. 288-295.
- Heyes, M. P., Chen, C. Y., Mayor, E. O., & Saito, K. (1997). Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochemical Journal*, 326(2), S. 351-356.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), S. 413-416.

- Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Munn, D. H., Walchok, J. D., & Allison, J. P. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *Journal of Experimental Medicine*, 210(7), S. 1389-1402.
- Horner, M. J., Ries, L. A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., & Howlader, N. (2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005 http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/. National Cancer Institute [online].
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., . . . Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. *American Journal of Surgical Pathology*, 25(5), S. 279-586.
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(8), S. 2969-2972.
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), S. 95-109.
- Inada, J., Okuno, E., Kimura, M., & Kido, R. (1984). Intracellular Localisation and characterisation of 3-Hydroxykynureninase in Human Liver. *International Journal of Biochemistry*, 16(6), S. 623-628.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393(4), S. 535-545.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), S. 816-821.
- Jose, D. G., & Good, R. A. (1973). Quantitative Effects of nutritional essential Amino Acid Deficiency upon Immune Responses to Tumors in Mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 1, S. 1-9.

- Judde, J., Ellis, M., & Frost, P. (1989). Biochemical Analysis of the Role of Transmethylation in the Methionine Dependence of Tumor Cells. *Cancer Research*, 49(17), S. 4859-4865.
- Jürgen, B., Hainz, U., Fuchs, D., Felzmann, T., & Heitger, A. (2009). Interferon- γ -triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood*, 114(15), S. 3235-43.
- Kalinina, T., Güngör, C., Thielges, S., Möller-Krull, M., Penas, E. M., Wicklein, D., . . . Yekebas, E. F. (2010). Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*, 10:295. doi:10.1186/1471-2407-10-295
- Klein, A. P., Brune, K. A., Petersen, G. M., Goggings, M., Tersmette, A. C., Offerhaus, G. J., . . . Hruban, R. H. (2004). Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Research*, 64(7), S. 2634-2638.
- Klein, A. P., Hruban, R. H., Brune, K. A., Petersen, G. M., & Goggings, M. I. (2001). Familial pancreatic cancer. *Cancer Journal*, 7(4), S. 266-273.
- (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe*. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. .
- Kristensen, A. R., Gsponer, J., & Foster, L. J. (2012). A high-throughput approach for measuring temporal changes in the interactome. *Nature Methods*, 9(9), S. 907-909.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5258), S. 680-685.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K. (2013). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.
- Lichtenfels, R., Biddison, W. E., Schulz, H., Vogt, A. B., & Martin, R. (1994). CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved. *Journal of Immunological Methods*, 172(2), S. 227-239.
- Lieber, M., Mazetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., & Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer*, 15(5), S. 141-147.

- Lima, S., Kristoforov, R., Momany, C., & Phillips, R. S. (2007). Crystal Structure of Homo Sapiens Kynureninase. *Biochemistry*, 46(10), S. 2735–2744.
- Lima, S., Kumar, S., Gawandi, V., Momany, C., & Phillips, R. (2009). Crystal Structure of the Homo sapiens Kynureninase-3-Hydroxyhippuric Acid Inhibitor. *Journal of Medicinal Medicine*, 52(22), S. 389–396.
- Liu, J., Yuan, Y., Huan, J., & Shen, Z. (2001). Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIPalpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2. *Oncogene*, 20(3), S. 336-345.
- Liu, K. A., Lashinger, L. M., Rasmussen, A. J., & Hursting, S. D. (2014). Leucine supplementation differentially enhances pancreatic cancer growth in lean and overweight mice. *Cancer & Metabolism*, 2(1). doi:10.1186/2049-3002-2-6
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), S. 402-408.
- Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Ji, B. T., . . . Duell, E. J. (374-382 2011). Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case–Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology*, 23(2).
- Lyon, J. L., Slattery, M. L., Mahoney, A. W., & Robison, L. M. (1993). Dietary intake as a risk factor for cancer of the exocrine pancreas. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 2(6), S. 513-518.
- Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2010). Epidemiology of Pancreatic Cancer: an update. *Digestive Diseases*, 28(4-5), S. 645-656.
- Maréchal, R., Mackey, J. R., Lai, R., Demetter, P., Peeters, M., Polus, M., . . . Laethem, V. J.-L. (2009). Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 and Human Concentrative Nucleoside Transporter 3 Predict Survival after Adjuvant Gemcitabine Therapy in Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 15(8), S. 2913-2919.
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 7006, S. 343-349.

- Meng, X., Liu, J., & Shen, Z. (2004). Inhibition of G1 to S cell cycle progression by BCCIP beta. *Cell Cycle*, 3(3), S. 343-348.
- Metz, R., DuHadaway, J. B., Kamasani, U., Lisa, L.-K., Muller, A. J., & Prendergast, G. C. (2007). Novel Tryptophan Catabolic Enzyme IDO2 Is the Preferred Biochemical Target of the Antitumor Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitory Compound d-1-Methyl-Tryptophan. *Cancer Research*, 67(15), S. 7082-7087.
- Metz, R., Rust, S., DuHadaway, J. B., Maultino, M. R., Munn, D. H., Vahanian, N. N., . . . Prendergast, G. C. (2012). IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR. *OncoImmunology*, 1(9), S. 1460-1468.
- Miki, K., Al-Raffaie, W., Xu, M., Ping, J., Tan, Y., Bouvet, M., . . . Hoffman, R. M. (2000). Methioninase Gene Therapy of Human Cancer Cells Is Synergistic with Recombinant Methioninase Treatment. *Cancer Research*, 60(10), S. 2696-2702.
- Miyoshi, H., Blömer, U., Mayaso, T., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of Virology*, 72(10), S. 8150-8157.
- Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (1997). p16 and K-ras Gene Mutations in the Intraductal Precursors of Human Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 57(11), S. 2140-2143.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), S. 55-63.
- Müller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E., & Prendergast, G. C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Medicine*, 11(3), S. 312-319.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D., & Mellor, A. L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*, 22(5), S. 633-642.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri-Nakano, K., & Hiraoka, K. (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to

- nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), S. 75-82.
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., . . . Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human arylhydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), S. 197-203.
- Opitz, C. A., Wick, W., Steinman, L., & Platten, M. (2007). Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(19-20), S. 2542-2563.
- Ouyang, H., Mou, L.-j., Luk, C., Liu, N., Karaskova, J., Squire, J., & Ming Sound, T. (2000). Immortal Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Lines with Near Normal Genotype and Phenotype. *The American Journal of Pathology*, 157(5), S. 1623-31.
- Pellegata, N. S., Sessa, F., & Renault, B. (1994). K-ras and p53 Gene Mutations in Pancreatic Cancer: Ductal and Nonductal Tumors Progress through Different Genetic Lesions. *Cancer Research*, 54(6), S. 1556-1560.
- Pendergast, G. C., Smith, C., Thomas, S., Mandik-Nayak, L., Kleintop, L.-L., Metz, R., & Müller, A. J. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(7), S. 721-735.
- Philip, P. A. (2008). Targeted Therapies for Pancreatic Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*, 12(3), S. 206-207.
- Phillips, R. (2011). Structure, Mechanism, and Substrate Specificity of Kynureninase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(11), S. 1481–1488.
- Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolušić, E., Frédérick, R., . . . Van den Eynde, B. (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *PNAS*, 109(7), S. 2497-2502.
- Plebuch, M., Soldan, M., Hungerer, C., Koch, L., & Maser, E. (2007). Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters*, 255(1), S. 49-56.

- Possemato, R., Marks, K. M., Shaul, Y. D., Pacold, M. E., Kim, D., Birsoy, K., . . . Sabatini, D. M. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*, 476(7360), S. 346-350.
- Raymond, S., & Weintraub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130(3377).
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., & Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22(3), S. 326-330.
- Sahm, F., Oezen, I., Opitz, C. A., Radlwimmer, B., von Deimling, A., Ahrendt, T., . . . Platten, M. (2013). The Endogenous Tryptophan Metabolite and NAD⁺ Precursor Quinolinic Acid Confers Resistance of Gliomas to Oxidative Stress. *Cancer Research*, 73(11), S. 3225-3234.
- Sakai, T., Mashima, H., Yamada, Y., Goto, T., Sato, W., Dohmen, T., . . . Ohnishi, H. (2014). The Roles of Interferon Regulatory Factors 1 and 2 in the Progression of Human Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 43(6), S. 909-916.
- Sawers, L., Ferguson, M. J., Ihrig, B. R., Young, H. C., Chakravarty, P., Wolf, C. R., & Smith, G. (2014). Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *British journal of cancer*, 111(6), S. 1150-1158.
- Schmitz, S. (2011). *Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag .
- Schulz, T. J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., . . . Ristow, M. (2006). Induction of Oxidative Metabolism by Mitochondrial Frataxin Inhibits Cancer Growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), S. 977-981.
- Sebastiani, V., Ricci, F., Rubio-Viquiera, B., Kulesza, P., Yeo, C. J., Hidalgo, M., . . . Iacubuzio-Donahue, C. A. (2006). Immunohistochemical and Genetic Evaluation of Deoxycytidine Kinase in Pancreatic Cancer: Relationship to Molecular Mechanisms of Gemcitabine Resistance and Survival. *Clinical Cancer Research*, 12(8), S. 2492-2497.
- Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van Cutsem, E., & Rougier, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(7).

- Seufferlein, T., Porzner, M., Heinemann, V., Tannapfel, A., Stuschke, M., & Uhl, W. (2014). Duktales Pankreaskarzinom: Chirurgische Therapie, pathologische Aufarbeitung des Präparats, neoadjuvante, adjuvante und palliative Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*, 111(22), S. 396-402.
- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy*, 217(1), S. 1-15.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., . . . Klenk, D. C. (1987). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), S. 76-85.
- Stapelberg, M., Zabalova, R., Nguyen, M. N., Walker, T., Stantic, M., Goodwin, J., . . . Neuzil, J. (2013). Indoleamine-2,3-dioxygenase elevated in tumor-initiating cells is suppressed by mitocans. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, S. 41-50.
- Stavrum, A. C., Heiland, I., Schuster, S., Puntervoll, P., & Ziegler, M. (2013). Model of Tryptophan Metabolism, Readily Using Tissue-specific Gene Expression Data. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(48), S. 345555-34566.
- Stern, P. H., & Hoffman, R. M. (1984). Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors. *In Vitro*, 20(8), S. 663-670.
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loo, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., . . . Chu, T. M. (1986). Characterisation of New Primary Human Pancreatic Tumor Line. *Cancer Investigation*, 4(1), S. 15-23.
- Taylor, M. W., & Feng, G. (1991). Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, 5(1), S. 2516-2522.
- Thaker, A. I., Rao, M. S., Bishnupuri, K. S., Kerr, T. A., Foster, L., Marinshaw, J. M., . . . Ciorba, M. A. (2013). IDO1 Metabolites Activate β -catenin Signaling to Promote Cancer Cell Proliferation and Colon Tumorigenesis in Mice. *Gastroenterology*, 145(2), S. 416-425.
- Thurslund, T., & West, S. C. (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene*, 26(56), S. 7720-7730.

- Tönjes, M., Barbus, S., Park, Y. J., Wang, W., Schlotter, M., Lindroth, A. M., . . . Radwimmer, B. (2013). BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1. *Nature Medicine*, 19(7), S. 901-908.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., . . . Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine*, 9(10), S. 1269-1274.
- Vareki, S. M., Rytelowski, M., Figueredo, R., Chen, D., Ferguson, P. J., Vincent, M., . . . Koropatnick, J. (2014). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates immune-independent human tumor cell resistance to olaparib, gamma radiation, and cisplatin. *Oncotarget*, 5(9), S. 2778-2791.
- Walsh, H. A., & Botting, N. P. (2002). Purification and biochemical characterization of some properties of recombinant human kynureninase. *European Journal of Biochemistry*, 269(8), S. 2069–2074.
- Walsh, H. A., Leslie, P. L., O'Shea, K. C., & Botting, N. C. (2002). 2-Amino-4-[3'-hydroxyphenyl]-4-hydroxybutanoic acid; A potent inhibitor of rat and recombinant human kynureninase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(3), S. 361–363.
- Wang, H., Word, B. R., & Lyn-Cook, B. D. (2011). Enhanced efficacy of gemcitabine by indole-3-carbinol in pancreatic cell lines: the role of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Anticancer Research*, 31(10), S. 3171-80.
- Wilentz, R. E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G. J., Kang, M., Goggings, M., . . . Hruban, R. H. (1998). Inactivation of the p16 (INK4A) Tumor-suppressor Gene in Pancreatic Duct Lesions: Loss of Intranuclear Expression. *Cancer Research*, 58(20), S. 4740-4744.
- Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), S. 393-410.
- Witkiewicz, A., Williams, T. K., Cozzitorto, J., Durkan, B., Showalter, S. L., Yeo, C. J., & Brody, J. R. (2008). Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Recruits Regulatory T Cells to Avoid Immune Detection. *Journal of the American College of Surgeons*, 206(5), S. 849-854.

- Wu, J., Luo, S., Jiang, H., & Li, H. (2005). Mammalian CHORD-containing protein 1 is a novel heat shock protein 90-interacting protein. *FEBS Letters*, 579(2), S. 421-426.
- Yoshida, R., Imanishi, J., Oku, T., Kishida, T., & Hayaishi, O. (1981). Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *PNAS*, 78(1), S. 129-132.
- Zeng, Y., Rui, Y., & Cullen, B. R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO Journal*, 24(1), S. 138-148.
- Zhang, Y., Zhang, K. X., He, X., Yuan, W. T., Wang, G. L., Mao, S. Y., . . . Zhu, D. L. (2005). A polymorphism of kynureninase gene in a hypertensive candidate chromosomal region is associated with essential hypertension. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 33(7), S. 588-91.
- Zhao, F., Xu, G., Zhou, Y., Wang, L., Xie, L., Ren, S., . . . Zhu, Y. (2014). MicroRNA-26b inhibits hepatitis B virus transcription and replication by targeting the host factor CHORDC1 protein. *The Journal of biological chemistry*, 289(50), S. 35029-35041.

8 Danksagung

Ich möchte hiermit meinem Betreuer Dr. Cenap Güngör und meinem Doktorvater Prof. Dr. Maximilian Bockhorn für die Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen danken. Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern Dr. Petra Kondziella und Dr. Ulrich Kondziella und Antonia, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: