

Aus der  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Die Bedeutung und der zugrunde liegende Wirkmechanismus  
von IFIT3 für Tumorigenese und Metastasierung  
beim humanen Pankreaskarzinom**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ruth Mair

aus

Dachau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Stemmler

Prof. Dr. Andreas Eigler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Peter Camaj

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2019

## **Eidesstattliche Versicherung**

*Mair, Ruth*

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

***Die Bedeutung und der zugrunde liegende Wirkmechanismus von IFIT3 für Tumorigenese und Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

*München, 05.11.2019*

*Ruth Mair*

*Meiner Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	9
1 EINLEITUNG .....	11
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	11
1.1.1 Epidemiologie .....	11
1.1.2 Risikofaktoren .....	11
1.1.3 Tumorpathologie .....	13
1.1.4 Pathogenese .....	14
1.1.5 Therapie .....	15
1.1.6 Prognose .....	17
1.2 Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) .....	18
1.3 Entzündung und Tumor .....	21
1.3.1 TNF- $\alpha$ .....	22
1.3.2 IL-6 .....	24
1.3.3 IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10 .....	25
2 ZIEL DER ARBEIT/ EXPERIMENTELLE SCHRITTE .....	27
3 MATERIAL .....	29
3.1 Zelllinien .....	29
3.1.1 Die humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG (FG) .....	29
3.1.2 Die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl .....	29
3.1.3 Die IFIT3-transfizierten Zelllinien COLO357FG/CMV-IFIT3 und L3.6pl/CMV-IFIT3 und die Leervektorzellen COLO357FG/CMV-null und L3.6pl/CMV-null .....	30
3.1.4 Die Zelllinie L3.6pl-6TR-Sox9shRNA .....	30
3.1.5 Die Zelllinie L3.6pl-6TR-LacZshRNA .....	31
3.2 Laborequipment .....	32

3.2.1	Verbrauchsmaterialien .....	32
3.2.2	Geräte .....	32
3.3	Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur .....	34
3.4	RNA-Extraktion, PCR, Immunoblot, FACS, ELISA.....	35
3.4.1	Reagenzien .....	35
3.4.2	Kits .....	36
3.4.3	Primer .....	37
3.4.4	Antikörper .....	37
3.4.5	Puffer.....	37
3.5	Software.....	38
4	METHODEN.....	39
4.1	Zellkulturmethoden .....	39
4.1.1	Kulturbedingungen.....	39
4.1.2	Kulturbedingungen vor experimentellen Auswertungen .....	39
4.1.3	Splitten .....	40
4.1.4	Langzeitkonservierung der Zellen.....	40
4.1.5	Rekultivierung eingefrorener Zellen .....	40
4.1.6	Zellzahlbestimmung .....	41
4.1.7	Testung auf Mykoplasmenkontamination.....	41
4.2	RNA-Detektion.....	42
4.2.1	Behandlung der Zellen .....	42
4.2.2	RNA-Extraktion .....	43
4.2.3	semi-quantitative RT-PCR.....	43
4.2.4	quantitative real time RT-PCR.....	44
4.3	Immunoblotting .....	45
4.3.1	Behandlung der Zellen zum Nachweis und Vergleich der IFIT3 Proteinexpression in COLO357FG- und L3.6pl-Zellen.....	46

4.3.2	Zellyse .....	46
4.3.3	SDS-PAGE.....	46
4.3.4	semi-dry Western Blot .....	47
4.3.5	Immunodetektion .....	47
4.4	FACS (Flourescence-activated cell sorting).....	48
4.4.1	Zellzyklusanalyse .....	48
4.4.2	Chemotherapieresistenz .....	48
4.5	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).....	49
4.5.1	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$ .....	49
4.5.2	VEGF .....	50
4.6	Statistische Analyse.....	51
5	ERGEBNISSE.....	52
5.1	IFIT3 wird in L3.6pl Zellen im Vergleich zu COLO357FG Zellen überexprimiert	52
5.2	Die biologische Bedeutung von IFIT3 .....	53
5.2.1	IFIT3 führt zu einer erhöhten Apoptoserate.....	54
5.2.2	IFIT3 führt zu einer erhöhten VEGF-Produktion .....	55
5.2.3	IFIT3 führt zu einer verminderten Chemosensitivität.....	56
5.3	Regulationsmechanismen von IFIT3.....	59
5.3.1	IFIT3 ist durch IFN- $\alpha$ induzierbar .....	59
5.3.2	Die Expression von IFIT3 kann durch das Protein STAT1 und den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermittelt werden .....	60
5.3.3	Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor von IFIT3 und ist an dessen Regulation beteiligt.....	62
5.4	IFIT3 besitzt einen Einfluss auf die Ausbildung eines inflammatorischen Tumormilieus beim Pankreaskarzinom.....	63
5.4.1	IFIT3 führt zu einer erhöhten IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand, der IFIT3-Transkriptionsfaktor Sox9 ist daran beteiligt .....	63

5.4.2	IFIT3 führt zu einer statistisch nicht signifikant erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand .....	66
5.4.3	Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10 werden von COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen und COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen nicht produziert .....	68
6	DISKUSSION .....	69
6.1	Erhöhte Expression von IFIT3 in L3.6pl Zellen im Vergleich zu FG Zellen .....	69
6.2	Biologische Bedeutung von IFIT3 .....	71
6.2.1	Erhöhte Apoptoserate und Zellzyklusanalyse .....	71
6.2.2	Erhöhte Produktion angiogener Faktoren .....	73
6.2.3	Erniedrigte Chemosensitivität .....	74
6.3	Regulationsmechanismen .....	75
6.3.1	Induktion durch IFN- $\alpha$ .....	75
6.3.2	Regulation durch STAT1 und NF- $\kappa$ B .....	76
6.3.3	Sox9 als Transkriptionsfaktor von IFIT3 .....	77
6.4	Vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren .....	79
6.4.1	IL-6 .....	80
6.4.2	TNF- $\alpha$ .....	82
7	FAZIT: „PSEUDOINFLAMMATIONSHYPOTHESE“ .....	83
	LITERATURVERZEICHNIS .....	86
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	99
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	101
	DANKSAGUNG .....	105

# ZUSAMMENFASSUNG

**Einleitung:** Das duktales Pankreasadenokarzinom zählt zu den aggressivsten Tumoren des Menschen mit einer äußerst ungünstigen Prognose. Die Infiltration lokaler Strukturen, die frühzeitige Metastasierung, sowie gleichzeitig unzureichende Früherkennungsmaßnahmen und eine späte Symptompräsentation führen dazu, dass die Diagnosestellung oft erst in einem späten Krankheitsstadium erfolgt. Ist die lokale Ausbreitung weit fortgeschritten oder liegen Fernmetastasen vor, so ist nur mehr ein palliativer Therapieansatz möglich. Dennoch, selbst bei kurativer Therapieintention sind die 5-Jahres-Überlebensraten längst nicht zufriedenstellend. Ein Problem der Therapie des Pankreaskarzinoms ist unter anderem dessen schlechtes Ansprechen auf chemotherapeutische Substanzen. Dies zeigt eindringlich die Notwendigkeit, neue effektive Therapien für das Pankreaskarzinom zu entwickeln. Insbesondere zielgerichtete systemische Therapeutika sind bislang für das Pankreaskarzinom fast nicht verfügbar.

In früheren Affymetrix-Genchip Untersuchungen wurde die wenig aggressive humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG mit der, durch *in vivo* Selektion gewonnenen, hochaggressiven Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl genomisch verglichen, um Hinweise auf die Ursache der aggressiven Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms zu finden. Daher war bekannt, dass IFIT3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3) in der aggressiven Zelllinie überexprimiert wird.

**Ziel:** Durch die Untersuchung der Bedeutung und des zugrunde liegenden Wirkmechanismus des Proteins IFIT3 beim humanen Pankreaskarzinom versucht diese Arbeit einen Beitrag zur Identifikation neuer Angriffspunkte für zielgerichtete Therapiestrategien zu leisten.

**Methoden:** Die Bestätigung der Überexpression von IFIT3 auf mRNA- und Proteinebene in der aggressiveren Zelllinie L3.6pl erfolgte mittels semi-quantitativer RT-PCR und Western Blot.

*In vitro* wurde der Einfluss von IFIT3 auf die Apoptoserate und den Zellzyklus, sowie auf die Chemotherapieresistenz mittels FACS-Untersuchungen analysiert. Der Einfluss auf die Neoangiogenese wurde durch Messung der VEGF-Konzentration mittels ELISA im Zellkulturüberstand untersucht.

Um IFIT3-Regulationsmechanismen aufzudecken, wurde die Expression von IFIT3-mRNA nach Behandlung der Zellen mit IFN- $\alpha$ , dem STAT1-Inhibitor S 14-95, bzw. dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor BAY 11-7082, sowie nach Inhibition von Sox9 mittels RNA-Interferenz, mit Hilfe der RT-PCR quantifiziert.

Der Beitrag von IFIT3 zu einem inflammatorischen Tumormilieu wurde anhand der Analyse von Zytokinen in den Zellkulturüberständen mit Hilfe von ELISAs nachgewiesen.

**Ergebnisse:** Die Untersuchungen zeigten, dass IFIT3 zu einer vermehrten Produktion des proangiogenetischen VEGF führt und die Apoptoserate der untersuchten humanen Pankreaskarzinomzellen, sowie deren Chemosensitivität mindert.

IFIT3 ist durch IFN- $\alpha$  induzierbar. An der Induktion sind außerdem STAT1, NF- $\kappa$ B und der in L3.6pl-Zellen im Vergleich zu COLO357FG-Zellen differentiell exprimierte Transkriptionsfaktor Sox9 beteiligt.

Die Überexpression von IFIT3 fördert die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Für TNF- $\alpha$  zeigt sich ein Trend zur vermehrten Produktion bei IFIT3-Überexpression. Dieser ist jedoch statistisch nicht signifikant. Eine Downregulation von IFIT3 durch Downregulation des IFIT3-Transkriptionsfaktors Sox9 führt zu einer verminderten Zytokinexpression.

**Fazit:** Diese Arbeit zeigt die Bedeutung von IFIT3 für die Entstehung eines malignen Phänotyps beim humanen Pankreaskarzinom. Während weitere Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe bereits zeigten, dass IFIT3 *in vivo* die Tumorentstehung, das Tumorwachstum, die desmoplastische Reaktion und eine vermehrte Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom fördert, konnten in dieser Arbeit mögliche Mechanismen der deutlich aggressiveren Tumorbilogie bei IFIT3-Überexpression identifiziert werden. Bereits aus der Literatur war bekannt, dass IFIT3 bei Entzündungen eine Rolle spielt. Auch einige in dieser Arbeit nachgewiesenen Regulationsmechanismen von IFIT3 beim humanen Pankreaskarzinom spielen eine Rolle im Rahmen entzündlicher Mechanismen. Außerdem fördert IFIT3 die Expression proinflammatorischer Zytokine. Die Ergebnisse deuten deshalb darauf hin, dass IFIT3 ein („pseudo“-) inflammatorisches Tumormikromilieu fördert, welches einen malignen Phänotyp, wie er von L3.6pl-Zelltumoren repräsentiert wird, begünstigt.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist eines der aggressivsten Malignome des Menschen. Es zählt zu den zehn häufigsten Tumorentitäten und steht aufgrund der hohen Mortalitätsrate an vierter Stelle der Krebstodesfälle in der Europäischen Union. [1, 2] Laut RKI erkranken in Deutschland jährlich circa 16700 Menschen am Pankreaskarzinom. Beide Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr. Männer erkranken etwas früher als Frauen. [2] Die Mortalitätsrate beim Pankreaskarzinom entspricht annähernd der Inzidenzrate, was bedeutet, dass nahezu jeder Erkrankte auch am Pankreaskarzinom versterben wird. Somit ist das Pankreaskarzinom der Tumor mit der niedrigsten Überlebensrate. [2, 3] 2011 lag die 5-Jahresüberlebensrate in Deutschland bei 8% für Männer und 9% für Frauen. [2] Weder die Inzidenz- noch die Mortalitätsraten haben sich in den letzten 25 Jahren bei Männern wesentlich verändert. Bei Frauen ist es in den letzten Jahren sogar zu einem leichten Anstieg der Raten gekommen. [1, 2, 4]

### 1.1.2 Risikofaktoren

Obwohl die genaue Ätiologie des Pankreaskarzinoms letztlich unbekannt ist, konnte dessen Auftreten dennoch in Zusammenhang mit einigen Risikofaktoren gebracht werden.

Wie bei vielen anderen Tumorentitäten auch, steigt die Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr. Vor dem 50. Lebensjahr erkranken nur etwa 5-10% der Patienten. Dann liegen jedoch wahrscheinlich andere Risikofaktoren vor. [2, 4]

Als gesicherter Risikofaktor wird der Konsum von Tabakwaren angesehen. Das Erkrankungsrisiko bei Rauchern ist um ein Vielfaches erhöht. Eine großangelegte europäische Studie (EPIC) lässt sogar einen Zusammenhang mit Passivrauchen im Kindesalter vermuten. [2, 4, 5] Während für gemäßigten Alkoholkonsum keine Beziehung zum Pankreaskarzinom nachgewiesen werden konnte, scheinen starker Alkoholkonsum und Übergewicht das Erkrankungsrisiko zu erhöhen. [2, 4, 6-8]

In einen positiven Zusammenhang mit dem Auftreten des Pankreaskarzinoms lässt sich auch die chronische Pankreatitis bringen. [2, 4, 9-11] Das Karzinomrisiko scheint insbesondere bei schwerwiegenden Verläufen und langer Krankheitsdauer um das 15- bis 25-fache erhöht. Bei hereditärer Pankreatitis ist das Erkrankungsrisiko sogar bis um das 70-fache erhöht. [4, 10] Nicht nur die Entstehung, sondern auch das Fortschreiten maligner Erkrankungen kann durch entzündliche Mechanismen gefördert werden. Auf den Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorigenese wird in Kapitel 1.3 genauer eingegangen.

Auch eine positive Familienanamnese beeinflusst das Erkrankungsrisiko. Bereits bei Erkrankung eines Verwandten ersten Grades erhöht sich die statistische Wahrscheinlichkeit selbst zu erkranken. [2, 4, 12]

Einige Pankreaskarzinomfälle lassen sich auf hereditäre Syndrome zurückführen. Zu den bekannten genetischen Syndromen, bei denen auch das Pankreaskarzinomrisiko erhöht sein kann, zählen unter anderem das Peutz–Jeghers-Syndrom, das „Familial Atypical Multiple Mole Melanoma“-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis und das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom. [4, 12]

Diabetes mellitus lässt sich ebenfalls in eine positive Beziehung zum Pankreaskarzinom bringen. Zwar kann Diabetes auch erst als Symptom der Tumorerkrankung selbst auftreten, allerdings wurde bereits über eine erhöhte Tumorzinzidenz bei langjährigen Diabetikern berichtet. [13, 14]

Daneben scheint es einige weitere Risikofaktoren zu geben, deren Einfluss letztlich jedoch nicht genau geklärt ist. Dazu zählen diätetische Einflüsse (hoher Fleischkonsum, nitrosaminhaltige Lebensmittel) und Umwelt- und Schadstoffeinflüsse. Als protektive Faktoren werden Obst- und Gemüsekonsum diskutiert. [2, 4]

### 1.1.3 Tumorpathologie

Das Pankreaskarzinom wird histopathologisch entsprechend der WHO-Klassifikation eingeteilt. Der überwiegende Anteil der Karzinome entsteht aus dem exokrinen Pankreas. Die weitaus häufigste Neoplasie des Pankreas sind duktale Adenokarzinome. [10, 15] Auf diese beziehen sich die Untersuchungen dieser Arbeit. Andere Karzinomtypen finden sich deutlich seltener. [10, 15] Etwa 65% der dukталen Adenokarzinome sind im Pankreaskopf, etwa 15% im Corpus und 10% im Pankreasschwanz lokalisiert. 10% sind multifokal. [10, 16]

Das duktale Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine derbe Tumormasse aus. Die neoplastischen Zellen können glanduläre Strukturen bilden, die je nach Differenzierung normalen Pankreasgängen ähneln. [15, 17] Kennzeichnend für das Pankreaskarzinom ist weiterhin eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion. Diese Proliferation des Tumorstromas kann so erheblich sein, dass sie bis zu 80% der Tumormasse ausmacht, während die eigentlichen Tumorzellen nur mehr eine Minderheit darstellen. [17-19] Bestandteile des desmoplastischen Tumorstromas sind u.a. die Extrazellulärmatrix, Fibroblasten, Gefäße und Entzündungszellen. [10, 17, 19, 20] Zahlreiche Interaktionen zwischen dem Tumorstroma und den neoplastischen Zellen können zum Fortschreiten des Pankreaskarzinoms beitragen und Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung begünstigen. [19-22] Einen nicht unerheblichen Anteil daran besitzen entzündliche Reaktionen. [19, 20]

Das Pankreaskarzinom infiltriert häufig peripankreatische Strukturen. [16, 23] Charakteristisch und problematisch für eine erfolgreiche Therapie ist außerdem eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung. Häufig befallene Lymphknotenstationen befinden sich entlang der umliegenden Arterien, und in der paraaortalen und parakavalen Region. Fernmetastasen finden sich typischerweise in der Leber und in der Lunge. [16, 23]

### 1.1.4 Pathogenese

Histologisch lassen sich verschiedene Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms beschreiben. Ein Großteil der invasiven duktaalen Adenokarzinome entwickelt sich aus so genannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), seltener aus muzinös-zystischen Neoplasien (MCN) oder intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN). [21, 24-26]

PanINs sind mikroskopisch kleine, nichtinvasive epitheliale Neoplasien. Sie treten meist im Pankreaskopf auf und sind in den kleineren Pankreasgängen lokalisiert. [17, 26, 27]

Die Unterteilung der PanINs erfolgt entsprechend der zunehmenden zytologischen und strukturellen Veränderungen: PanIN-1 weisen minimale, PanIN-2 moderate und PanIN-3 hochgradige Atypien, entsprechend einem Carcinoma in situ, auf. Wird die Basalmembran durchbrochen, so spricht man von einem invasiven Tumor. [17, 24, 26, 28-30]

Vor allem am Beispiel der PanINs wurde gezeigt, dass sich mit zunehmender Atypie auch genetische Alterationen häufen. [21, 24, 25, 30] Daher geht man auch beim Pankreaskarzinom, ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom, von einem mehrschrittigen Prozess der Karzinogenese aus. [25, 28, 30]

Molekulare Mechanismen, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen, sind u.a. die Aktivierung von Protoonkogenen (z.B. K-RAS) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. TP53, p16/CDKN2A, SMAD4). Außerdem können z.B. die Inaktivierung von DNA-Mismatch-Reparaturgenen, sowie Telomerverkürzungen an der Pathogenese des Pankreaskarzinoms beteiligt sein. [21, 25, 29]

K-RAS-Mutationen finden sich bei 70-100% der Pankreaskarzinome. Auch in den nicht-invasiven Vorläuferläsionen lassen sich K-RAS-Mutationen nachweisen. [24, 28] Folge einer Mutation ist eine konstitutive Aktivierung von K-RAS-assoziierten Signalwegen (z.B. RAF/MAPK, PI3K/Akt). Diese Signalwege beeinflussen Prozesse, die auch für die Kanzerogenese von Bedeutung sind, wie z.B. Proliferation und Zellüberleben. [24, 31]

Mehr als 50 % der duktaalen Pankreaskarzinome weisen eine Inaktivierung von TP53 auf. Das Protein p53 ist u.a. für die Regulation des Zellzyklus (Induktion von p21 mit nachfolgendem Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang) und der Apoptose verantwortlich. Der Verlust von p53 erlaubt es auch Zellen mit DNA Schäden noch, weiter zu proliferieren. [24, 25, 28]

Bei etwa 85% der duktaalen Pankreaskarzinome kommt es zu einer Inaktivierung des p16/CDKN2A Tumorsuppressorgens. Das Protein p16<sup>INK4A</sup> kontrolliert ebenfalls den Zellzyklus am G1/S-Übergang. Auch eine Inaktivierung von p16/CDKN2A führt dementsprechend zum Verlust einer wichtigen Kontrolle des Zellzyklus. [25, 28]

Bei etwa 50 % der Pankreaskarzinomfälle liegt eine Inaktivierung von SMAD4 vor. Das Protein Smad4 ist Bestandteil des TGF- $\beta$ -Signalwegs. Zusammen mit anderen Faktoren reguliert es die Expression von Genen, die u.a. für die Zellzykluskontrolle, sowie das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. [24, 25, 28] Eine SMAD4-Inaktivierung findet sich nur selten bei anderen Tumorentitäten. Sie führt insbesondere zu einer vermehrten Metastasierung. [25, 27]

In der zeitlichen Entwicklung von PanINs treten K-RAS Mutationen frühzeitig auf. Die Inaktivierung von p16/CDKN2A findet man eher in höhergradigen PanINs. Erst spät kommt es zur Inaktivierung von TP53 und SMAD4. [29, 30]

### 1.1.5 Therapie

Die radikale chirurgische Entfernung des Pankreaskarzinoms stellt derzeit die einzige Therapie mit kurativer Intention dar. [32, 33] Standardverfahren für Tumore im Kopfbereich ist die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple, bzw. die mittlerweile häufiger durchgeführte pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie. Bei Korpus- und Kaudakarzinomen wird das linksseitige Pankreas reseziert. [10, 34] Voraussetzung und Ziel jeder Operation ist eine R0-Resektion. [32-34]

Bei kurativer Behandlungsintention sollten Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Aufgrund der ESPAC-1 Studie wird in Europa derzeit keine zusätzliche Radiotherapie empfohlen. [21, 34, 35]

Gemcitabin und 5-FU erwiesen sich als gleich wirksame Chemotherapeutika. Gemcitabin kann zu hämatotoxischen Nebenwirkungen führen. Insgesamt treten jedoch weniger toxische Effekte auf als bei 5-FU. [21, 34, 36] Die ESPAC-4 Studie verglich zuletzt eine Gemcitabin-Monotherapie mit einer Kombination aus Gemcitabin und Capecitabin, wobei sich ein Vorteil für die Kombinationstherapie zu ergeben schien. [37]

Zum Nutzen einer neoadjuvanten Therapie liegen aktuell keine Daten aus großen randomisiert kontrollierten Studien vor, so dass diese in den aktuellen Leitlinien außerhalb von Studien nicht empfohlen wird. [21, 32, 34]

Eines der großen Probleme in der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist, dass nur bei einem geringen Prozentsatz der Patienten die Möglichkeit zur Operation gegeben ist. [16, 32, 33] Typische Frühsymptome fehlen. Symptome, wie Gewichtsverlust, abdominelle Schmerzen, Rückenschmerzen oder Ikterus sind unspezifisch oder treten meist erst spät auf. Gleichzeitig ist das Pankreaskarzinom durch eine frühzeitige Metastasierung gekennzeichnet. So kommt es in der Mehrzahl der Fälle erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zur Diagnosestellung, wenn der Tumor bereits umgebendes Gewebe infiltriert hat oder Metastasen vorliegen. Eine operative und damit kurative Behandlung ist dann nicht mehr möglich. [16, 21, 23, 32, 33, 38]

Fortgeschrittene Tumore werden üblicherweise chemotherapeutisch behandelt. Standardchemotherapeutikum ist Gemcitabin. [21, 34] Es verbessert die Symptomkontrolle. Das mediane Gesamtüberleben liegt hierunter bei etwa 6 Monaten. [34, 39]

Bei fitten Patienten kommt in der Regel das FOLFIRINOX-Regime zum Einsatz. Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben scheinen bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand wenige Monate verlängert, jedoch auf Kosten einer höheren Toxizität. [21, 34, 40] Eine 2013 erschienene Studie konnte einen Vorteil von einer Kombination aus Gemcitabin mit nab-Paclitaxel gegenüber einer Monotherapie mit Gemcitabin zeigen. [33, 34, 41] Einen geringen Vorteil zeigte auch die Kombination von Gemcitabin mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib. [21, 34, 42] In der Erstlinientherapie des Pankreaskarzinoms ist Erlotinib momentan die einzige zugelassene zielgerichtete Therapie in Deutschland. [34]

### 1.1.6 Prognose

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8 - 9 % für alle Tumorstadien ist die Prognose des Pankreaskarzinoms sehr schlecht. [2]

Einzigste Therapie mit kurativer Intention ist die radikale operative Entfernung des Tumorgewebes, gefolgt von einer adjuvanten Therapie. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt dann bestenfalls bei 20 - 25 %. [21, 33] Eine R0-Resektion verbessert im Vergleich zur R1-Resektion das mediane Überleben. Jedoch gibt es hier teilweise uneinheitliche Definitionen, so dass die Vergleichbarkeit der Studien nicht unbedingt gegeben ist. [38, 43] Positive Resektionsränder, eine schlechte Tumordifferenzierung, große Tumore und ein positiver Lymphknotenstatus verschlechtern die Prognose. [21]

Nur etwa 20 % der Patienten sind chirurgisch behandelbar, der Rest befindet sich bereits bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium. [16, 32, 33] In diesem Fall ist die Prognose äußerst ungünstig. Bei Vorliegen von Fernmetastasen sinkt das mediane Überleben auf 4 - 6 Monate. [21] Auch palliative Chemotherapien verlängern die Überlebenszeit nur minimal. Bei einer Therapie mit Gemcitabin liegt das 1-Jahres-Überleben bei etwa 18 %, sowie das mediane Überleben bei etwa 6 Monaten. [39, 44] Die Kombination von Gemcitabin mit Erlotinib führt zu einer 1-Jahres-Überlebensrate von circa 23 %. [42] Beim FOLFIRINOX-Regime liegt die Überlebensrate nach 12 Monaten immerhin bei 48,4 %, nach 18 Monaten aber auch nur noch bei 18,6 %. Das mediane Überleben liegt bei etwa 11 Monaten. [40]

Es wird deutlich, dass die Therapiemöglichkeiten und Therapieerfolge beim Pankreaskarzinom in keiner Weise zufriedenstellend sind. Gerade bei den so wichtigen systemischen Therapien sind die Ansprechraten und die gewonnene Lebenszeit bei den derzeit verfügbaren Therapien äußerst gering. Die Prognose der Erkrankung ist trotz Zulassung neuer Chemotherapieregime weiterhin sehr schlecht.

Dies verlangt nach der Entwicklung neuer wirkungsvoller Therapiestrategien. Mit der Charakterisierung der Bedeutung des Proteins IFIT3 für das Pankreaskarzinom liefert die vorliegende Arbeit hierfür möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt.

## 1.2 Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3)

Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3; auch IFIT4, RIG-G, GARG-49, IRG2 oder ISG60) wird beim Menschen und bei verschiedenen anderen Säugetieren (z.B. Maus, Ratte, Affe) exprimiert. [45, 46]

Das humane IFIT3-Gen zählt zur Interferon (IFN)-induzierbaren IFIT-Genfamilie. Es ist auf Chromosom 10 lokalisiert. [47-49] Am Promotor des IFIT3-Gens sind zwei „Interferon stimulated response elements“ (ISRE) lokalisiert. [48]

Das IFIT3-Gen kodiert ein Protein mit einer Molekülmasse von ca. 60 kDa. [48] Dieses besitzt verschiedene potentielle posttranslationale Modifikationsstellen u.a. zur Phosphorylierung. Das IFIT3-Protein ist im Zytoplasma lokalisiert. [47]

Wie die anderen IFIT-Proteine ist IFIT3 durch „tetratricopeptide repeats (TPR)“-Domänen gekennzeichnet. [46, 48] TPR-Domänen können Protein-Protein-Interaktionen und die Bildung von Multiproteinkomplexen vermitteln. Proteine mit TPR-Domänen sind häufig an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. an der Zellzyklusregulation, der Kontrolle der Transkription oder dem Proteintransport. [46, 50-52]

Ursprünglich wurde humanes IFIT3 in ATRA-behandelten NB4-Leukämiezellen beschrieben. [47] Neben ATRA ist IFIT3 auch durch die Typ-I-Interferone IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  induzierbar. [47, 48] Bei NB4-Zellen wurde auch eine IFN- $\gamma$  Behandlung untersucht, führte hier aber nicht zu einer IFIT3 Induktion. In Kombination mit ATRA erfolgte die Induktion von IFIT3 aber zu einem früheren Zeitpunkt und war erhöht. [47]

Beim klassischen Typ-I-IFN-vermittelten Signaltransduktionsweg kommt es nach Rezeptorbindung zu einem Komplex aus IRF-9, phosphoryliertem STAT1 und phosphoryliertem STAT2, dem so genannten ISGF3-Komplex. Dieser Komplex bindet an ISREs des Promotors von IFN-induzierbaren Genen (ISGs) und initiiert deren Transkription. [53]

Für die Induktion von IFIT3 durch IFN wurde ein vom klassischen IFN-induzierten JAK-STAT-Signalweg abweichender Mechanismus beschrieben. Lou et al. zeigten, dass IRF-1 bzw. ein Komplex aus IRF-9 und STAT2 durch Bindung an den Promotor die Expression von IFIT3 induzieren können. [54, 55]

Weiterhin gibt es Studien, die zeigen, dass die sequentielle Aktivierung der Proteinkinase C  $\delta$  und von JNK an der IFIT3 Expression beteiligt sind. [56] Auch ein Einfluss des NF- $\kappa$ B Proteins cRel auf die Induktion von IFIT3 durch IFN- $\beta$  in MEF-Zellen wurde diskutiert, ebenso wie eine Bedeutung des Transkriptionsfaktors PU.1 für die Induktion durch ATRA und IFN- $\alpha$  in Leukämiezellen. [57, 58]

Abgeschwächt werden kann die IFN- $\alpha$ -induzierte IFIT3-Expression durch die Gabe von Glukokortikoiden. [48]

Die am eingehendsten untersuchte Bedeutung von IFIT3 ist dessen Beteiligung an der Immunabwehr von Viren und Bakterien. Verschiedene RNA- und DNA-Viren (u.a. CMV, RSV), sowie bakterielle Lipopolysaccharide können IFIT3 induzieren. [59-61] Zhang et al. zeigten beispielsweise, dass eine IFIT3-Überexpression die Replikation des PRRS-Virus inhibieren kann. [62] Als möglicher Mechanismus für den antiviralen Effekt wurde diskutiert, dass IFIT3 die Interaktion des mitochondrialen antiviralen Signalkomplexes (MAVS) mit TBK1 vermittelt. In Folge dessen werden TBK1 und IRF-3 aktiviert, was die Expression von antiviral wirksamen Substanzen, wie IFN- $\beta$  oder ISGs fördert. [63]

Xiao et al. wiesen eine antiproliferative Wirkung von IFIT3 nach, indem es zu einem Stopp des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase führt. Als molekularer Mechanismus hierfür wurde eine IFIT3-vermittelte Erhöhung der Zyklinkinaseinhibitoren p21 und p27 diskutiert, die als negative Regulatoren des Zellzyklus fungieren. [64]

Daneben wurde auch ein Einfluss von IFIT3 auf die Apoptoserate identifiziert. Stawowczyk et al. zeigten, dass IFIT3 die proapoptotische Wirkung des IFN-induzierbaren IFIT2 modulieren kann. Durch Bindung an einen IFIT2-Multiproteinkomplex kann IFIT3 dessen proapoptotische Wirkung inhibieren. Auf diese Weise wirkt es antiapoptotisch und kann die kontextspezifische Wirkung von IFN steuern. [65]

Einige Autoren konnten eine Assoziation von IFIT3 mit Autoimmunerkrankungen zeigen. Beispielsweise ist IFIT3 beim systemischen Lupus erythematoses erhöht und korreliert mit der Höhe der Autoantikörper, sowie mit einigen klinischen Parametern (Leukopenie, Thrombozytopenie, Hypokomplementämie). [66] Auch in Monozyten von Patienten mit Sjögren-Syndrom und in Muskelzellen von Patienten mit idiopathischen inflammatorischen Myopathien ließen sich erhöhte IFIT3-Level nachweisen. [67, 68]

Ein Einfluss von IFIT3 auf die Tumorigenese war bis vor kurzem noch nicht bekannt. Die Bedeutung von IFIT3 für das humane Pankreaskarzinom, sowie mögliche Regulationsmechanismen in diesem Kontext wurden erstmals in der vorliegenden Arbeit und der dazugehörigen Publikation untersucht.

## 1.3 Entzündung und Tumor

Zwischen Entzündung und malignen Erkrankungen lässt sich ein statistischer Zusammenhang nachweisen. Aus zahlreichen epidemiologischen Studien ist bekannt, dass chronisch entzündliche Erkrankungen das Auftreten von Karzinomen begünstigen. [69-74] Dies gilt auch für das Pankreaskarzinom. Wie bereits dargestellt, ist die chronische Pankreatitis als Risikofaktor für das Pankreaskarzinom bekannt. [2, 4, 9-11] In der histologischen Aufarbeitung von Pankreaskarzinomresektionspräparaten lassen sich außerdem in den meisten Fällen entzündliche Veränderungen nachweisen. [15, 19, 75]

Allerdings finden sich entzündliche Komponenten auch im Gewebe von Tumoren, die nicht klassischerweise mit entzündlichen Erkrankungen assoziiert sind. [69, 74] Man weiß heute, dass nicht nur eine „extrinsische“, sondern auch eine von Tumorzellen selbst ausgelöste „intrinsische“ Entzündung zu den tumorfördernden Mechanismen zählt. [69, 74, 76] Tumorzellen können „aktiv“ ein entzündliches Tumormikromilieu fördern, etwa durch Sekretion von Entzündungsmediatoren. Zudem kann die – meist dysfunktionale – Reaktion des Immunsystems zur Tumorentwicklung beitragen. [69, 74, 77]

Wie bereits dargestellt, stellen neoplastische Zellen beim Pankreaskarzinom oft nur einen geringen Teil des Tumorgewebes dar, während bis zu 80% der Tumormasse von desmoplastischem Stroma gebildet werden. Im desmoplastischen Stroma finden sich Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems – von Makrophagen bis hin zu Lymphozyten. Außerdem ist es geprägt von zahlreichen nichtzellulären Faktoren, zu denen auch verschiedenste Entzündungsmediatoren zählen. [19, 20, 78, 79]

Zahlreiche Auswirkungen im Rahmen der Tumorigenese wurden für Entzündungsmediatoren in der Literatur beschrieben. So können Zellteilung, Zellwachstum und Zellüberleben gefördert werden. [80, 81] Oft aktivieren sie onkogene Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B. [69, 82, 83] Zudem können sie eine antitumorigene Immunantwort unterdrücken. [76, 83] Durch Entzündungsmediatoren können Immunzellen zum Tumor rekrutiert werden, die ihrerseits wiederum eine Reihe von Mediatoren produzieren. [20] Insgesamt entsteht so ein komplexes

Tumormikromilieu, in dem die verschiedenen Akteure miteinander kommunizieren und sich gegenseitig beeinflussen. Unabhängig von der Ursache können durch dieses inflammatorische Mikromilieu Tumorwachstum, Progression, Metastasierung, Neoangiogenese und Therapieresistenz gefördert werden. [20, 69, 74, 76, 78-83]

Eine bedeutende Rolle unter den Entzündungsmediatoren kommt den Zytokinen zu. Sie lassen sich in solche mit pro- und mit antiinflammatorischer Wirkung unterteilen. Klassischerweise als proinflammatorisch werden hierbei etwa Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) angesehen, als antiinflammatorisch z.B. Interleukin-10 (IL-10). Die Expression und Wirkung von Zytokinen bei verschiedenen Tumorentitäten wurde in zahlreichen Studien untersucht. [20, 74, 76, 77, 79-83]

Oft lassen sich erhöhte Zytokinkonzentrationen nicht nur im Primärtumorgewebe, sondern auch im Serum von Patienten nachweisen. Dies ist häufig mit negativen klinischen Eigenschaften (z.B. Kachexie) und mit einer schlechten Prognose assoziiert. [77]

Im Folgenden werden die Zytokine näher dargestellt, deren Expression in dieser Arbeit untersucht wurde.

### **1.3.1 TNF- $\alpha$**

Ein prototypisches proinflammatorisches Zytokin ist TNF- $\alpha$ . Eine Rolle spielt TNF- $\alpha$  sowohl bei akuten und chronischen Entzündungen, als auch bei Autoimmunerkrankungen und bei Tumorerkrankungen. Es kann verschiedene Zytokine und Chemokine induzieren und sorgt für die Aktivierung und das Anlocken inflammatorischer Zellen zum Ort der Entzündung. [76, 77, 79, 84, 85]

Verschiedenste Tumorzellen, darunter auch Pankreaskarzinomzellen, und inflammatorische Zellen des Tumormikromilieus können TNF- $\alpha$  exprimieren. [81, 86-88] Die Induktion von TNF- $\alpha$  erfolgt u.a. über MAPK-Signalwege. Außerdem gibt es am Promotor Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B. [85, 89-91] TNF- $\alpha$  besitzt ein tumorförderndes Potential, kann jedoch in hohen Dosen auch tumortoxisch wirken und eine Tumornekrose hervorrufen. [76, 79, 92]

In vielen Untersuchungen wurde ein Einfluss von TNF- $\alpha$  auf wesentliche Schritte der Tumorentwicklung gezeigt: es kann Tumorinitiation, Zellüberleben, Tumorwachstum, Invasivität, Metastasierung und Angiogenese fördern. [76, 79, 81, 87, 93, 94] In der Literatur wurden mehrere Mechanismen beschrieben, über die TNF- $\alpha$  diese Schritte beeinflussen kann.

Beispielsweise kann es beim humanen Pankreaskarzinom Wachstumsprozesse regulieren, indem es gleichzeitig EGF-Rezeptoren und deren aktivierenden Ligand TGF- $\alpha$  hochreguliert. [95] Für Zervixepithelzellen wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  deren Proliferation durch die Induktion autokriner Wachstumsfaktoren stimuliert. [96] Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass TNF- $\alpha$  das Tumorwachstum über eine NF- $\kappa$ B-abhängige Stimulation antiapoptotischer Genprodukte fördern kann. [97]

Unter anderem über die Stimulation proangiogener Faktoren, wie VEGF, bFGF oder IL-8 kann TNF- $\alpha$  zur Angiogenese beitragen. [98-101] Im Bronchialzellkarzinommodell führte die konstitutive Produktion kleiner Mengen TNF- $\alpha$  durch maligne Zellen zu einer Hyperpermeabilität von Blutgefäßen und somit zu Pleuraergüssen. [102]

TNF- $\alpha$  kann die Expression von Adhäsionsmolekülen auf epithelialen Zellen, sowie die Adhäsion von Tumorzellen an Epithelzellen stimulieren. Diese molekularen Mechanismen sind eigentlich typisch für migrierende Leukozyten. Tumorzellen können diese nutzen, um sich auf diese Weise an entfernten Stellen anzusiedeln und Metastasen zu bilden. [80, 103, 104] Außerdem kann TNF- $\alpha$  die Motilität epithelialer Tumorzellen stimulieren. [105] Zudem kann TNF- $\alpha$  die Expression von Proteasen induzieren. Die daraus resultierende Degradation extrazellulärer Matrix ist ebenfalls für die Invasion von Tumorzellen von Bedeutung. [80, 106-108]

Weiterhin kann TNF- $\alpha$  zur zellulären Transformation und beispielsweise durch die Stimulation der Produktion von genotoxischen Molekülen auch erst zur Tumorinitiation beitragen. [76, 81, 93]

Bei einer Reihe von Tumorerkrankungen, darunter auch beim Pankreaskarzinom, konnten erhöhte Level von TNF- $\alpha$  im Serum und im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Diese korrelierten mit Kachexie und einer schlechten Prognose. [79, 81, 106, 109]

### 1.3.2 IL-6

Eines der bei malignen Erkrankungen am häufigsten deregulierten proinflammatorischen Zytokine ist IL-6. Seine grundsätzliche Bedeutung liegt in der physiologischen Antwort des Immunsystems auf Infektionen und Verletzungen. [79, 110, 111] Bei vielen humanen Tumoren, darunter auch beim Pankreaskarzinom, konnte eine erhöhte IL-6-Produktion gezeigt werden. Als autokriner und parakriner Faktor beeinflusst IL-6 wichtige Tumoreigenschaften, wie Proliferation, Zellüberleben, Invasion, Metastasierung und Angiogenese. [79, 110, 112-115]

Die Bindung von IL-6 an zelluläre Rezeptoren stimuliert eine Reihe von Signaltransduktionswegen und Genen, von denen viele eine protumorigene Wirkung besitzen. In der Signalübertragung spielt dabei insbesondere die Aktivierung von STAT3 eine wichtige Rolle. Weitere Signaltransduktionswege betreffen die Ras/MAPK-Signalkaskade oder PI3K/Akt. Auch diese beeinflussen Zellwachstum, Zellüberleben, Zellzyklusprogression und Zellmigration. [110, 112, 116]

Von STAT3 können für Apoptose und Zellzyklusprogression wichtige Gene, wie z.B. bcl-2 oder Zyklin D1, reguliert werden. Dadurch können Zellüberleben, Zellzyklusprogression und die Proliferation prämaligener und maligner Zellen gefördert werden. [117-119] Eine STAT3-vermittelte Expression von Proteasen trägt zu Invasion und Metastasierung bei. [112, 120] Angiogenese kann IL-6 durch Expression von proangiogenetischen Molekülen, wie z.B. VEGF induzieren. [112, 121-123] Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass IL-6 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli und zu einer erhöhten Chemoresistenz von Tumorzellen führen kann. [110]

IL-6 kann durch eine Reihe von Zytokinen induziert werden und ist seinerseits wiederum in der Lage, die Expression weiterer Zytokine zu fördern. So kann es zur Aufrechterhaltung eines entzündlichen Tumormikromilieus beitragen. [84, 112, 124]

Bei vielen Tumorerkrankungen lassen sich erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen nachweisen. Diese sind meist mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien und einer schlechten Prognose assoziiert. [77, 110] Auch beim Pankreaskarzinom konnten erhöhte IL-6-Serumlevel mit Gewichtsverlust, Kachexie und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden. [113, 125-127]

### 1.3.3 IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das bei malignen Erkrankungen und auch beim Pankreaskarzinom von Bedeutung zu sein scheint, ist IL-1 $\beta$ . [125, 128, 129] Es besitzt eine wachstumsfördernde Wirkung und beeinflusst das Migrationspotential, die Invasivität und das Metastasierungspotential von Tumoren. [129-133] Mitverantwortlich für diese Effekte kann eine von IL-1 $\beta$  geförderte Induktion angiogener Faktoren, wie z. B. VEGF, sein. Dadurch kann IL-1 $\beta$  Neoangiogenese fördern. [130, 134] Zudem konnte für Melanomzellen gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  durch die Beeinflussung der Interaktion von Tumor- und Endothelzellen über die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen den Metastasierungsprozess begünstigt. [135] Weiterhin wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  zu einer erhöhten Chemoresistenz beitragen kann. Möglicherweise daran beteiligte molekulare Mechanismen sind die Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder COX-2. [128, 136] IL-1 $\beta$  ist Teil eines Zytokinnetzwerkes und fördert die Induktion weiterer Zytokine, wie z.B. IL-6 oder TNF- $\alpha$ . [137] Erhöhte IL-1 $\beta$  Serumkonzentrationen können beim Pankreaskarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert sein. [125, 138]

Bei Tumorerkrankungen von Bedeutung ist auch das Zytokin IL-2. [77] IL-2 wird produziert von Zellen des Immunsystems. Als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor beeinflusst IL-2 seinerseits wiederum verschiedene T-Zellen und andere Zellen des Immunsystems. [77, 139, 140] Für die Expression von IL-2 wichtige Transkriptionsfaktoren sind unter anderem NF- $\kappa$ B und der auch am JNK-Signalweg beteiligte Transkriptionsfaktorkomplex AP-1. [139, 141]

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass niedrige IL-2 Konzentrationen mit einer schlechten Prognose bei malignen Erkrankungen assoziiert sein können. [142] Für das metastasierte Nierenzellkarzinom und Melanom wurde IL-2 zum Teil als therapeutische Substanz eingesetzt, auch wenn dies nicht gänzlich unumstritten ist. Als therapeutischer Mechanismus wird die Modulation der anti-Tumor-Aktivität des Immunsystems diskutiert. [140, 143]

Ebenfalls in Verbindung mit Tumorerkrankungen wird auch IL-10 gebracht. IL-10 kann von Immunzellen, aber auch von einigen Tumorzellen exprimiert werden. [144-147] An der Induktion von IL-10 sind verschiedene Signalwege und Transkriptionsfaktoren beteiligt, darunter STAT-Moleküle und der Transkriptionsfaktorkomplex AP-1. [146] Von einigen Autoren wird IL-10 eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben. Diese wird dadurch begründet, dass IL-10 dazu führt, dass eine effektive anti-Tumor-Immunantwort verhindert wird und Tumore so einer Elimination durch das Immunsystem entgehen können. Einige experimentelle Arbeiten stützen diese These. [148]

Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass IL-10 die körpereigene Abwehr von malignen Zellen durch das Immunsystem stimuliert. Die antitumorogene Wirkung wird in verschiedenen Studien beschrieben. Es gibt z.B. Ergebnisse, die zeigen, dass die Expression von IL-10 zu einem verminderten Tumorwachstum und einer verminderten Metastasierung führen kann. An einer antitumorogenen Wirkung könnten eine antiangiogene Wirkung von IL-10, sowie die Induktion tumortoxischer Moleküle beteiligt sein. [148-150]

Einige Untersuchungen zeigen, dass die IL-10 Serumkonzentrationen beim Pankreaskarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sein können. [127, 151-153] Die Wertigkeit hoher Serumlevel bei Tumorerkrankungen wird kontrovers diskutiert. Während manche Studien aus erhöhten Serumkonzentrationen keine weiteren Schlüsse zulassen, deuten andere darauf hin, dass sich erhöhte Serumlevel mit einem schlechten klinischen Status und einer ungünstigen Prognose assoziieren lassen. [127, 148, 152]

## **2 ZIEL DER ARBEIT/ EXPERIMENTELLE SCHRITTE**

Wie einleitend dargestellt, ist das duktales Pankreasadenokarzinom eines der aggressivsten Tumore des Menschen mit einer sehr ungünstigen Prognose. Grund für die schlechte Prognose ist auch das Fehlen effektiver systemischer Therapien. Insbesondere zielgerichtete Therapeutika sind bislang für das Pankreaskarzinom fast nicht verfügbar. Um zielgerichtete Therapien entwickeln zu können, ist es notwendig, genauere Kenntnisse über molekulare Mechanismen, die einen malignen Phänotyp bedingen, zu erlangen. Diese Arbeit versucht daher, durch Charakterisierung des Proteins IFIT3 (interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3) einen Beitrag dazu zu leisten, Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien zu finden.

Dabei stützt sich diese Arbeit auf ein Tumormodell, das zur Untersuchung der Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom entwickelt wurde. [154] Mit dem Ziel mögliche Ursachen für die aggressive Tumorbilologie zu finden, wurden die beiden Tumorzelllinien dieses Modells bereits früher in unserer Arbeitsgruppe genomisch mittels Affymetrix-Genchip Analyse untersucht. Daher war bekannt, dass in der aggressiven, hoch-metastatischen Zelllinie L3.6pl das Protein IFIT3 im Vergleich zur niedrig-metastatischen, langsam wachsenden Ursprungszelllinie COLO357FG differentiell überexprimiert ist.

Ziel war es nun zunächst, aufzudecken, welche Bedeutung das Protein IFIT3 für die Tumorbilologie des humanen Pankreaskarzinoms besitzt. Hierfür wurde *in vitro* der Einfluss auf die Expression neoangiogenetischer Faktoren, auf den Zellzyklus und die Apoptoserate, sowie auf die Chemotherapieresistenz der Zellen untersucht.

In einem weiteren Schritt wurden verschiedene molekulare Mechanismen untersucht, die die Expression und Funktion von IFIT3 beeinflussen. Im Detail wurden Induktionssignale und Transkriptionsfaktoren von IFIT3 *in vitro* identifiziert.

Die Ergebnisse der ersten Schritte deuteten darauf hin, dass IFIT3 eine Rolle im Rahmen der entzündlichen Komponente des Pankreaskarzinoms spielt. Deshalb wurde zuletzt der Einfluss von IFIT3 auf die Ausbildung eines inflammatorischen

Tumormikromilieu untersucht. Hierfür wurde die Fähigkeit der verschiedenen Zelllinien, inflammatorische Zytokine zu induzieren, analysiert.

## 3 MATERIAL

### 3.1 Zelllinien

#### 3.1.1 Die humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG (FG)

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG (kurz: FG) ist die schnell wachsende (fast growing) Variante der Zelllinie COLO357, die 1980 von Morgan et al. etabliert wurde. COLO357-Zellen wurden aus einem zöliakalen Lymphknoten eines Pankreaskarzinompatienten gewonnen, der partiell von neoplastischen Foci mit gut differenzierten, Muzin enthaltenden Pankreasgängen durchsetzt war. [154]

#### 3.1.2 Die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl

Die hochtumorigene und hochmetastatische humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl wurde 1999 von Bruns et al. durch *in vivo* Selektion etabliert. Als parentale Zelllinie diente die Zelllinie L3.3, die von Vezeridis et al. nach Injektion von COLO357FG-Zellen in die Milz von Nacktmäusen isoliert wurden. Diese Zelllinie bildete vermehrt Lebermetastasen. Bruns et al. injizierten L3.3-Zellen orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen. Auf diese Weise entstanden spontane Lebermetastasen, die sämtliche Schritte der Metastasierung durchlaufen hatten. Zellen der Lebermetastasen wurden kultiviert und wiederum in das Pankreas von Nacktmäusen injiziert. Nach drei Selektionszyklen entstand so die Zelllinie L3.6pl (pancreas to liver), die in der Zellkultur etabliert wurde. [154]

L3.6pl unterscheidet sich von den ursprünglichen COLO357FG-Zellen durch eine erhöhte Tumorigenität und ein erhöhtes Metastasierungspotential. [154]

### **3.1.3 Die IFIT3-transfizierten Zelllinien COLO357FG/CMV-IFIT3 und L3.6pl/CMV-IFIT3 und die Leervektorzellen COLO357FG/CMV-null und L3.6pl/CMV-null**

Die Zelllinien COLO357FG/CMV-IFIT3 und L3.6pl/CMV-IFIT3 wurden, ebenso wie die folgenden Zelllinien bereits früher durch unsere Arbeitsgruppe entwickelt und standen für diese Arbeit zur Verfügung.

In COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen und L3.6pl/CMV-IFIT3-Zellen kommt es zu einer konstitutiven (Über-)Expression von IFIT3. Diese Zelllinien entstanden mit Hilfe des pcDNA3.2-Expressionsvektors. In diesen wurde das IFIT3-Gen mit Hilfe folgender Primer durch Klonierung inseriert:

IFIT3forw: GAAGGAACTGGGCCCGCCTGCTAAG,

IFIT3rev: GCCCTGGCCCATTTCTCACTACC.

Der Vektor enthält den humanen CMV Promotor, unter dem IFIT3 konstitutiv exprimiert wird.

Die transfizierten Zellen sind resistent gegenüber G418. Die Selektion der Zellen erfolgte somit durch schrittweise Zugabe von G418 bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml.

Für Experimente, bei denen ein Vergleich mit IFIT3-überexprimierenden Zellen stattfand, wurden COLO357FG- und L3.6pl-Leervektorzellen (COLO357FG/CMV-null und L3.6pl/CMV-null) verwendet, die nur den (Leer-)Vektor pcDNA3.2 ohne das IFIT3-Gen enthalten.

### **3.1.4 Die Zelllinie L3.6pl-6TR-Sox9shRNA**

In der Zelllinie L3.6pl-6TR-Sox9shRNA kann Sox9 funktionell durch Sox9shRNA-Expression und somit durch RNA-Interferenz ausgeschaltet werden. Ursprungszellen sind mit dem Plasmid pcDNA 6TR stabil transfizierte L3.6pl-Zellen, die eine Expression des E.-coli-Tetrazyklinrepressors aufweisen.

Diese Zellen sind wiederum stabil transfiziert mit einem Plasmid, das Sox9shRNA kodiert (basierend auf dem Plasmidvektor pENTR/H1/TO). Für die Konstruktion dieses Plasmids waren folgende für das humane Sox9shRNA-Gen spezifische Oligonukleotide verwendet worden:

Sox9shRNAforw:

CACCGCAAGCTCTGGAGACTTCTGACGAATCAGAAGTCTCCAGAGCTTG,

Sox9shRNArev:

AAAAGCAAGCTCTGGAGACTTCTGATTCGTCAGAAGTCTCCAGAGCTTGC.

Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgt durch Zugabe von 10 µg/ml Blasticidin und 100 µg/ml Zeocin.

Die Expression von Sox9shRNA kann durch eine 48-stündige Behandlung mit 10 µg/ml Tetrazyklin induziert werden.

Sox9shRNA bindet spezifisch nur das Zielgen.

### **3.1.5 Die Zelllinie L3.6pl-6TR-LacZshRNA**

Ursprungszellen der L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zelllinie sind mit dem Plasmid pcDNA 6TR stabil transfizierte L3.6pl-Zellen. Zusätzlich sind diese Zellen stabil transfiziert mit einem linearen Plasmid, das LacZshRNA kodiert (basierend auf dem Plasmidvektor pENTR/H1/TO). Für die Konstruktion des Plasmids waren folgende für das E. coli LacZ Gen spezifische Oligonukleotide verwendet worden:

LacZshRNAforw:

CACCGGTTGTTACTCGCTCACATTTTCGAAAAATGTGAGCGAGTAACAACC,

LacZshRNArev:

AAAAGGTTGTTACTCGCTCACATTTTTTCGAAATGTGAGCGAGTAACAACC.

Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgt durch Zugabe von 10 µg/ml Blasticidin und 100 µg/ml Zeocin.

Die Expression von LacZshRNA kann durch eine 48-stündige Behandlung mit 10 µg/ml Tetrazyklin induziert werden.

E. coli LacZshRNA besitzt kein Zielgen im menschlichen Genom.

## 3.2 Laborequipment

### 3.2.1 Verbrauchsmaterialien

6-well Kulturplatten	Nunc, Dänemark
96 well Elisa Platte Maxisorb	Nunc, Dänemark
Cryotube (1.0 mL)	Nunc, Dänemark
DNase, RNase-freie Filterspitzen	Starlab, Deutschland
Eppendorf safe-lock tubes (0.6 ml, 1.5 ml, 2.0 ml)	Eppendorf, Deutschland
Falcon Röhrchen 50ml	BD Bioscience, USA
Filterpapiere	Schleicher & Schüll, Deutschland
Flüssigstickstoff	Klinikum Großhadern, LMU, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Deutschland
NUNC Sterile Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm <sup>2</sup> )	Thermo Fisher, USA
Pipettenspitzen	Gilson, USA
PVDF-Membranen	Amersham GE, Schweden
Stripetten (5, 10, 25 ml)	Corning Inc., USA
Zellschaber	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP, Schweiz

### 3.2.2 Geräte

Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Siemens, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Siemens, Deutschland
Flüssigstickstofftank	MVE, USA
Akku-Pipettierhilfe	IBS-INTEGRA Biosciences, Schweiz

---

Pipetten	Gilson, USA
Mikroskope	Zeiss, Deutschland
Zentrifugen	Hettrich und Eppendorf, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator	BINDER, Deutschland
Herasafe EN12469 2000 Class II Safety Cabinet	Thermo Fisher, USA
Digitale Präzisionswaage	Mettler, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Deutschland
Handklickzähler	Carl Roth, Deutschland
Vortex	IKA Works, USA
Wasserbad	GFL, Deutschland
UV Transilluminator	Bachofer, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Deutschland
Rocking Platforms (Wippschüttler)	Biometra, Deutschland
Elektrophorese-System	Bio-Rad, USA
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, USA
Power Supply	Bio-Rad, USA
Elektrophoresekammer	PeqLab, Deutschland
VERSAmax microplate reader	Molecular Devices, USA
ELISA reader	Tecan, Deutschland
GeneQuant™ pro RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Deutschland
PCR-Thermocycler	Eppendorf, Deutschland
Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
LightCycler system	Roche, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, USA

### 3.3 Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM	Gibco Invitrogen, USA
FCS	Biochrom, Deutschland
L-Glutamine/ Glutamax	PAN Biotech, Deutschland / Gibco, USA
MEM NEAA	PAN Biotech, Deutschland
MEM (100 x) vitamine solution	PAN Biotech, Deutschland
Penicillin (10.000 U/mL) / Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech, Deutschland
PBS-Puffer	PAN Biotech, Deutschland
Trypsin 0.25 % / EDTA 0.02 % in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	PAN Biotech, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau (0.4%)	Sigma-Aldrich, USA
BAY11-7082	Enzo Life Sciences, Deutschland
Blasticidin	Invitrogen, USA
G418 = Geneticin	Invitrogen, USA
IFN- $\alpha$ 2a	Sigma-Aldrich, USA
S 14-95	Enzo Life Sciences, Deutschland
Tetrazyklin	Carl Roth, Deutschland
Zeocin	Invitrogen, USA
Irinotecan	Sigma-Aldrich, USA
5-FU	Sigma-Aldrich, USA
Gemcitabin (Gemzar)	Lilly, USA

## 3.4 RNA-Extraktion, PCR, Immunoblot, FACS, ELISA

### 3.4.1 Reagenzien

10 x Reaction buffer mit MgCl <sub>2</sub>	Roche Applied Science, Deutschland
1kbp Ladder	Invitrogen, USA
30 % Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad, USA
Agarose	Sigma-Aldrich/ Invitrogen, USA
APS	Sigma-Aldrich, USA
Bromphenolblau	Carl Roth, Deutschland
DNA – Ladder 100 bp, inkl. 6x Loading Dye	Roche Applied Science; MBI Fermentas
Ethanol	Merck, Deutschland
Ethidiumbromid 1 %	Merck, Deutschland / Bio-Rad, USA
Glycerol	Merck, Deutschland
Glycin für die Biochemie	Carl Roth, Deutschland
HCL	Merck, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	Roche Applied Science, Deutschland
Milchpulver (blotting grade)	Sigma-Aldrich, USA
Mineralöl	Sigma-Aldrich, USA
MOPS	Merck, Deutschland
NaCl	Merck, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich, USA/ Merck, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, USA
n-Butanol	Carl Roth, Deutschland

Nukleotidmix 10 mM	Roche Applied Science, Deutschland
PeqGOLD prestained protein marker IV	PeqLab, Deutschland
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, USA
RNase freie DNase	Qiagen, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, USA
TAE-Puffer	Eppendorf, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Roche Applied Science, Deutschland
TEMED	ICN Biomedicals Inc, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
TRIZMA base	Sigma-Aldrich, USA
TRIZMA hydrochloride	Sigma-Aldrich, USA
Tween 20	Merck, Deutschland
Wasser für die Molekularbiologie (DNase frei)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Xylol	Merck, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA

### 3.4.2 Kits

Human IL-1β Platinum ELISA	BenderMedsystems, Österreich
Human IL-2 Platinum ELISA	BenderMedsystems, Österreich
Human IL-6 Platinum ELISA	BenderMedsystems, Österreich
Human TNF-α Platinum ELISA	BenderMedsystems, Österreich
Human VEGF-A Platinum ELISA	BenderMedsystems, Österreich
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Deutschland
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity	Invitrogen, USA



### 3.5 Software

Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems Inc., USA
Axio Vision 4.4	Carl Zeiss GmbH, Germany
EndNote X7	Thomson Reuter, CA, USA
Gelpro32	Media Cybernetics, USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, USA
Microsoft Office 2010 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft Corporation, USA
Origin	Microsoft Corporation, USA
SoftMax® Pro	Molecular Devices Corporation, USA
WinDMI2.8 software	Scripps Research Institute, USA
Windows 7	Microsoft Corporation, USA

## 4 METHODEN

### 4.1 Zellkulturmethoden

#### 4.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden als Monolayer in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM, das mit 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 2 % nicht essentiellen Aminosäuren, 2 % einer Vitaminlösung und 1 % einer Penicillin-Streptomycin-Mischung versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C, > 98 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>.

Dem Medium der transfizierten Zelllinien L3.6pl-6TR-SOX9shRNA und L3.6pl-6TR-LacZshRNA wurde zur Selektion 10 µg/ml Blasticidin und 100 µg/ml Zeocin zugefügt. Beide Antibiotika töten nicht transfizierte Zellen ab.

Die Selektion der Zelllinie COLO357FG/CMV-IFIT3 und L3.6pl/CMV-IFIT3 erfolgte durch schrittweise Zugabe von G418 bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml.

Etwa alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellkulturflasche mit neuem Medium befüllt.

Alle Zelllinien wurden regelmäßig negativ auf Mykoplasmen getestet (s. 4.1.7).

#### 4.1.2 Kulturbedingungen vor experimentellen Auswertungen

Vor experimentellen Auswertungen wurden die Zellen in Starvation-Medium kultiviert. Gegenüber normalem Medium ist hier der Anteil an FCS auf 0,5 % reduziert.

### **4.1.3 Splitten**

Waren die Zellen zu 70 - 80 % konfluent, wurden sie im Verhältnis 1:3 oder 1:4 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Zum Lösen vom Flaschenboden erfolgte eine etwa 2-minütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin/EDTA. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Zur Trypsinaktivierung wurde mit FCS versetztes Medium in gleicher Menge zugegeben. Die Zell-Medium-Suspension wurde in einem Falconröhrchen für 7 Minuten bei etwa 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert, ausgezählt und dem Splitverhältnis entsprechend in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

### **4.1.4 Langzeitkonservierung der Zellen**

Längerfristig nicht benötigte Zellen wurden im Flüssigstickstofftank gelagert. Hierfür wurden die Zellen wie beim Splitten vom Flaschenboden gelöst und zentrifugiert (s. 4.1.3). Das Zellpellet wurde mit einem Einfriermedium, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO, resuspendiert. DMSO soll als kryoprotektives Reagenz kältebedingte Zellschäden minimieren. Jeweils 1 bis 2 Millionen suspendierte Zellen wurden in ein spezielles Einfriertube (1 ml) gefüllt und zunächst im Isopropranolol-Kryocontainer bei -80 °C im Gefrierschrank für 72 Stunden langsam abgekühlt. Anschließend wurden die Tubes in den Stickstofftank überführt.

### **4.1.5 Rekultivierung eingefrorener Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden zunächst für ein bis zwei Minuten bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt, bis die Zellen fast vollständig aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellen sofort in eine Zellkulturflasche mit Kulturmedium überführt. Nach einem Tag im Inkubator fand der erste Mediumwechsel statt.

#### 4.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt avitale Zellen blau. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden auf eine Neubauer Zählkammer aufgebracht. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die vitalen Zellen in vier Eckquadraten ausgezählt. Hieraus ließ sich anhand des Verdünnungsfaktors und des Volumens der Eckquadrate die Zellzahl pro ml errechnen.

#### 4.1.7 Testung auf Mykoplasmenkontamination

Sind Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert, so kann dies zu reduziertem Zellwachstum und veränderter Genexpression führen. [155] Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde regelmäßig eine Testung durchgeführt, die mittels PCR Mykoplasmen-DNA nachweist.

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert. Nach drei Tagen wurde der Zellkulturüberstand der möglichst konfluenten Zellen abgenommen, zentrifugiert und der Überstand für 5 Minuten bei 96 °C inkubiert. Bis zur Testung erfolgte die Lagerung bei -20 °C im Gefrierschrank.

Für die PCR-Reaktion wurde je 1 µl Zellkulturüberstand mit 24 µl Mastermix in PCR-Tubes vermischt. Als Negativkontrolle diente molekularbiologisches Wasser, als Positivkontrolle ein Zellkulturüberstand mit bekannter Mykoplasmenkontamination.

Mastermix

H <sub>2</sub> O (DNase frei):	19,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM):	0,75 µl
10x Reaction Buffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> :	2,5 µl
Nukleotid Mix:	0,5 µl
Primer forward (100 µM):	0,1 µl
Primer reverse (100 µM):	0,1 µl
Taq DNA-Polymerase:	0,1 µl

Die initiale Denaturierung erfolgte für 2 Minuten bei 94 °C, daran schlossen sich 35 PCR-Zyklen an (Denaturierung: 94 °C, 30 s; Primer Annealing: 55 °C, 30 s; Amplifikation: 72 °C, 30 s). Die finale Amplifikation erfolgte für 4 Minuten bei 72 °C. Danach kühlte der Thermoblock auf 4 °C ab.

Im Anschluss erfolgte die Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese (60 min Laufdauer bei 100 V, 200 mA und 50 W) und die Auswertung unter UV-Licht.

## **4.2 RNA-Detektion**

Der qualitative und quantitative Nachweis und Vergleich der IFIT3 mRNA Expression in FG- und L3.6pl-Zellen erfolgte mittels Reverser-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

### **4.2.1 Behandlung der Zellen**

Um die differentielle Expression von IFIT3 zu bestätigen, wurden COLO357FG- und L3.6pl-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in Starvation-Medium kultiviert und dann mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert.

Für die Stimmulations- und Inhibitionsexperimente wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert, dann erfolgte ein Wechsel auf das Starvation-medium mit einem FCS-Gehalt von lediglich 0,5 %.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie folgt behandelt:

Um den Einfluss von IFN- $\alpha$  auf die IFIT3-Expression zu untersuchen wurden COLO357FG- und L3.6pl-Zellen für 24 Stunden mit 0,2 IU/ml IFN- $\alpha$ 2a stimuliert. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wurde durch eine 48-stündige Behandlung mit 5  $\mu$ M BAY 11-7082 inhibiert. Die Aktivierung von STAT1 wurde durch eine 48-stündige Behandlung mit 20  $\mu$ g/ml S14-95 inhibiert. Um den Einfluss von Sox9 auf die IFIT3-Expression zu untersuchen, wurden L3.6pl-6TR-Sox9shRNA-Zellen zur Induktion der Sox9shRNA für 48 Stunden mit 10  $\mu$ g/ml Tetrazyklin behandelt.

Alle PCR-Produkte wurden im Genzentrum München sequenziert.

## 4.2.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das „RNeasy Mini Kit“ entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet. Die Zellen wurden vom Flaschenboden gelöst und in einem RNase-freien Tube für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. (vgl. 4.1.3) Nach Lyse der Zellen durch Zugabe des mitgelieferten RLT-Puffers wurde das Lysat homogenisiert. 700 µl des homogenisierten Lysats wurden nach Zugabe von 70 %-igem Ethanol auf eine RNeasy spin-Säule gegeben und bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert, um die RNA an die Säule zu binden. Anschließend wurde die Säule mit den beiden Puffern RW1 und RPE gewaschen und DNA-Spuren durch RNase-freie DNase degradiert. Die gebundene RNA wurde durch Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 x g in RNase freies Wasser eluiert.

Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte mittels Spektrophotometrie unter Verwendung des GeneQuant Pro RNA/DNA calculators.

Die Integrität der RNA wurde anhand einer Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Ein RNA sample wurde mit 10 µl eines Ladepuffers vermischt, für 5 Minuten bei 80 °C denaturiert, auf 1%-igem Formaldehydagarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Als Kriterium für die Qualität der RNA galten die Unversehrtheit der 28S- und der 18S-rRNA Banden, sowie eine doppelte Intensität der 28S- gegenüber der 18S-rRNA Bande.

## 4.2.3 semi-quantitative RT-PCR

Zum Nachweis von IFIT3 mRNA wurde das „SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity“-Kit entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet.

RNase-freies Wasser mit der extrahierten RNA wurde mit einer passenden Menge Mastermix (bestehend aus 2 x Reaction Mix, IFIT3 Primer forward (10 µM), IFIT3 Primer reverse (10 µM), SuperScript® III RT/ Platinum® Taq High Fidelity Enzyme Mix und autoklaviertem destilliertem Wasser) gemischt und in einen Thermocycler überführt. Die SuperScript® III Reverse Transkriptase schreibt IFIT3-mRNA in cDNA

um. Anschließend wird die cDNA durch eine PCR mit Hilfe IFIT3-spezifischer Primer vervielfältigt.

Zur Kontrolle einer eventuellen Verunreinigung mit gDNA wurde für jedes RNA sample eine PCR mit einem Mastermix ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. In diesen Ansätzen kann keine Umschreibung von RNA in cDNA erfolgen und somit nur gDNA vervielfältigt werden. Außerdem wurde zur Kontrolle eventuell verunreinigender DNA ein Ansatz ohne Template hergestellt. Auf diese Weise ließen sich Verunreinigungen ausschließen.

Primer:

IFIT3 forward	GAAGGAACTGGGCCGCCTGCTAAG
IFIT3 reverse	GCCCTGGCCCATTTCTCACTACC
GAPDH forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGTATTGGGCG
GAPDH reverse	GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC
β-actin forward	GATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC
β-actin reverse	CTCGCGGTTGGCCTTGGGGTTCAG

Der Nachweis amplifizierter cDNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Da DNA wegen der Phosphatreste pH-unabhängig negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld Richtung Anode. Die dabei entstehenden Banden enthalten DNA ähnlicher Größe. Es wurde außerdem ein 1 kb Marker als Standard aufgetragen, der DNA-Fragmente bekannter Länge enthält.

Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht. Durch Vergleichen der probenspezifischen Bande mit dem Marker ließ sich auf die Länge, sowie die Menge der in den Proben enthaltenen DNA schließen.

#### **4.2.4 quantitative real time RT-PCR**

Anhand der quantitativen real time RT-PCR wurde die IFIT3-mRNA-Expression der verschiedenen Zelllinien quantifiziert und miteinander verglichen.

Hierfür wurde das „SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR“-Kit entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet.

Auch hierbei wurde die RNA zunächst durch eine Transkriptase in cDNA umgeschrieben und dann mittels DNA-Polymerase vervielfältigt. Der dem PCR-Ansatz zugesetzte Farbstoff SYBR-Green I sendet durch Bindung an doppelsträngige cDNA ein Fluoreszenzsignal aus. Die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus korreliert mit dem Anstieg der cDNA-Konzentration. Der Ansatz erlaubte also eine quantitative Bestimmung des PCR Produktes am Ende eines jeden Zyklus.

RNAse-freies Wasser mit der extrahierten RNA wurde mit einer entsprechenden Menge Mastermix (bestehend aus SuperScriptR III RT/Platinum® Taq Mix (includes RNaseOUT™), 2X SYBR Green Reaction Mix, Forward primer (10 µM), Reverse primer (10 µM), DEPC-treated water) gemischt, in eine 96-well Platte gegeben und in einen Lightcycler überführt. Die Experimente wurden als Triplets durchgeführt.

Als Referenzgen für den relativen Mengenvergleich diente das Housekeeping Gen GAPDH, welches in einem eigenen Ansatz bestimmt wurde.

Zur Kontrolle einer eventuellen Verunreinigung mit gDNA wurde für jedes RNA sample eine PCR mit einem Mastermix ohne Reverse Transkriptase und mit einem Ansatz ohne Template durchgeführt.

Primer: IFIT3 forward, IFIT3 reverse, GAPDH forward, GAPDH reverse: s. 4.2.3.

Optimale Ergebnisse wurden nach 45 PCR-Zyklen erreicht.

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurde eine Plasmidkontrolle verwendet.

## **4.3 Immunoblotting**

Immunoblotting dient dem Nachweis von Proteinen. Nach Lyse der Zellen werden die Zellproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf einer Gelmatrix aufgetrennt, mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und zuletzt mittels Immunodetektion sichtbar gemacht.

### **4.3.1 Behandlung der Zellen zum Nachweis und Vergleich der IFIT3 Proteinexpression in COLO357FG- und L3.6pl-Zellen**

Für die Bestätigung der differentiellen Expression von IFIT3 wurden COLO357FG-Zellen und L3.6pl-Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in Starvation-Medium kultiviert.

Für die Immunodetektion wurden als erster Antikörper ein Anti-humanes-IFIT3-Mausantikörper und als zweiter Antikörper ein biotinylierter Anti-Maus-Ziegenantikörper verwendet.

### **4.3.2 Zelllyse**

Nach Entfernen des Zellkulturüberstandes und Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 Minuten mit eiskaltem Lysis Buffer/Wash Buffer inkubiert. Das Lysat wurde in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei ca. 13000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um das kaputte Zellmaterial abzutrennen. Für die weitere Analyse wurde der Überstand verwendet.

### **4.3.3 SDS-PAGE**

Mit Hilfe dieser Elektrophoresemethode lassen sich Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld auftrennen. [156]

Vor der Auftrennung muss die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört werden. Hierfür wurde Zelllysate mit Laemmli-Puffer vermischt und 5 Minuten lang bei 100 °C im Heizblock erhitzt. Danach wurden die Proben für 3 Minuten bei 14000 x g für zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben, die Positiv-, die Negativkontrolle, sowie ein Marker auf eine Gelmatrix aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Die Proteinauftrennung erfolgte in SDS-haltigem Puffer bei 250 V und 30 mA pro Gel.

Durch die Bindung von SDS an Proteine sind diese negativ geladen und wandern Richtung Anode. Die Polyacrylamid-haltige Gelmatrix besitzt dabei eine Siebfunktion.

Längere Proteinketten, also Proteine mit einer höheren Molekülmasse, gelangen schneller durch die Maschen des Gels und wandern damit weiter, als kürzere. So sind die Proteine am Ende entsprechend ihrer Größe in Proteinbanden aufgeteilt. [156]

#### **4.3.4 semi-dry Western Blot**

Der Western Blot erlaubt in einem elektrischen Feld den Transfer der Proteinbanden des Elektrophoresegels auf eine Membran.

Zwischen zwei Elektroden wurde ein Stapel aus in Towbin Buffer getränkten Filterpapieren, dem in Towbin Buffer getränkten Elektrophoresegel, einer in Methanol getränkten PVDF-Membran und einer zweiten Lage getränkter Filterpapiere eingebracht. Der Transfer fand bei 25 V und 150 mA pro Mini-Gel für 1 Stunde statt. Sinn des Tränkens ist es, konduktive Verhältnisse herzustellen. Während ihrer Wanderung aus dem Gel in Richtung Anode bleiben die Proteine in der Membran hängen, wo sie für weitere Detektionsmaßnahmen zur Verfügung stehen. Das Auftrennungsmuster bleibt während der Wanderung erhalten.

Ein effizientes Blotting wurde durch den Transfer des PeqGold prestained protein marker IV nachgewiesen.

Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit einem Blockierungspuffer für 60 Minuten geblockt.

#### **4.3.5 Immunodetektion**

Die Detektion der auf die Membran transferierten Proteine erfolgte mittels des WesternDot™ 625 Western Blot Kits.

Um das Protein IFIT3 zu detektieren, erfolgte zunächst eine einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-humanes-IFIT3-Mausantikörper). Überschüssige Antikörper wurden durch anschließendes intensives Waschen entfernt. Daran schloss sich eine weitere einstündige Inkubation mit einem biotinylierten zweiten Antikörper (Anti-Maus-Ziegenantikörper) an, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Nach

einem weiteren intensiven Waschgang erfolgte die Inkubation mit Qdot® 625 Streptavidin für eine Stunde, das anschließend an Biotin gekoppelt ist. Zuletzt erfolgt wiederum ein Waschschrift.

Qdot® 625 erlaubt die Visualisierung unter UV-Licht. Die IFIT3 Bande ließ sich durch Vergleich mit dem Marker und den Positivkontrollen bestätigen.

## **4.4 FACS (Flourescence-activated cell sorting)**

Mit Hilfe der FACS Analyse wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt und die verschiedenen Zelllinien und Behandlungen miteinander verglichen.

### **4.4.1 Zellzyklusanalyse**

COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen, COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen und L3.6pl/CMV-IFIT3-Zellen wurden zunächst in einer 6-well Platte kultiviert.

Bei einer Konfluenz von 60 % wurden die Zellen für mindestens 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur in Nicoletti-Puffer inkubiert. Dieser färbt DNA im Zellkern an. Nach Zentrifugation bei 1300 x g für 4 Minuten wurde der Überstand verworfen. Daran schlossen sich 2 Waschschriffe mit PBS und die Resuspendierung der Zellen in PBS an. Gefärbte DNA wurde anhand der Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil apoptotischer (sub-diploid), G0/G1-Phase- (diploid), S-Phase- (more than diploid) und M-Phase- (tetraploid) Zellen wurde mit der WinDMI 2.8 Software berechnet.

### **4.4.2 Chemotherapieresistenz**

COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen und COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 % für 2 Tage mit ansteigenden Konzentrationen der Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-FU und Irinotecan behandelt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe der FACS-Analyse (s. 4.4.1) bestimmt.

## 4.5 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die Analyse der Konzentration von VEGF, sowie den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand wurde jeweils ein entsprechender ELISA durchgeführt.

### 4.5.1 IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und TNF- $\alpha$

#### 4.5.1.1 *Behandlung der Zellen*

Um die Expression von Zytokinen in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst im Verhältnis 1:4 auf vier neue Flaschen verteilt. So stand für die folgende Behandlung immer ein Viererpaar der gleichen Zellpassage zur Verfügung. Die gesplitteten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % in Nährmedium kultiviert. Daran schloss sich eine 48-stündige Behandlung an. Hierfür wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen und dann in Starvation-Medium weiter inkubiert.

Die Expression der Zytokine wurde jeweils ohne und nach Behandlung mit 0,2 IU/ml IFN- $\alpha$ 2a bestimmt. Die Expression von Sox9shRNA in L3.6pl-6TR-SOX9shRNA-Zellen erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu$ g/ml Tetrazyklin. L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen dienten als Kontrolle, um auszuschließen, dass allein eine Expression von shRNA zu Unterschieden in der Zytokinexpression führt.

Nach der Behandlung wurde der Zellkulturüberstand in ein Falconröhrchen überführt und bei 450 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die Zellzahlbestimmung wurden nur vitale Zellen gezählt (s. 4.1.6).

#### 4.5.1.2 *ELISA*

Zur quantitativen Untersuchung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand der verschiedenen Zelllinien wurden die jeweiligen Human Platinum ELISA-Kits von BenderMedsystems entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Das Prinzip dieses Sandwich-ELISAs beruht auf dem Proteinnachweis mittels Antigen-Antikörper-Reaktion. Die ELISA-Platte ist mit einem Antikörper beschichtet, an den

das jeweilige Zytokin bindet. An das Antikörper-gebundene Zytokin bindet ein zweiter biotinylierter Antikörper. Nach Entfernung nichtgebundener Substanzen bindet Streptavidin-HRP an den biotinylierten Antikörper. Nach Entfernung des nichtgebundenen Streptavidin-HRPs wird eine Substratlösung hinzugefügt. Dieses reagiert mit Streptavidin und es kommt zu einer Farbreaktion, die mittels Säure gestoppt wird. Anhand der Intensität der Farbreaktion kann dann die Konzentration mit einem ELISA reader bestimmt werden.

Nach einem ersten Waschschrift wurden der Assay Buffer, die Zellkulturüberstände (jeweils als Duplikat) und der biotinylierte Antikörper auf die ELISA-Platte pipettiert und für zwei Stunden unter kontinuierlichem Hin- und Herschwenken inkubiert. Daran schloss sich ein Waschschrift an, nach dem eine Inkubation mit Streptavidin-HRP für eine Stunde erfolgte. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Substratlösung hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert, bevor die Stopplösung zugefügt wurde.

Die photometrische Auswertung der ELISA-Platte erfolgte mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Anhand der Verdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt werden und die Konzentration der Zytokine/Mio. Zellen bestimmt werden konnte.

## **4.5.2 VEGF**

Es wurde die VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen und L3.6pl/CMV-null-Zellen, sowie von COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen und L3.6pl/CMV-IFIT3-Zellen miteinander verglichen. Der Zellkulturüberstand wurde analog zu 4.5.1 gesammelt und analysiert.

## 4.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden, soweit nicht explizit anders erwähnt, als Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) angegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Zellkulturexperimente erfolgte mittels des Student-t-Tests. Die Analyse der Chemosensitivitätsexperimente erfolgte mittels one-way ANOVA mit dem Tukey's HSD Post-hoc Test für multiple Vergleiche. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  angesehen.

# 5 ERGEBNISSE<sup>1</sup>

## 5.1 IFIT3 wird in L3.6pl Zellen im Vergleich zu COLO357FG Zellen überexprimiert

Grundlage dieser Arbeit ist ein Tumormodell, das zur Untersuchung der Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom entwickelt worden war: durch *in vivo* Selektion der wenig aggressiven humanen Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG gewannen Bruns et al. die hochmetastatische und schnell wachsende Zelllinie L3.6pl. [154]

Mit dem Ziel, Ursachen für die aggressive Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms zu identifizieren, wurden beide Zelllinien in unserem Labor bereits früher genomisch

---

<sup>1</sup> Die Versuche zu Kapitel 5.4 „IFIT3 besitzt einen Einfluss auf die Ausbildung eines inflammatorischen Tumormilieus beim Pankreaskarzinom“ (Seite 63-68) wurden selbstständig durchgeführt und ausgewertet.

Sie sind Teil eines größeren Projektes meiner Arbeitsgruppe. Um sie in einen adäquaten Kontext setzen zu können, wurden mit den Kapiteln 5.1. bis 5.3. (Seite 52-62) weitere unmittelbar relevante Daten mit in diese Arbeit aufgenommen: diese Versuche wurden von meiner Arbeitsgruppe, u.a. von meinem Betreuer Dr. rer. nat. Peter Camaj, durchgeführt und ausgewertet und mir zur Diskussion für die vorliegende Arbeit überlassen (vgl. hierzu

den Beitrag zum „Chirurgische[n] Forum und DGAV Forum 2010 für experimentelle und klinische Forschung [des] 127. Kongress[es] der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin“:

157. Camaj P, Ischenko I, Seeliger H, Renner A, Krebs S, Arnold GJ, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ, *Sox9-associated overexpression of IFIT3 leads to pancreatic cancer progression by activation of »pseudoinflammatory« pathways*. In: Grading R, Menger MD, Meyer HJ, Hrsg. *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010 für experimentelle und chirurgische Forschung*. Forumband 39. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010: 59-60.

und die Publikation der vorliegenden Ergebnisse in:

158. Niess H, Camaj P, Mair R, Renner A, Zhao Y, Jackel C, Nelson PJ, Jauch KW, Bruns CJ. *Overexpression of IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) in pancreatic cancer: cellular "pseudoinflammation" contributing to an aggressive phenotype*. *Oncotarget*. 2015; **6**(5): 3306-18.).

Die kritische Diskussion aller Ergebnisse in Kapitel 6 erfolgte wiederum eigenständig.

mittels Affymetrix-Genchipsanalysen verglichen. So war bekannt, dass verschiedene Gene differentiell exprimiert werden. Unter diesen Genen befand sich auch IFIT3, dessen RNA bei L3.6pl-Zellen im Vergleich zu COLO357FG-Zellen etwa 3-fach überexprimiert war. [159]

Um die Überexpression von IFIT3 in L3.6pl-Zellen zu validieren, wurden nun eine semi-quantitative RT-PCR, sowie eine Western-Blot Analyse durchgeführt.

Hierbei bestätigte sich, dass IFIT3 in den aggressiveren L3.6pl-Zellen sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene überexprimiert wird (vgl. Abb. 1).

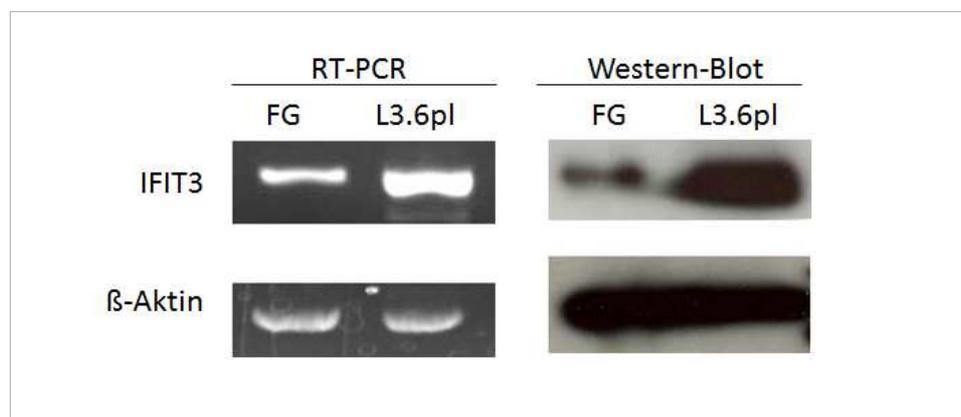


Abb. 1: IFIT3 wird in L3.6pl-Zellen auf mRNA- (semi-quantitative RT-PCR) und auf Proteinebene (Western Blot) überexprimiert.  $\beta$ -Aktin: Housekeeping Gen, FG: COLO357FG-Zelllinie

## 5.2 Die biologische Bedeutung von IFIT3

Um zu überprüfen, welche biologische Bedeutung IFIT3 beim humanen Pankreaskarzinom besitzt, wurden verschiedene *in vitro* Experimente durchgeführt. Die Auswirkung einer IFIT3-Überexpression auf die malignitätskennzeichnenden Faktoren Produktion proangiogenetischer Faktoren, Apoptoserate und Chemotherapieresistenz wurden hierfür untersucht.

Für alle Experimente wurden die Leervektorzellen COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen, sowie die IFIT3-überexprimierenden COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen miteinander verglichen.

### 5.2.1 IFIT3 führt zu einer erhöhten Apoptoserate

Der Einfluss von IFIT3 auf die Apoptoserate und den Zellzyklus wurde anhand von FACS-Analysen der verschiedenen Zelllinien untersucht.

Unter Starvation-Bedingungen waren 49,2 ( $\pm$  4,4) % der L3.6pl/CMV-null-Zellen apoptotisch. Dies ist deutlich niedriger als bei den weniger aggressiven COLO357FG/CMV-null-Zellen. Hier lag der Anteil apoptotischer Zellen bei 78,8 ( $\pm$  3,6) %. Eine Überexpression von IFIT3 in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen führte zu einem drastischen Rückgang der apoptotischen Zellfraktion auf 30,3 ( $\pm$  0,7) %,  $p < 0,01$ . Eine IFIT3-Überexpression in L3.6pl-Zellen hingegen bewirkte nur noch einen geringen Rückgang der Apoptoserate (34,1 ( $\pm$  3,0) %,  $p < 0,01$  gegenüber L3.6pl/CMV-null-Zellen), (vgl. Abb. 2).

Mit dem Rückgang der Apoptoserate kam es zu einer Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase, sowie in geringerem Ausmaß auch der mitotischen Zellen. Gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen, bei denen der Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase bei 7,0 ( $\pm$  5,6) % lag, erhöhte die IFIT3-Überexpression in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen diesen Anteil auf 48,1 ( $\pm$  1,6) %,  $p < 0,01$ . Bei L3.6pl/CMV-null-Zellen lag der Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase bei 31,4 ( $\pm$  1,3) % ( $p < 0,01$  gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen) und ließ sich durch IFIT3-Überexpression nicht signifikant erhöhen (33,2 ( $\pm$  2,7) %,  $p > 0,05$  gegenüber L3.6pl/CMV-null-Zellen), (vgl. Abb. 2).

Der Anteil an mitotischen Zellen erhöhte sich durch IFIT3-Überexpression von 0,4 ( $\pm$  0,2) % in COLO357FG/CMV-null-Zellen auf 13,3 ( $\pm$  0,6) % in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen ( $p < 0,001$ ). Ähnlich hoch ist dieser Anteil bei L3.6pl/CMV-null-Zellen (13,0 ( $\pm$  1,0) %,  $p < 0,01$  gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen). Hier ließ sich der Anteil mitotischer Zellen durch IFIT3-Überexpression noch erhöhen (23,7 ( $\pm$  2,5) %,  $p < 0,01$  gegenüber L3.6pl/CMV-null-Zellen), (vgl. Abb. 2).

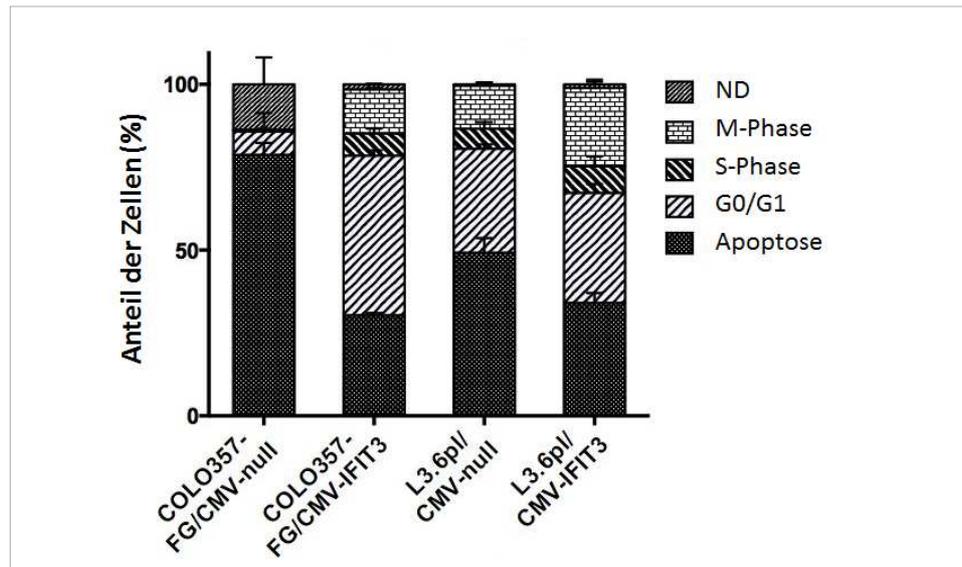


Abb. 2: Zellzyklusanalyse bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien

### 5.2.2 IFIT3 führt zu einer erhöhten VEGF-Produktion

Um den proangiogenetischen Effekt von IFIT3 zu untersuchen, wurde VEGF als Surrogatparameter verwendet. VEGF ist ein angiogener Faktor, der die Entstehung von Blutgefäßen fördert. [160] Die VEGF-Produktion der verschiedenen Zelllinien wurde mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass es durch eine IFIT3-Überexpression in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen zu einem deutlichen Anstieg der VEGF-Sekretion auf das 5,6-fache gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen kommt ( $p < 0,01$ ). Von L3.6pl/CMV-null-Zellen wurde VEGF in etwa gleicher Menge wie bei IFIT3-Überproduktion in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen sezerniert. Die Transfektion von IFIT3 in L3.6pl-Zellen (L3.6pl/CMV-IFIT3) führte zu keinem weiteren Anstieg der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand (vgl. Abb. 3).

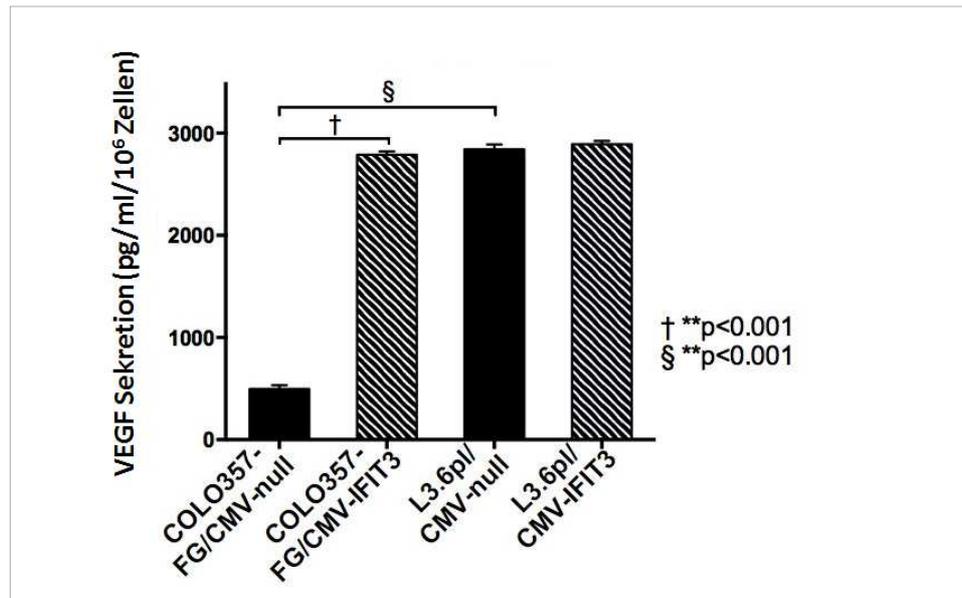


Abb. 3: VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand der verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien

### 5.2.3 IFIT3 führt zu einer verminderten Chemosensitivität

Die Resistenz gegenüber therapeutischen Substanzen ist ein Merkmal maligner Tumore. Wie in der Einleitung dargestellt werden zur systemischen Therapie des Pankreaskarzinoms unter anderem Gemcitabin, 5-FU und Irinotecan eingesetzt. Es wurde deshalb untersucht, ob IFIT3 einen Einfluss auf die Chemosensitivität gegenüber diesen drei Chemotherapeutika besitzt. Die verschiedenen Zelllinien wurden jeweils mit ansteigenden Konzentrationen der Chemotherapeutika behandelt und nach zwei Tagen auf den Anteil apoptotischer Zellen hin untersucht.

Es zeigte sich für alle drei verwendeten Chemotherapeutika, dass COLO357FG/CMV-null-Zellen am sensitivsten auf die Behandlung mit steigenden Chemotherapeutikakonzentrationen reagieren und dass die Transfektion von IFIT3 die Chemosensitivität verringert.

Steigende 5-FU Konzentrationen führten rasch zu einem Anstieg der Rate an apoptotischen COLO357FG/CMV-null-Zellen. Die Überexpression von IFIT3 in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen führte gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen zu einem verringerten Anstieg der Rate an apoptotischen Zellen ( $p < 0,01$ ). COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen waren etwa gleich sensitiv wie L3.6pl/CMV-null-Zellen ( $p < 0,01$  gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen), (vgl. Abb. 4).

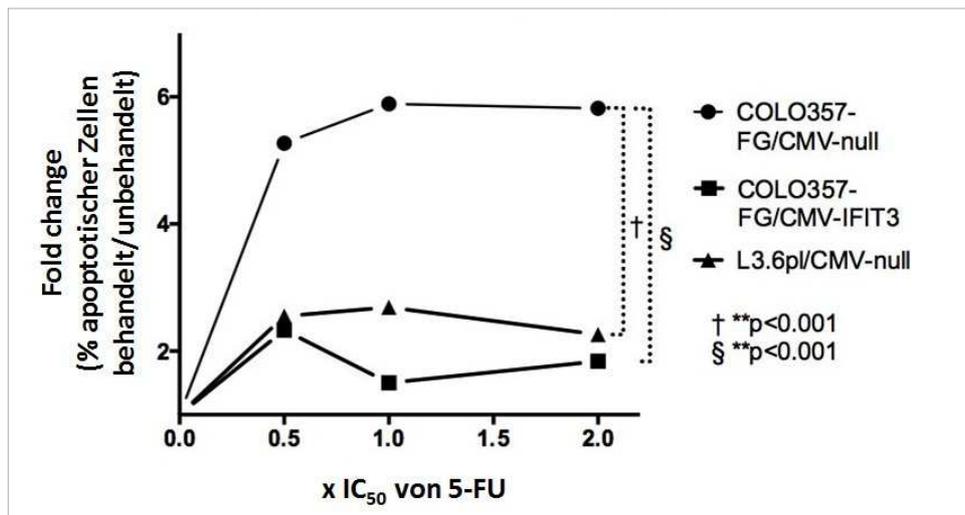


Abb. 4: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit 5-FU

Auch bei Behandlung mit Gemcitabin führten steigende Konzentrationen zu einem raschen Anstieg der Rate apoptotischer Zellen in der COLO357FG/CMV-null-Zelllinie. Die IFIT3-überexprimierende Zelllinie COLO357FG/CMV-IFIT3 war deutlich weniger sensitiv auf Gemcitabin als COLO357FG/CMV-null-Zellen ( $p < 0,05$ ). Auch bei L3.6pl/CMV-null-Zellen ließ sich ein Trend zu einer geringeren Sensitivität erkennen, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant (vgl. Abb. 5).

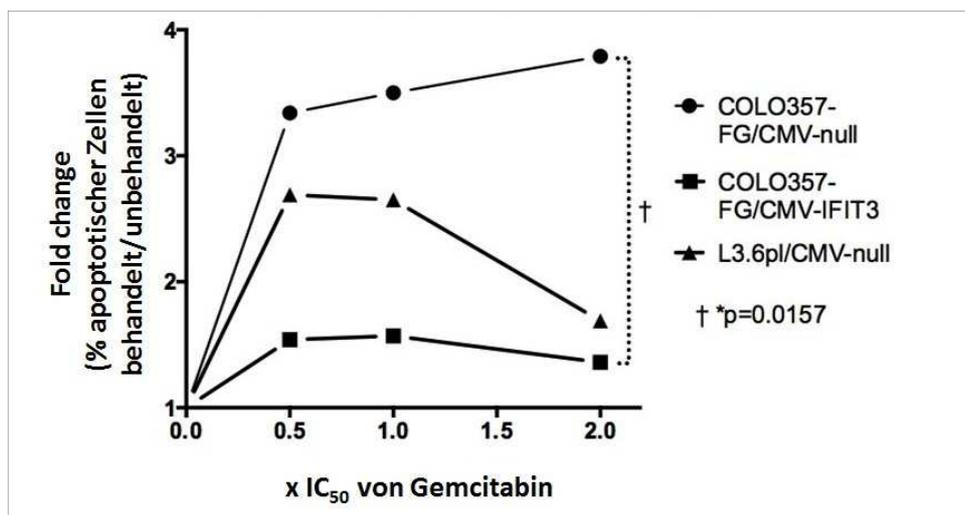


Abb. 5: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit Gemcitabin

Ein ähnliches Bild wie für 5-FU und Gemcitabin ergab sich auch für die Behandlung der Zelllinien mit Irinotecan. Bei steigenden Konzentrationen kam es ebenfalls rasch zu einem Anstieg der Rate apoptotischer COLO357FG/CMV-null-Zellen. Die Transfektion von IFIT3 verringerte die Sensitivität deutlich ( $p < 0,05$ ). Auch L3.6pl/CMV-null-Zellen waren weniger sensitiv gegenüber Irinotecan als COLO357FG/CMV-null-Zellen ( $p < 0,05$ ). Ihre Empfindlichkeit ähnelte der von IFIT3-überexprimierenden COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen (vgl. Abb. 6).

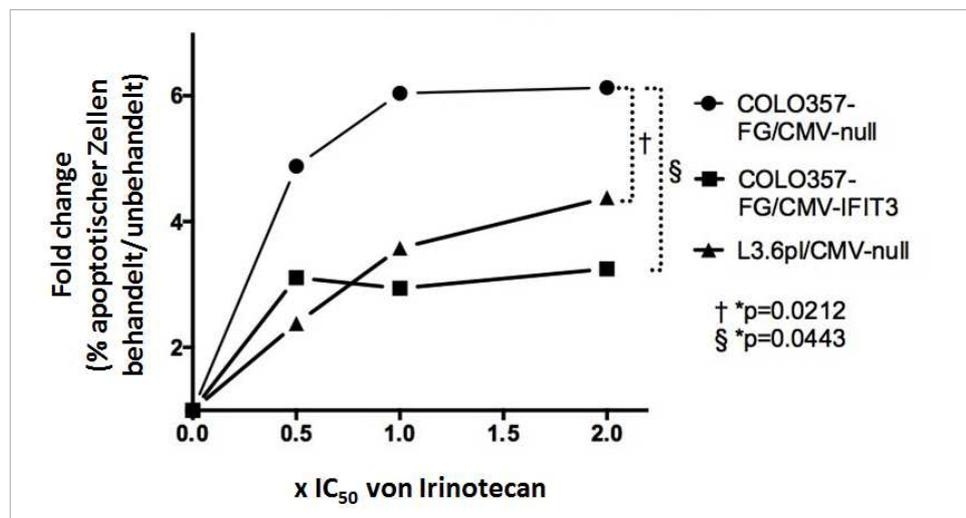


Abb. 6: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit Irinotecan

## 5.3 Regulationsmechanismen von IFIT3

Neben der Frage, welche biologische Bedeutung IFIT3 beim Pankreaskarzinom besitzt, wurde auch untersucht, wie IFIT3 reguliert wird.

### 5.3.1 IFIT3 ist durch IFN- $\alpha$ induzierbar

Aus Studien anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass IFIT3 in verschiedenen humanen und nicht humanen Zellen durch IFN- $\alpha$  induzierbar ist. [47, 48] Es wurde deshalb in einem weiteren Schritt untersucht, ob dies auch auf die Pankreaskarzinomzelllinien COLO357FG und L3.6pl zutrifft.

In unbehandelten Zellen wird IFIT3-mRNA auf niedrigem Niveau exprimiert. Eine Stimulation mit IFN- $\alpha$  führt zu einem Anstieg der IFIT3-Expression auf das 2,23 ( $\pm 0,5$ )-fache in COLO357FG-Zellen ( $p < 0,05$ ) und auf das 4,1 ( $\pm 0,5$ )-fache in L3.6pl-Zellen ( $p < 0,01$ ) (vgl. Abb. 7).

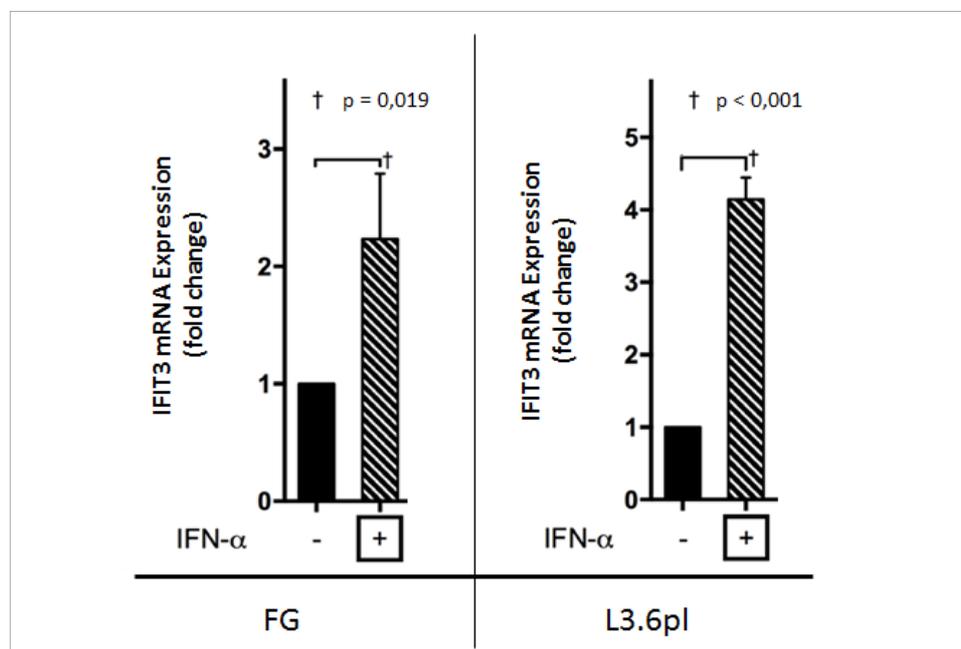


Abb. 7: IFN-induzierte IFIT3-mRNA-Expression in COLO357FG- und L3.6pl-Zellen (vgl. 5.3.2)

### **5.3.2 Die Expression von IFIT3 kann durch das Protein STAT1 und den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermittelt werden**

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Protein STAT1 (z.B. im Rahmen des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges) und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an der Signaltransduktion von IFN- $\alpha$  beteiligt sein können. In verschiedenen Publikationen wurde ein regulatorischer Einfluss von STAT1 und NF- $\kappa$ B auch für die Induktion von IFIT3 nachgewiesen. [55, 57] Es wurde deshalb nun untersucht, ob IFIT3 auch in humanen Pankreaskarzinomzellen von diesen Proteinen reguliert wird.

Wie oben beschrieben, führte IFN- $\alpha$  zu einer Induktion von IFIT3-mRNA in COLO357FG-Zellen und L3.6pl-Zellen. Diese Induktion der IFIT3-Expression ließ sich durch Inhibition von STAT1 mittels S14-95 senken. Nach Zugabe von S14-95 führte IFN- $\alpha$  in COLO357FG-Zellen nur noch zu einer 1,5 ( $\pm$  0,3)-fachen Erhöhung gegenüber der Basisexpression ( $p > 0,5$ ) und zu einer 3,0 ( $\pm$  0,4)-fachen Erhöhung in L3.6pl-Zellen ( $p < 0,05$ ). Auch die Basisexpression von IFIT3 wurde durch Inhibition von STAT1 gesenkt. In COLO357FG-Zellen wurde IFIT3 dann nur noch 0,4 ( $\pm$  0,1)-fach exprimiert ( $p < 0,01$ ), in L3.6pl-Zellen nur noch 0,5 ( $\pm$  0,1)-fach ( $p < 0,01$ ). Nach Zugabe von IFN- $\alpha$  war die IFIT3-Expression, wie eben dargelegt, jedoch trotz STAT1-Inhibition höher als die Basisexpression (vgl. Abb. 8 und Abb. 9).

Die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch den Inhibitor BAY 11-7082 führte in vitro ebenfalls zu einem Rückgang der IFIT3-mRNA-Expression: bei COLO357FG-Zellen auf das 0,2 ( $\pm$  0,1)-fache ( $p < 0,01$ ), bei L3.6pl-Zellen auf das 0,5 ( $\pm$  0,1)-fache ( $p < 0,01$ ) der Basisexpression. Auch die Induktion von IFIT3 durch IFN- $\alpha$  wurde durch die Inhibition von NF- $\kappa$ B beeinflusst. Die IFIT3-mRNA-Menge unterschied sich dann nicht mehr signifikant von der Basisexpression, sank jedoch auch nicht auf das Niveau von NF- $\kappa$ B-inhibierten unstimulierten Zellen. Dies galt für COLO357FG- und L3.6pl-Zellen gleichermaßen (vgl. Abb. 8 und Abb. 9).

Zu einem synergistischen Effekt kam es bei gleichzeitiger Inhibition von STAT1 und NF- $\kappa$ B. Die IFIT3-Transkription sank gegenüber einer alleinigen STAT1- bzw. NF- $\kappa$ B-Inhibition weiter ab: bei COLO357FG-Zellen auf das 0,1 ( $\pm$  0,0)-fache der Basisexpression ( $p < 0,01$ ) und bei L3.6pl-Zellen auf das 0,35 ( $\pm$  0,1)-fache der Basisexpression ( $p < 0,01$ ).

Auch nach IFN- $\alpha$ -Behandlung wurde IFIT3 dann deutlich weniger als die Basisexpression exprimiert und unterschied sich dann nicht mehr signifikant gegenüber der Expression ohne IFN- $\alpha$  Behandlung (vgl. Abb. 8 und Abb. 9).

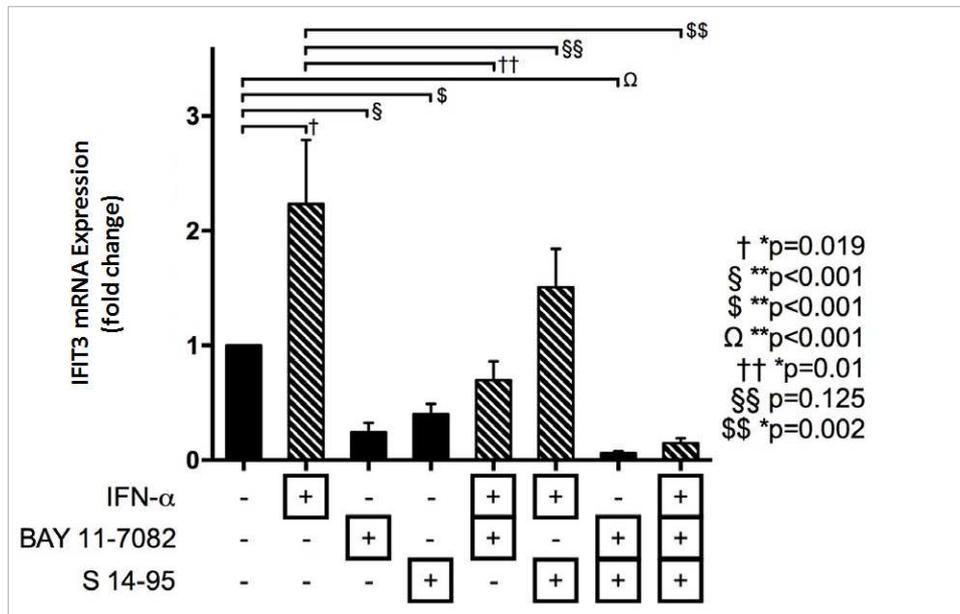


Abb. 8: Regulationsmechanismen der IFIT3-Transkription in COLO357FG-Zellen: Veränderung der IFIT3-mRNA-Expression bei verschiedenen Behandlungen der Zellen

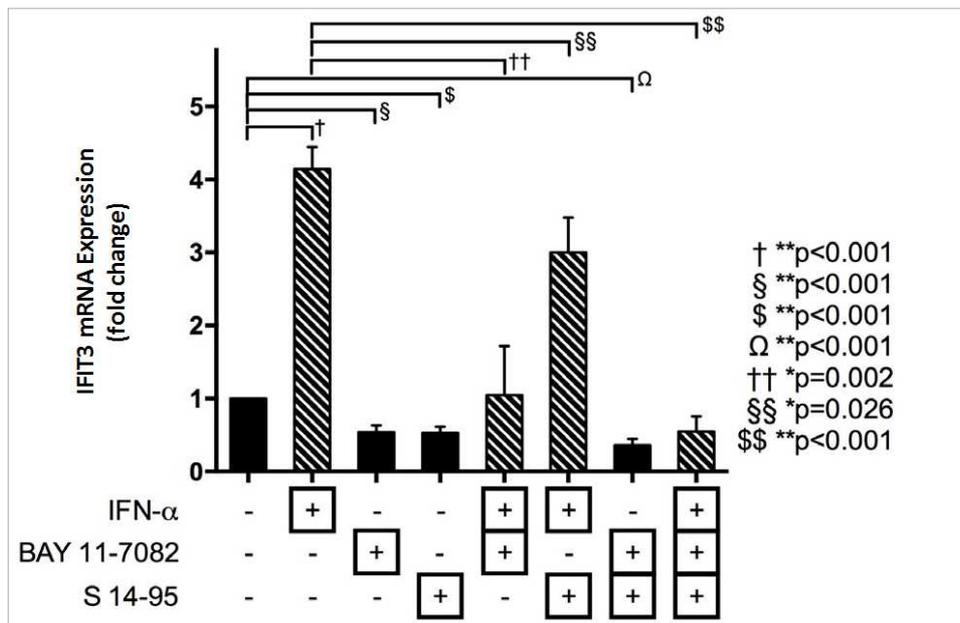


Abb. 9: Regulationsmechanismen der IFIT3-Transkription in L3.6pl-Zellen: Veränderung der IFIT3-mRNA-Expression bei verschiedenen Behandlungen der Zellen

### 5.3.3 Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor von IFIT3 und ist an dessen Regulation beteiligt

Als möglicher Transkriptionsfaktor von IFIT3 war durch eine Promotoranalyse Sox9 identifiziert worden. [158] Durch Inhibition von Sox9 konnte nun dessen Einfluss auf die IFIT3-Expression nachgewiesen werden. Hierfür wurden L3.6pl-6TR-SOX9shRNA-Zellen verwendet. Durch die Zugabe von Tetrazyklin kann in diesen Zellen Sox9shRNA induziert werden. In der Folge kommt es durch RNA-Interferenz zu einer funktionellen Inhibition des exprimierten Sox9. Diese Inhibition von Sox9 wurde in [161] gezeigt.

Eine Inhibition von Sox9 führte in L3.6pl 6TR SOX9shRNA-Zellen zu einem massiven Rückgang der IFIT3-Expression um das 6350 ( $\pm$  443)-fache ( $p < 0,001$ ), (vgl. Abb. 10).

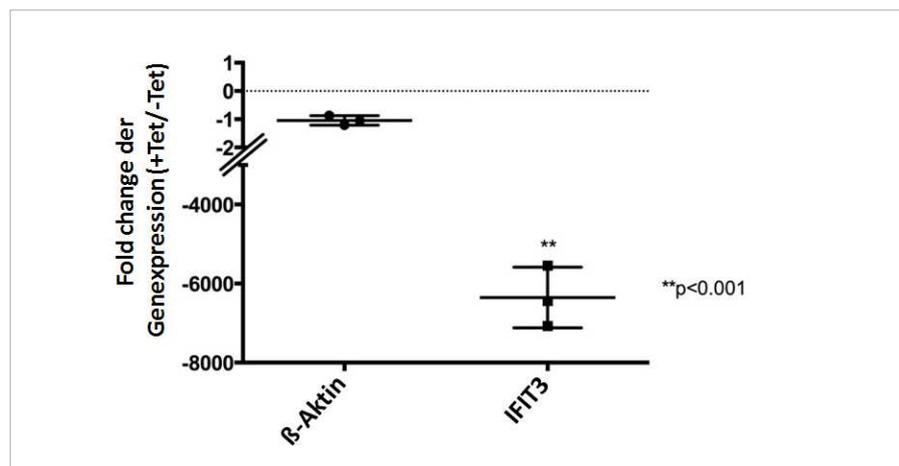


Abb. 10: ausgeprägter Rückgang der IFIT3-mRNA-Expression nach Inhibition des Transkriptionsfaktors Sox9 durch Sox9shRNA in L3.6pl-6TR-SOX9shRNA-Zellen.  $\beta$ -Aktin: Housekeeping Gen

## **5.4 IFIT3 besitzt einen Einfluss auf die Ausbildung eines inflammatorischen Tumormilieus beim Pankreaskarzinom**

Die beschriebenen Regulationsmechanismen und auch die bekannten Interaktionspartner von IFIT3 spielen eine Rolle im Rahmen inflammatorischer Signalwege. Es stellte sich deshalb schließlich die Frage, ob es eine Verbindung zwischen IFIT3 und der Entwicklung eines inflammatorischen Mikromilieus beim Pankreaskarzinom gibt. In der Einleitung wurde bereits dargestellt, dass Tumorzellen in der Lage sein können, Entzündungsmediatoren zu sezernieren. (vgl. 1.3) Deshalb wurde zur Klärung dieser Frage die Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen untersucht. Die Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  in den Zellkulturüberständen der verschiedenen Zelllinien wurden mittels ELISA analysiert.

### **5.4.1 IFIT3 führt zu einer erhöhten IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand, der IFIT3-Transkriptionsfaktor Sox9 ist daran beteiligt**

Sowohl bei der niedrig aggressiven Zelllinie COLO357FG/CMV-null, als auch bei der aggressiven Zelllinie L3.6pl/CMV-null ließ sich das proinflammatorische Zytokin IL-6 in den Zellkulturüberständen nachweisen. Dabei sezernieren L3.6pl/CMV-null-Zellen das 2,4 ( $\pm$  0,43)-fache an IL-6 gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen (nicht signifikant). Durch Transfektion von IFIT3 stieg die IL-6-Sekretion bei COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen signifikant um das 4,38 ( $\pm$  0,11)-fache ( $p < 0,05$ ) gegenüber COLO357FG/CMV-null-Zellen. Sie lag damit sogar noch höher, als die IL-6-Sekretion der L3.6pl/CMV-null-Zellen ( $p < 0,05$ ). Durch eine Behandlung mit IFN- $\alpha$  konnte in L3.6pl/CMV-null-Zellen die IL-6-Sekretion gesteigert werden ( $p < 0,05$ ) und erreichte etwa das Niveau, wie bei Expression von IFIT3 in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen. Zu keinem Anstieg der IL-6-Konzentration durch IFN- $\alpha$  kam es in COLO357FG-Zellen, sowie in IFIT3-transfizierten COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen (vgl. Abb. 11).

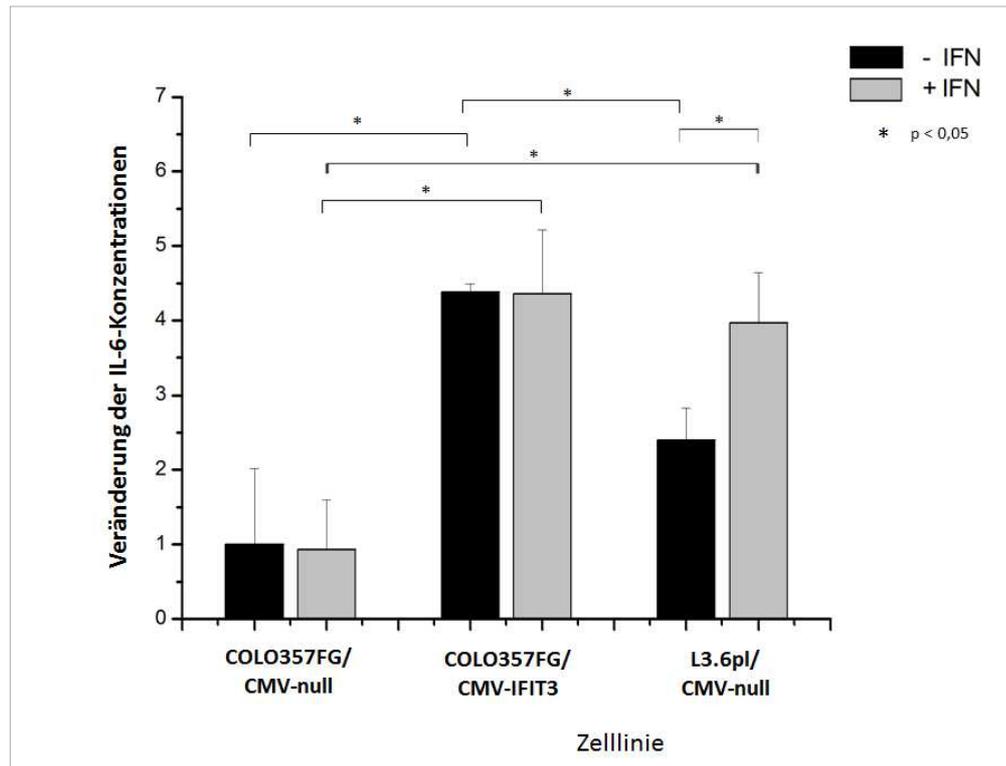


Abb. 11: Unterschiede der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null, COLO357FG/CMV-IFIT3- und L3.6pl/CMV-null-Zellen (jeweils ohne (-IFN) und mit IFN-Behandlung (+IFN)), dargestellt als Vielfaches der IL-6-Konzentration/Mio. Zellen im Zellkulturüberstand von unbehandelten COLO357FG/CMV-null-Zellen

In einem weiteren Schritt wurde die Bedeutung von Sox9 als Transkriptionsfaktor von IFIT3 für die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand untersucht.

Sox9shRNA kann in Sox9shRNA-transfizierten L3.6pl-6TR-SOX9shRNA-Zellen durch Zugabe von Tetrazyklin exprimiert werden und inhibiert Sox9 funktionell durch RNA-Interferenz. [161]

Wie oben beschrieben, ist Sox9 ein sehr starker Regulator der IFIT3-Expression, durch dessen Inhibition es zu einem massiven Rückgang der IFIT3-Expression kommt. Die gegenüber COLO357FG-Zellen erhöhte IFIT3-Expression in L3.6pl-Zellen kann somit durch Inhibition von Sox9 vermindert werden. (vgl. 5.3.3)

Die Expression von Sox9shRNA und damit indirekt eine verminderte IFIT3-Expression führte zu einem leichten Rückgang der IL-6-Sekretion (0,65 ( $\pm$  0,23)-fach, nicht signifikant). Bei Expression von Sox9shRNA ließ sich IL-6 nicht mehr durch IFN- $\alpha$  induzieren. Ohne Expression von Sox9shRNA führte eine IFN- $\alpha$ -Behandlung zu einem 1,9 ( $\pm$  0,33)-fachen Anstieg der IL-6-Sekretion ( $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 12).

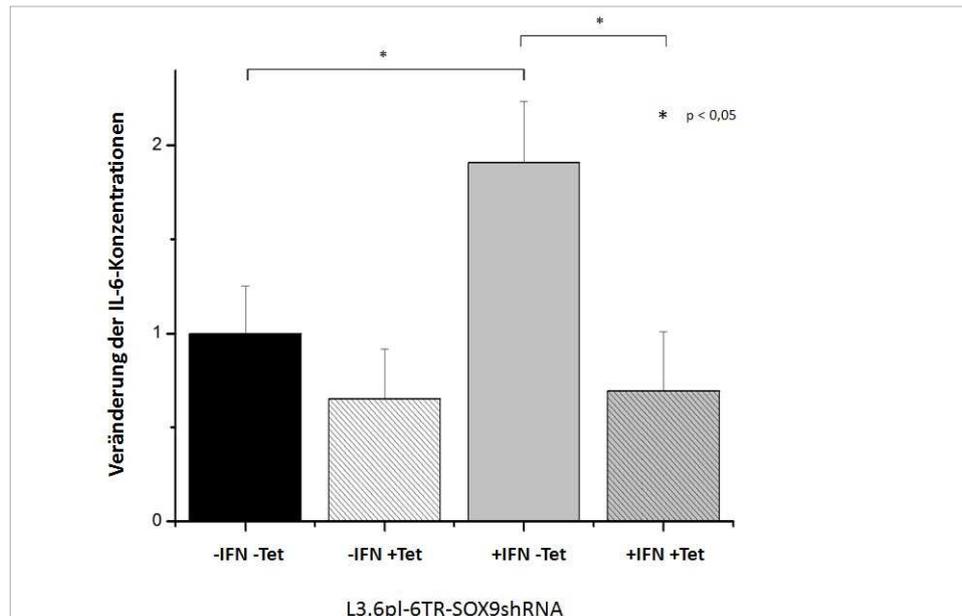


Abb. 12: IL-6 Produktion von L3.6pl-6TR-Sox9shRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung)

Um einen Einfluss sowohl von doppelsträngiger shRNA als entzündlichem Stimulus, als auch von Tetrazyklin auf die IL-6-Sekretion auszuschließen, wurde ein Kontrollexperiment mit LacZshRNA-transfizierten L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die IL-6-Sekretion nach Zugabe von Tetrazyklin und somit Expression von LacZshRNA weder in IFN- $\alpha$ -unbehandelten, noch in IFN- $\alpha$ -behandelten Zellen signifikant verändert (vgl. Abb. 13).

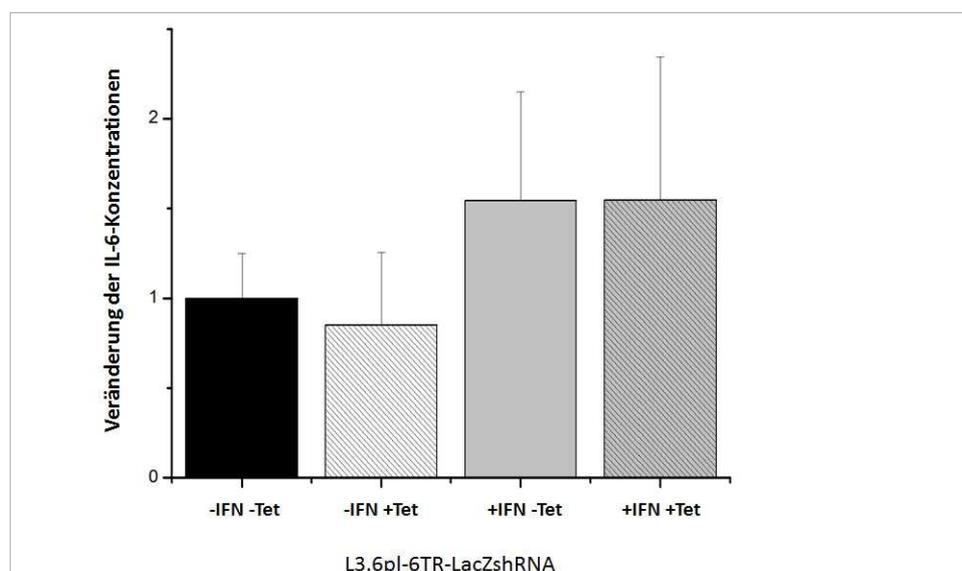


Abb. 13: IL-6 Produktion von L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung)

#### 5.4.2 IFIT3 führt zu einer statistisch nicht signifikant erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand

Auch das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  konnte bei den beiden Zelllinien COLO357FG/CMV-null und L3.6pl/CMV-null im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich ein Trend zu einer höheren TNF- $\alpha$ -Sekretion bei L3.6pl/CMV-null-Zellen und IFIT3-überexprimierenden COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 14).

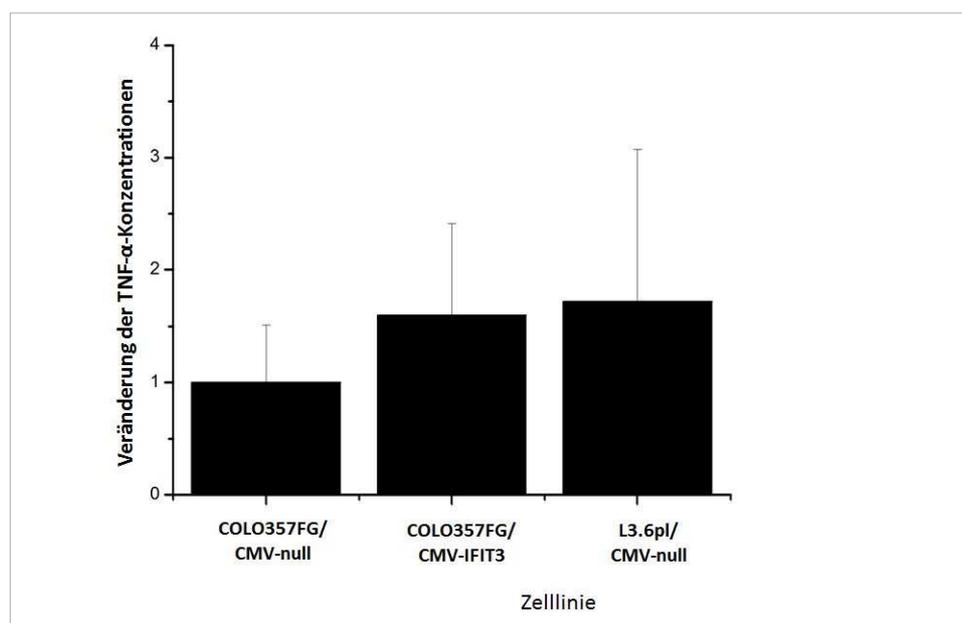


Abb. 14: Unterschiede der TNF- $\alpha$  Konzentration im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen, COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen und L3.6pl/CMV-null-Zellen, dargestellt als Vielfaches der TNF- $\alpha$ -Konzentration/Mio. Zellen im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen

Die Bedeutung von Sox9 als Transkriptionsfaktor von IFIT3 wurde auch für die TNF- $\alpha$ -Produktion untersucht.

Die Expression von Sox9shRNA und damit indirekt eine verminderte IFIT3-Expression führte in L3.6pl-6TR-SOX9shRNA-Zellen zu einem leichten Rückgang der basalen TNF- $\alpha$ -Sekretion auf das 0,85 ( $\pm$  0,25)-fache. Im Gegensatz zur IL-6-Sekretion war die TNF- $\alpha$ -Sekretion in L3.6pl-6TR-SOX9shRNA Zellen weiterhin induzierbar ( $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 15).

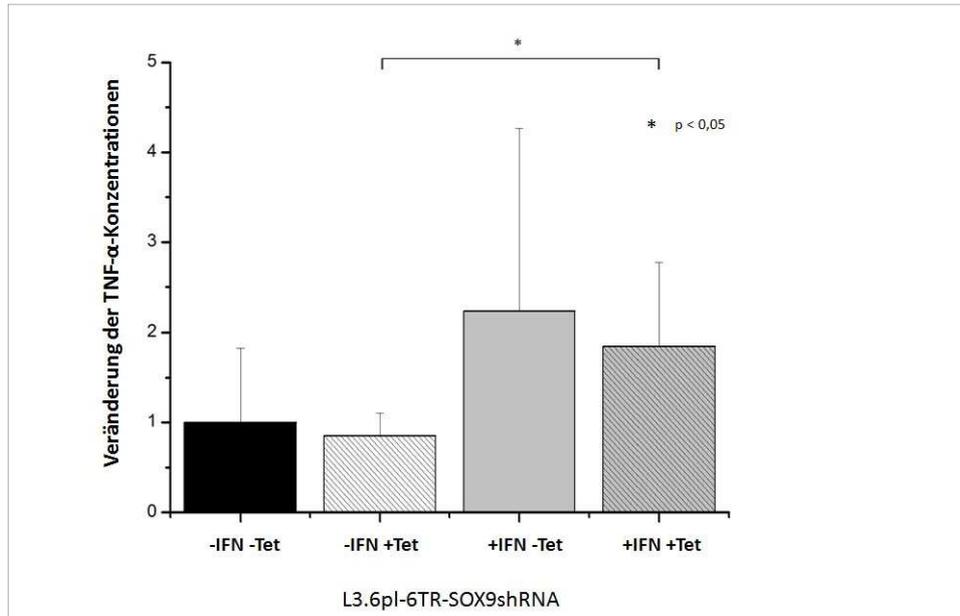


Abb. 15: TNF- $\alpha$  Produktion von L3.6pl-6TR-Sox9shRNA-Zellen, (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung)

Auch für TNF- $\alpha$  wurde ein Einfluss von Tetrazyklin bzw. shRNA auf die Expression ausgeschlossen. Nach Zugabe von Tetrazyklin und somit Expression von LacZshRNA kam es zu keiner signifikanten Änderung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand von L3.6pl-6TR-LacZshRNA Zellen (vgl. Abb. 16).

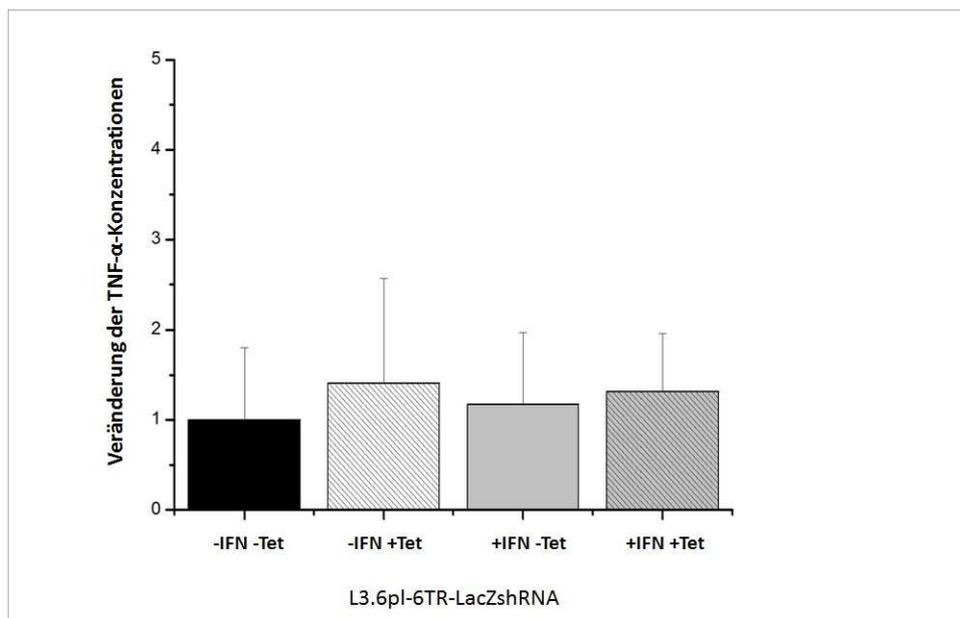


Abb. 16: TNF- $\alpha$  Produktion in L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung)

### **5.4.3 Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10 werden von COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen und COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen nicht produziert**

Weiterhin wurde die Konzentration der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10 im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen, L3.6pl/CMV-null-Zellen und COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen untersucht. Diese Zytokine waren bei den untersuchten Zellreihen jedoch nicht in nennenswerter Konzentration nachweisbar, auch nicht nach Stimulation mit IFN- $\alpha$ .

## 6 DISKUSSION

Das Pankreaskarzinom zählt zu den aggressivsten Tumoren des Menschen mit einer sehr schlechten Prognose. Eines der großen Probleme ist, dass die derzeit zur Verfügung stehenden Therapien nur zu einer geringen Verlängerung der Lebenszeit führen. Zielgerichtete Therapien stehen fast nicht zur Verfügung. (vgl. 1.1) Um diese zu entwickeln, ist es notwendig, genauere Informationen über die Ursachen der aggressiven Tumorbilologie des Pankreaskarzinoms zu gewinnen. Diese Arbeit versucht, hierzu einen Beitrag zu leisten, indem die Bedeutung des Proteins IFIT3 für Tumorigenese und Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom, sowie der zugrundeliegende Wirkmechanismus analysiert wurden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen diskutiert.

### 6.1 Erhöhte Expression von IFIT3 in L3.6pl Zellen im Vergleich zu FG Zellen

Man geht davon aus, dass Pankreaskarzinomzellen in einem mehrschrittigen Prozess durch verschiedene genetische Veränderungen ihr malignes Potential erhalten. [28]

Mit den beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien COLO357FG und L3.6pl steht ein Tumormodell zur Verfügung, mit dem Unterschiede in der Genexpression zwischen wenig aggressiven und aggressiven Tumorzellen, sowie der Einfluss der differentiellen Genexpression auf das maligne Potential eines Tumors untersucht werden können. Diese Arbeit fokussierte sich dabei auf das Protein IFIT3.

COLO357FG-Zellen sind die schnell wachsende (fast-growing) Variante der von Morgan et al. kultivierten Zelllinie Colo375. Diese stammt aus einem humanen Lymphknoten der mit neoplastischen Foci gut differenzierter Muzin-enthaltender Pankreasgänge durchsetzt war. Vezeridis et al. injizierten COLO357FG-Zellen in die Milz von Nacktmäusen und isolierten daraus die Zelllinie L3.3, die mehr Lebermetastasen produziert als die Ursprungszelllinie. Bruns et al. injizierten diese orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen, gewannen die Zellen der entstandenen Lebermetastasen, kultivierten sie

und injizierten sie anschließend wiederum orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen. Nach drei Selektionszyklen wurde die entstandene Zelllinie kultiviert und als L3.6pl (pancreas to liver) bezeichnet. Die selektionierten Zellen weisen ein erhöhtes metastatisches Potential auf. Einhergehend damit besitzen sie Eigenschaften, die mit einem aggressiveren Phänotyp korrelieren. Die Verdopplungszeit ist kürzer, die Zellmotilität höher, die E-Cadherin-Level sind niedriger und die Matrixmetalloproteasen werden verstärkt exprimiert, ebenso wie IL-8, VEGF und bFGF. [154]

Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem Ziel Ursachen für die aggressive Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms aufzudecken, war bereits bekannt, dass in L3.6pl Zellen verschiedene mit entzündlichem Geschehen assoziierte Gene differentiell exprimiert werden. Unter diesen Genen befindet sich IFIT3, für das mittels einer Affymetrix-Genchipanalyse eine etwa 3-fach höhere Expression in L3.6pl-Zellen als in COLO357FG-Zellen nachgewiesen wurde. [159] Diese Überexpression ließ sich nun sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene bestätigen.

IFIT3 zählt zur Familie der IFN-induzierbaren Gene und wurde ursprünglich in ATRA-behandelten NB4-Zellen nachgewiesen. Daneben ist es auch durch IFN- $\alpha$  induzierbar. [47, 48] In den bisher untersuchten Zellen vermittelt es die Immunabwehr bei viralen und bakteriellen Infektionen und besitzt einen antiproliferativen Einfluss. [59-61, 64] Zudem ist es mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. [66] Die Beteiligung an der Immunabwehr und an entzündlichen Geschehen ist also bereits gut belegt.

Ein möglicher Einfluss von IFIT3 auf die Tumorigenese war bis vor kurzem jedoch noch nicht bekannt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnten erstmals ein malignitätsfördernder Einfluss von IFIT3 beim humanen Pankreaskarzinom, sowie mögliche molekulare Mechanismen hierfür *in vitro* gezeigt werden.

Dass die Überexpression von IFIT3 tatsächlich auch *in vivo* zu einer Zunahme der Tumorigenität, Metastasierung und desmoplastischen Reaktion führt, wurde in weiteren Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt. [158]

## 6.2 Biologische Bedeutung von IFIT3

Bei malignen Tumoren kommt es zur unkontrollierten Proliferation entarteter Tumorzellen. Dies führt zunächst zu lokalem Tumorwachstum. Ab einer kritischen Größe von 1 mm Durchmesser werden neue tumorversorgende Gefäße benötigt, Neoangiogenese findet statt. Im weiteren Verlauf kann es zur lokalen Infiltration des umgebenden Gewebes, sowie zum Einbruch in Blut- und Lymphgefäße und zur Bildung von Metastasen kommen. [162, 163] Eine Eigenschaft maligner Tumore, insbesondere des Pankreaskarzinoms, ist außerdem die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen. [164]

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass IFIT3 an der Ausbildung dieser Aspekte eines malignen Tumors mitbeteiligt ist. Während in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass IFIT3 *in vivo* zu vermehrtem Tumorwachstum, Metastasierung und einer ausgeprägteren desmoplastischen Reaktion führt [158], zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit Mechanismen, die möglicherweise an der Ausbildung dieses malignen Phänotyps beteiligt sind.

### 6.2.1 Erhöhte Apoptoserate und Zellzyklusanalyse

Gewebewachstum wird von zwei Faktoren bestimmt: der Proliferationsrate und der Rate des Zelltodes. Eine Form des programmierten Zelltodes ist Apoptose, ein von der Zelle kontrollierter aktiver Prozess, der durch extrinsische und intrinsische Faktoren ausgelöst werden kann. [165, 166] Verminderter Zelltod ist ein wesentlicher Faktor der Tumorentwicklung. Zellen, die die Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli verloren haben, besitzen einen entscheidenden Überlebensvorteil. Tumorwachstum und Chemotherapieresistenz werden so begünstigt. [167-169]

Unter Starvationbedingungen als apoptotischem Faktor ist ein hoher Prozentsatz von mehr als 70 % der FG-Zellen apoptotisch. Bei IFIT3-Überexpression sinkt dieser Anteil deutlich ab. Dies weist auf eine Beteiligung von IFIT3 an der Unempfindlichkeit der aggressiveren L3.6pl-Zelllinie gegenüber apoptotischen Signalen hin. Eine Transfektion von IFIT3 in L3.6pl/CMV-IFIT3-Zellen bewirkt nur ein geringfügiges weiteres Absinken der Apoptoserate.

Die Mehrzahl der nichtapoptotischen Zellen befindet sich in den durchgeführten Untersuchungen in der G0/G1-Phase. Eine IFIT3-Überexpression führt in COLO357FG-Zellen zu einem Anstieg von Zellen in der G0/G1-Phase. Ein geringerer Teil von Zellen befindet sich in der Mitosephase. Bei IFIT3-Überexpression steigt auch der Anteil mitotischer Zellen, allerdings nur in moderatem Ausmaß. In allen Zelllinien befindet sich nur ein geringer Teil der Zellen in der S-Phase.

Insgesamt lassen die vorliegenden Untersuchungen darauf schließen, dass das Tumorstadium durch IFIT3 zu einem großen Teil aufgrund einer verminderten Apoptoserate und ergänzend auch aufgrund eines Anstiegs der Mitoserate begünstigt wird.

Durch welchen Mechanismus IFIT3 in den untersuchten Pankreaskarzinomzellen zu den beobachteten Ergebnissen führt, bleibt noch zu untersuchen, zumal IFIT3 in der Literatur zum Teil ein antiproliferativer Effekt zugeschrieben wird.

Untersuchungen von Xiao et al. zeigten, dass die antiproliferative Wirkung von IFIT3 in Leukämiezellen durch eine Hochregulation der Zyklinkinaseinhibitoren p21 und p27 und dem daraus folgenden Stopp des Zellzyklus am Übergang der G1- in die S-Phase zustande kommen kann. [64]

Eventuell trägt eine beim Pankreaskarzinom häufig durch Mutationen verloren gegangene Funktionsfähigkeit von Zyklinkinaseinhibitoren zur wachstumsstimulierenden Rolle von IFIT3 in den hier untersuchten Zellen bei. Doch auch in den vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit steigt der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase nach Überexpression von IFIT3 – ein weiterer Hinweis darauf, dass die verminderte Apoptoserate einen großen Anteil an der wachstumsfördernden Wirkung von IFIT3 besitzen muss.

Dass IFIT3 die Apoptoserate auch umgekehrt im Sinne einer reduzierten Apoptoserate beeinflussen kann, haben bereits Stawowczyk et al. nachgewiesen. Sie zeigten, dass IFIT3 durch Bindung an IFIT2 dessen proapoptotische Wirkung in HeLa Zellen inhibiert und so das Zellüberleben begünstigt. [65] Möglicherweise inhibiert IFIT3 auch in Pankreaskarzinomzellen proapoptotische Proteine.

## 6.2.2 Erhöhte Produktion angiogener Faktoren

Für wachsende Tumore ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ein limitierender Faktor. Eine Zunahme der Tumorgöße über einen Durchmesser von 1 mm hinaus ist deshalb ohne Neoangiogenese nicht möglich. Die Entstehung neuer Blutgefäße wird durch verschiedene Faktoren, wie z.B VEGF beeinflusst. [160, 162, 170, 171]

Bei einer Reihe von Tumoren wird VEGF überexprimiert. [160] VEGF kann, wie auch für das Pankreaskarzinom gezeigt, von Tumorzellen selbst sezerniert werden. [172] In Übereinstimmung hiermit und mit den Beobachtungen von Bruns et al. [154] konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass COLO357FG-Zellen und L3.6pl-Zellen VEGF produzieren können. Die aggressiveren L3.6pl-Zellen produzieren im Vergleich zu COLO357FG-Zellen mehr VEGF. Daran ist IFIT3 beteiligt. Durch dessen Überexpression in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen steigt die VEGF-Produktion auf mit L3.6pl-Zellen vergleichbare Werte. In L3.6pl Zellen kommt es nach IFIT3-Transfektion jedoch zu keinem weiteren Anstieg der VEGF-Produktion. Hier scheint das neoangiogenetische Potential von IFIT3 bereits durch dessen intrinsische Produktion angereizt.

Bruns et al. wiesen nach, dass von COLO357FG- und L3.6pl-Zellen produziertes VEGF biologisch aktiv ist. [154] VEGF trägt zur Bildung neuer Blutgefäße und Lymphgefäße bei. Außerdem erhöht es die Gefäßpermeabilität. So verbessert es die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff. Außerdem begünstigen die von VEGF-induzierten Effekte den Metastasierungsprozess. [171, 173] Es gibt Belege dafür, dass die Expression von VEGF beim Pankreaskarzinom mit einer vermehrten Lebermetastasierung bzw. mit einer schlechteren Prognose korreliert. [174] Die vermehrte VEGF-Produktion ist also ein weiterer möglicher Mechanismus, der den aggressiveren Phänotyp bei einer IFIT3-Überexpression erklären könnte.

### **6.2.3 Erniedrigte Chemosensitivität**

Ein Problem in der Therapie des Pankreaskarzinoms stellt das schlechte Ansprechen gegenüber chemotherapeutischen Substanzen dar. Weder das Standardchemotherapeutikum Gemcitabin, noch das toxischere 5-FU weisen zufriedenstellende Therapieergebnisse auf. [39] Das neuere, etwas wirksamere Therapieregime FOLFIRINOX kombiniert 5-FU mit zusätzlichen Substanzen, darunter Irinotecan. [40] Mögliche Ursache für ein ungenügendes Therapieansprechen sind intrinsische und akquirierte Chemotherapie-resistenzen. [175]

IFIT3 ist an der Resistenz der aggressiven L3.6pl-Zellen gegenüber den beim Pankreaskarzinom eingesetzten Chemotherapeutika beteiligt. Bei Überexpression von IFIT3 in COLO357FG-Zellen sinkt die Sensitivität gegenüber 5-FU drastisch ab und entspricht dann in etwa der von L3.6pl-Zellen. Ähnliches ergab sich für Gemcitabin und Irinotecan. Durch welchen genauen Mechanismus dies geschieht, bleibt zu klären.

## 6.3 Regulationsmechanismen

Anhand von Zellkulturexperimenten ließen sich Induktions- und Regulationsmechanismen von IFIT3 identifizieren. Es zeigte sich, dass IFIT3 in den untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien in engem Zusammenhang mit Akteuren entzündlicher Prozesse steht. Mit Sox9 wurde ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der für die konstitutive Überexpression von IFIT3 in den aggressiveren Zellen verantwortlich ist.

### 6.3.1 Induktion durch IFN- $\alpha$

IFN- $\alpha$  ist ein Zytokin mit antiviraler und antiproliferativer Wirkung aus der Gruppe der Typ-I-Interferone. Es ist an der Regulation des Immunsystems und von Entzündungen beteiligt und beeinflusst Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zelltod. Aufgrund seiner Eigenschaften hat es Eingang in die Behandlung einiger viraler und maligner Erkrankungen gefunden. [167, 176, 177]

Gene, die von IFN- $\alpha$  induziert werden, bezeichnet man als ISGs. Zu diesen zählt auch IFIT3. In verschiedenen humanen und murinen Zellen ist IFIT3 durch IFN- $\alpha$  induzierbar und trägt dort zu dessen antiproliferativer und antiviraler Wirkung bei. [47, 48, 64, 178, 179] Wie in dieser Arbeit dargestellt, ist IFIT3 auch in den beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien COLO357FG und L3.6pl durch IFN- $\alpha$  induzierbar. IFIT3 besitzt in diesen Zelllinien jedoch eine wachstums- und malignitätsfördernde Wirkung.

Die Signalübertragung von IFN- $\alpha$  kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Klassisch werden ISGs über den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg induziert. [53, 180] Daneben wurden auch andere Möglichkeiten beschrieben, wie z.B. die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. [181] Für die IFIT3-Induktion wurde neben einer Beteiligung von Proteinen wie STAT2, IRF-9 und IRF-1 z.B. auch eine Regulation der IFN- $\alpha$ -induzierten Expression durch das NF- $\kappa$ B Protein c-Rel beschrieben. [54, 55, 57] Proteine, die an der Induktion von IFIT3 durch IFN- $\alpha$ , sowie an der basalen Expression von IFIT3 in den untersuchten Zelllinien beteiligt sind, wurden in weiteren Schritten identifiziert.

### 6.3.2 Regulation durch STAT1 und NF- $\kappa$ B

In der Literatur gibt es einige Hinweise auf mögliche Mechanismen und Signaltransduktionswege, durch die IFIT3 induziert wird.

Ein Einfluss von STAT1 auf die Induktion von IFIT3 in den hier untersuchten Zellen war aus mehreren Gründen zu vermuten. Zunächst zählt IFIT3 zu den ISGs, welche klassischerweise durch den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg induziert werden. Dabei sind STAT-Proteine an der Bildung eines Transkriptionsfaktorkomplexes beteiligt, der im Zellkern an ISREs bindet und so die Expression von ISGs stimuliert. [48, 53] Zwei ISREs befinden sich auch am Promotor von IFIT3. [48, 54, 64]

Außerdem zeigten mehrere Autoren, dass das Protein STAT1 an der IFN- $\alpha$ -induzierten Expression von IFIT3, teilweise auch nur indirekt, beteiligt sein kann. [54-56, 64]

In den hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien COLO357FG und L3.6pl ließ sich nun ebenfalls eine Beteiligung von STAT1 an der IFIT3-Expression nachweisen. Die IFN- $\alpha$  induzierte Expression von IFIT3 wird durch Inhibition von STAT1 vermindert. Dennoch war eine Induktion von IFIT3 durch IFN- $\alpha$  noch möglich. Die basale Expression von IFIT3 sank durch STAT1 Inhibition ebenfalls, kam aber nicht vollständig zum Erliegen. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die IFIT3 Expression in den untersuchten Zelllinien weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Auch NF- $\kappa$ B spielt eine Rolle bei der Induktion von ISGs und ist beteiligt an der Regulation von Genen, die Immunität, Inflammation, Zellwachstum und Zellüberleben beeinflussen. [182] Für IFIT3 zeigten Wei et al., dass das NF- $\kappa$ B Protein cRel an der Induktion von IFIT3 beteiligt sein kann. In MEF-Zellen wird cRel nach IFN-Behandlung zum IFIT3 Promotor rekrutiert. [57]

Wie im Ergebnisteil dargestellt ist NF- $\kappa$ B auch in COLO357FG- und L3.6pl-Zellen an der IFN- $\alpha$ -induzierten Expression von IFIT3 beteiligt. Durch Inhibition von NF- $\kappa$ B mittels BAY 11-7082 ließ sich die IFN- $\alpha$  induzierte Expression von IFIT3 signifikant verringern. Sie unterschied sich dann nicht mehr wesentlich von der basalen IFIT3-Expression unbehandelter Zellen. Auch die basale IFIT3-Expression ließ sich durch NF- $\kappa$ B-Inhibition senken. Die Höhe der IFIT3-Expression war dabei niedriger als bei

NF- $\kappa$ B-inhibierten und IFN- $\alpha$ -behandelten Zellen. Vollständig ließ sich die Expression jedoch auch in diesem Experiment nicht inhibieren.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich außerdem schlussfolgern, dass die IFIT3-Expression durch STAT1 und NF- $\kappa$ B synergistisch beeinflusst wird. Dies kann durch die gleichzeitige Inhibition von STAT1 und NF- $\kappa$ B belegt werden, welche dazu führte, dass die IFN- $\alpha$ -induzierte IFIT3-Expression unter das Niveau der Expression bei alleiniger STAT1- oder NF- $\kappa$ B-Inhibition sank.

Zusammenfassend lässt sich damit behaupten, dass in COLO357FG- und in L3.6pl-Zellen sowohl die basale, als auch die IFN- $\alpha$  induzierte IFIT3-Expression von STAT1 und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B abhängig sind. STAT1 und NF- $\kappa$ B beeinflussen die IFIT3-Expression synergistisch. In COLO357FG-Zellen ist die Inhibition beider Faktoren ausreichend, um die basale Expression von IFIT3 nahezu vollständig zu unterbinden. In L3.6pl-Zellen erlischt die basale Expression von IFIT3 jedoch auch bei synergistischer Inhibition nicht komplett und muss deshalb von weiteren Faktoren beeinflusst werden.

### **6.3.3 Sox9 als Transkriptionsfaktor von IFIT3**

Wie die vorliegenden Daten zeigen, ist ein Faktor, der die basale IFIT3-Expression in den aggressiven L3.6pl-Zellen entscheidend beeinflusst, der Transkriptionsfaktor Sox9.

Erste Hinweise, dass Sox9 ein Transkriptionsfaktor für IFIT3 ist, lieferte bereits eine *in silico* Untersuchung des IFIT3-Promotors. [158] *In vitro* zeigte sich dann der enorme Einfluss von Sox9 auf die IFIT3-Expression. Durch die Inhibition von Sox9 verringerte sich die IFIT3-Expression in unstimulierten L3.6pl-Zellen dramatisch. Es kam zu einem Rückgang um etwa das 6300-fache.

Dieser Tatsache kommt eine besondere Bedeutung zu. In einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe wurde eine konstitutive Überexpression von Sox9 in der aggressiven Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl, unabhängig von hypoxischen oder normoxischen Konditionen nachgewiesen. [161] Zusammen mit dem massiven Rückgang der IFIT3-Expression nach Sox9-Inhibition deutet dies darauf hin, dass Sox9 ein Transkriptions-

faktor von IFIT3 ist, durch dessen konstitutive Überexpression in L3.6pl-Zellen ein IFN- $\alpha$ -unabhängiger Mechanismus für die IFIT3-Expression vorliegt.

Analog zu [157] lässt sich aufgrund dieser Ergebnisse die von äußeren Faktoren unabhängige basale IFIT3-Expression in L3.6pl-Zellen durch die konstitutive Überexpression des Transkriptionsfaktors Sox9 erklären.

## 6.4 Vermehrte Expression von Entzündungsmediatoren

Dass IFIT3 im Rahmen des entzündlichen Tumormikromilieus eine Rolle spielen und möglicherweise zu einer Zytokinexpression führen könnte, ließen mehrere Aspekte vermuten:

IFIT3 kann, wie in dieser Arbeit bereits mehrfach dargestellt, durch entzündliche Signale, wie z.B. IFN- $\alpha$ , induziert werden.

An seiner Expression ist der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B beteiligt. NF- $\kappa$ B beeinflusst u.a. die Regulation von Genen, die Entzündungsreaktionen beeinflussen. [182]

Weiterhin kann IFIT3 mit JNK interagieren. [158] JNK kann über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bzw. Transkriptionsfaktorkomplexen (z.B. c-jun/AP-1) zur Expression proinflammatorischer Zytokine führen. [89, 183-187]

Von den untersuchten Zelllinien können tatsächlich die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  produziert werden. Die Sekretion von IL-6 ist durch IFIT3 beeinflusst. Für TNF- $\alpha$  konnte ein Trend zu einer vermehrten Sekretion bei IFIT3-Überexpression gesehen werden, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, und IL-10 hingegen konnten weder bei COLO357FG-, noch bei L3.6pl-Zellen im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Auch eine Behandlung mit IFN- $\alpha$  oder eine IFIT3-Überexpression führen hier nicht zu einer Induktion.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass IFIT3 durch eine Förderung der Zytokinexpression in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zur Ausbildung eines inflammatorischen Tumormikromilieus beiträgt.

### 6.4.1 IL-6

Wie einleitend bereits dargestellt, wurde für IL-6 eine Assoziation mit Proliferation, Zellüberleben, Invasion, Metastasierung und Angiogenese bei Tumoren beschrieben. Zudem ist für verschiedene Tumorzellen bekannt, dass sie selbst IL-6 produzieren können. [110, 112-115]

Wie in dieser Arbeit gezeigt, können auch die Pankreaskarzinomzellen COLO357FG und L3.6pl das Zytokin IL-6 produzieren.

IFIT3 beeinflusst, wie erwartet, die Sekretion von IL-6. Von COLO357FG-(Leervektor-)Zellen wird weniger IL-6 produziert, als von L3.6pl-(Leervektor-)Zellen.

Durch Überexpression von IFIT3 konnte dessen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 gezeigt werden: die Sekretion von IL-6 steigt durch Überexpression von IFIT3 in COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen deutlich an.

Gleichzeitig konnten durch eine Versuchsanordnung, die mittels Sox9shRNA zu einer indirekten Downregulation von IFIT3 führt, die IL-6-Level im Zellkulturüberstand gesenkt werden. Eine Induktion durch IFN- $\alpha$  war dann sogar gar nicht mehr möglich. Wie oben dargestellt, ist Sox9 ein wichtiger Transkriptionsfaktor von IFIT3, der zu dessen von äußeren Einflüssen unabhängiger Expression beiträgt. Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors Sox9 auf die IFIT3-induzierte IL-6-Produktion in L3.6pl-Zellen zu untersuchen, wurde Sox9 funktionell durch RNA-Interferenz mittels Sox9shRNA ausgeschaltet. Eine Sox9-Inhibition bewirkt entsprechend Kapitel 5.3.3 einen massiven Rückgang von IFIT3. Bei einer von IFIT3-beeinflussten IL-6-Sekretion war deshalb eine Erniedrigung der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand der L3.6pl-Zellen zu erwarten. Diese Erwartung bestätigte sich in den durchgeführten Versuchen. Die basale Konzentration von IL-6 sank nach Expression von Sox9shRNA, allerdings nicht signifikant. Bei Behandlung mit IFN- $\alpha$  war die Sekretion von IL-6 bei gleichzeitiger Expression von Sox9shRNA jedoch signifikant vermindert und ließ sich nicht mehr induzieren. Möglicherweise besitzt IFIT3 somit zusätzlich auch eine Bedeutung für die Signalübertragung der IFN- $\alpha$ -vermittelten IL-6-Produktion.

Doppelsträngige RNA kann einen entzündlichen Stimulus darstellen, der zur Ausbildung einer Immunantwort und damit auch zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt. Derart verfälschte Ergebnisse durch Sox9shRNA (oder die Zugabe von Tetrazyklin) konnten wir in Experimenten mit L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen ausschließen. LacZshRNA besitzt kein Zielgen im menschlichen Genom. Veränderungen der IL-6-Produktion nach Tetrazyklinbehandlung wären dann auf Tetrazyklin oder auf die Expression von shRNA zurückzuführen gewesen.

In der Zusammenschau lassen die Ergebnisse hinsichtlich IL-6 damit folgenden Schluss zu:

Für die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 ist in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien das Protein IFIT3 mit verantwortlich. Möglicherweise vermittelt es auch dessen Induktion durch IFN- $\alpha$ .

In L3.6pl-Zellen ist die Zytokininduktion teilweise entkoppelt von entzündlichen Signalen, wie z.B. IFN- $\alpha$ . Durch die konstitutive Überexpression des Transkriptionsfaktors Sox9 kommt es zur Überexpression von IFIT3. Auf diese Weise sind die Tumorzellen in der Lage unabhängig von externen Stimuli das Zytokin IL-6 zu exprimieren und ein inflammatorisches Mikromilieu zu fördern.

Wie in den einleitenden Kapiteln beschrieben, wird Zytokinen und einem entzündlichen Tumormilieu ein tumorfördernder Einfluss zugeschrieben. Somit stellt die durch IFIT3-stimulierte IL-6-Sekretion einen weiteren Mechanismus zur Förderung eines malignen Phänotyps der aggressiven Zelllinie L3.6pl dar.

## 6.4.2 TNF- $\alpha$

Auch das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  wird von den untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien sezerniert. Es zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Sekretion bei IFIT3-Überexpression, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant.

Ebenso scheint die Induktion durch IFN- $\alpha$  bei TNF- $\alpha$  im Gegensatz zu IL-6 weniger stark von IFIT3 abhängig zu sein. So lässt sich auch nach Inhibition von Sox9 und der damit einhergehenden Downregulation von IFIT3 das Zytokin TNF- $\alpha$  durch IFN- $\alpha$  induzieren.

Insgesamt lässt sich durch den Nachweis der TNF- $\alpha$ -Sekretion die These der Förderung eines inflammatorischen Mikromilieus durch die Tumorzellen selbst weiter untermauern. IFIT3 scheint auf die TNF- $\alpha$  Sekretion jedoch einen geringeren Einfluss zu haben, als auf die Produktion von IL-6.

## **7 FAZIT: „PSEUDOINFLAMMATIONS- HYPOTHESE“**

Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen werden nachfolgend noch einmal zusammenfassend dargestellt, ebenso wie die Herleitung der sich daraus ergebenden Pseudoinflammationshypothese. Es wird außerdem auf die (mittlerweile) bekannte klinische Bedeutung und die in weiteren Untersuchungen noch zu beantwortenden Fragen eingegangen.

IFIT3 ist ein Protein, das in humanen Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert werden kann und dort, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, einen malignen Phänotyp begünstigt. Die Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen wird erhöht. Dazu zählt auch ein vermindertes Ansprechen auf Chemotherapeutika.

Zudem fördert es die Entstehung und Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren, sowie den Metastasierungsprozess und führt zu einer vermehrten desmoplastischen Reaktion. [158]

In der weniger aggressiven Pankreaskarzinomzelllinie COLO357FG wird IFIT3 auf einem niedrigeren Niveau exprimiert. Entzündliche Stimuli wie IFN- $\alpha$  induzieren die Transkription von IFIT3. An der intrazellulären Übertragung der inflammatorischen Signale und der daraus folgenden IFIT3-Expression sind Proteine wie STAT1 und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B beteiligt.

In der aggressiven Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl liegt im Gegensatz zu den COLO357FG-Zellen eine Überexpression des malignitätsfördernden Proteins IFIT3 vor. Diese erhöhte basale Expression ist unabhängig von externen Stimuli, da sie in der in [161] nachgewiesenen konstitutiven Überexpression von Sox9 begründet ist. Sox9 fungiert als Transkriptionsfaktor von IFIT3, der in erheblichem Ausmaß für dessen Expression verantwortlich ist.

Weiterhin ist bekannt, dass IFIT3 mit verschiedenen anderen Proteinen, darunter STAT1 und JNK interagieren kann. [158] Über den IFIT3 Interaktionspartner JNK ist bekannt, dass er Transkriptionsfaktoren wie c-jun phosphorylieren und aktivieren kann. Die von JNK phosphorylierten Transkriptionsfaktoren stimulieren die Transkription

einer Reihe von Genen, darunter proangiogenetische Gene wie VEGF und proinflammatorische Gene, wie TNF- $\alpha$  und IL-6. [89, 183, 185-187]

Die Expression der Proteine VEGF, TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie die Induktion von VEGF und IL-6 durch IFIT3 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Insgesamt führen diese Ergebnisse zur Formulierung einer so genannten „Pseudoinflammationshypothese“, wie sie bereits in [157] diskutiert wurde: die durch IFIT3 hervorgerufene Entzündungsreaktion entsteht unabhängig von äußeren inflammatorischen Stimuli allein aufgrund der Überexpression von IFIT3 durch dessen konstitutiv überexprimierten Transkriptionsfaktor Sox9. Da für die so verursachte entzündliche Reaktion kein adäquater externer Reiz vorliegt, wird sie als „pseudoinflammatorische Reaktion“ bezeichnet. Durch diese besitzen L3.6pl Zellen einen Mechanismus, über den sie unabhängig von externen Reizen ihr Wachstum, ihr Metastasierungspotential und ihre Chemoresistenz fördern können. (vgl. Abb. 17)

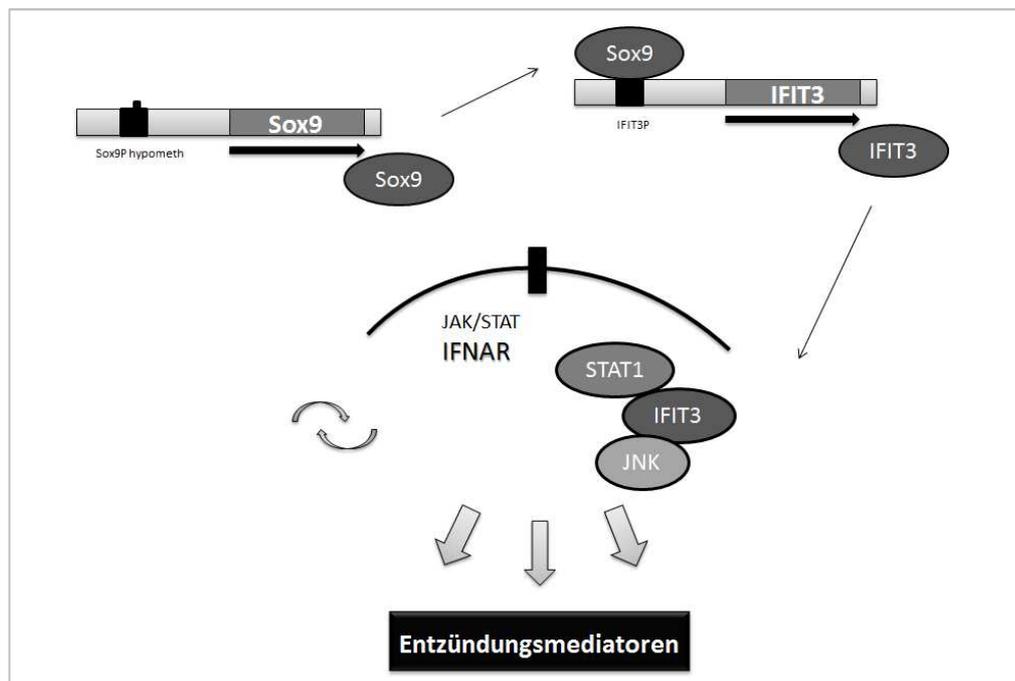


Abb. 17: Pseudoinflammationshypothese

Insbesondere durch die Ergebnisse aus Kapitel 5.4 wird diese Hypothese weiter untermauert. Hier wurde tatsächlich die von externen inflammatorischen Stimuli unabhängige IFIT3-bedingte Produktion von Entzündungsmediatoren durch die untersuchten Zel-

len nachgewiesen. So kann IFIT3 direkt zur Ausbildung eines inflammatorischen Mikromilieus beitragen.

Insgesamt belegen die Ergebnisse der in dieser Arbeit dargestellten Versuche zusammen mit den ergänzenden Ergebnissen der *in vivo* Versuche [158] unserer Arbeitsgruppe einen potentiell malignitätsfördernden Einfluss von IFIT3 beim humanen Pankreaskarzinom.

Die klinische Bedeutung dieser Arbeit ergibt sich daraus, dass eine IFIT3 Expression auch in Operationspräparaten von Pankreaskarzinompatienten gefunden werden kann. Untersuchungen, die während der Revision dieser Arbeit veröffentlicht wurden, zeigten eine Assoziation zwischen einer erhöhten IFIT3-Expression und einem kürzeren Überleben bei Pankreaskarzinompatienten, die eine Chemotherapie erhielten. [188]

Für die Entwicklung dringend notwendiger, effektiver, zielgerichteter Therapiemöglichkeiten beim humanen Pankreaskarzinom eröffnen die Erkenntnisse dieser Arbeit zu IFIT3 deshalb möglicherweise neue Ansatzpunkte. Hierfür sind jedoch zunächst weitere grundlagenorientierte Untersuchungen notwendig. So müssen etwa die molekularen Mechanismen von IFIT3 genauer untersucht werden. Auch die Überprüfung der biologischen Wirksamkeit der von IFIT3 induzierten Entzündungsmediatoren steht noch aus. Nicht zuletzt sind weitere *in vivo* Experimente notwendig, um zu zeigen, ob durch eine zielgerichtete Beeinflussung der IFIT3-Expression ein therapeutischer Effekt beim Pankreaskarzinom erreicht werden kann.

Der Weg bis zu einer praktischen Anwendung der hier gewonnenen Erkenntnisse zu IFIT3 beim Pankreaskarzinom ist noch weit und ungewiss. Dennoch liefern die Ergebnisse der Arbeit hoffentlich einen kleinen Beitrag im Streben nach einer besseren Therapie dieses häufigen und hochmalignen Tumors.

# LITERATURVERZEICHNIS

1. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. *European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias*. Ann Oncol. 2016; **27**(4): 725-31.
2. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Hrsg. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Auflage. Berlin; 2015: 50-53.
3. Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A. *Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell*. J Gastroenterol Hepatol. 2012; **27 Suppl 2**: 127-34.
4. Maisonneuve P, Lowenfels AB. *Epidemiology of pancreatic cancer: an update*. Dig Dis. 2010; **28**(4-5): 645-56.
5. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Michaud DS, Severinsen MT, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Rohrmann S, Boeing H, Nothlings U, Trichopoulou A, Moutsiou E, Dilis V, Palli D, Krogh V, Panico S, Tumino R, Vineis P, van Gils CH, Peeters PH, Lund E, Gram IT, Rodriguez L, Agudo A, Larranaga N, Sanchez MJ, Navarro C, Barricarte A, Manjer J, Lindkvist B, Sund M, Ye W, Bingham S, Khaw KT, Roddam A, Key T, Boffetta P, Duell EJ, Jenab M, Gallo V, Riboli E. *Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Int J Cancer. 2010; **126**(10): 2394-403.
6. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. *Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies*. Int J Cancer. 2007; **120**(9): 1993-8.
7. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C. *Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation*. Int J Cancer. 2010; **126**(6): 1474-86.
8. Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Gao YT, Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P, Duell EJ. *Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4)*. Ann Oncol. 2012; **23**(2): 374-82.
9. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruzsiewicz P. *Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis*. Gut. 2002; **51**(6): 849-52.
10. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. *Biology and management of pancreatic cancer*. Gut. 2007; **56**(8): 1134-52.
11. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group*. N Engl J Med. 1993; **328**(20): 1433-7.
12. Shi C, Hruban RH, Klein AP. *Familial pancreatic cancer*. Arch Pathol Lab Med. 2009; **133**(3): 365-74.

13. Hsu C, Saif MW. *Diabetes and pancreatic cancer. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011.* JOP. 2011; **12**(4): 330-3.
14. Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. *New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer.* Lancet Oncol. 2009; **10**(1): 88-95.
15. Hamilton SR, Aaltonen LA, Hrsg. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Lyon: IARC Press; 2000: 219-233.
16. Reissfelder C, Koch M, Buchler MW, Weitz J. *Pankreaskarzinom.* Chirurg. 2007; **78**(11): 1059-71; quiz 1072.
17. Hruban RH, Klimstra DS. *Adenocarcinoma of the pancreas.* Semin Diagn Pathol. 2014; **31**(6): 443-51.
18. Maitra A, Hruban RH. *Pancreatic Cancer.* Annu Rev Pathol. 2008; **3**(1): 157-188.
19. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kleeff J. *Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer.* Exp Oncol. 2010; **32**(3): 128-31.
20. Luo G, Long J, Zhang B, Liu C, Xu J, Ni Q, Yu X. *Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: An interaction loop.* Biochim Biophys Acta. 2012; **1826**(1): 170-178.
21. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. *Pancreatic cancer.* Lancet. 2011; **378**(9791): 607-20.
22. Korc M. *Pancreatic cancer-associated stroma production.* Am J Surg. 2007; **194**(4 Suppl): S84-6.
23. Beger HG, Rau B, Gansauge F, Leder G, Schwarz M, Poch B. *Pancreatic cancer--low survival rates.* Dtsch Arztebl Int. 2008; **105**(14): 255-62.
24. Macgregor-Das AM, Iacobuzio-Donahue CA. *Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis.* J Surg Oncol. 2013; **107**(1): 8-14.
25. Maitra A, Kern SE, Hruban RH. *Molecular pathogenesis of pancreatic cancer.* Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006; **20**(2): 211-26.
26. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. *Precursors to pancreatic cancer.* Gastroenterol Clin North Am. 2007; **36**(4): 831-49, vi.
27. Hruban RH, Adsay NV. *Molecular classification of neoplasms of the pancreas.* Hum Pathol. 2009; **40**(5): 612-23.
28. Magee CJ, Greenhalf W, Howes N, Ghaneh P, Neoptolemos JP. *Molecular pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical implications.* Surg Oncol. 2001; **10**(1-2): 1-23.
29. Khalid A, Finkelstein S, McGrath K. *Molecular diagnosis of solid and cystic lesions of the pancreas.* Gastroenterol Clin North Am. 2004; **33**(4): 891-906.
30. Brosens LAA, Hackeng WM, Offerhaus GJ, Hruban RH, Wood LD. *Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing "landscape".* J Gastrointest Oncol. 2015; **6**(4): 358-374.
31. Zavoral M, Minarikova P, Zavada F, Salek C, Minarik M. *Molecular biology of pancreatic cancer.* World J Gastroenterol. 2011; **17**(24): 2897-908.
32. Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. *Pancreatic adenocarcinoma.* BMJ. 2012; **344**: e2476.
33. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goere D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T, Arnold D. *Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol. 2015; **26** Suppl 5: v56-68.

34. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). *Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, AWMF Registernummer: 032-0100L*. [Internet]. 2013 [zitiert am 30.11.2013]. URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.
35. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW. *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med. 2004; **350**(12): 1200-10.
36. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Buchler MW. *Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial*. JAMA. 2010; **304**(10): 1073-81.
37. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J, Darby S, Meyer T, Gillmore R, Anthony A, Lind P, Glimelius B, Falk S, Izbicki JR, Middleton GW, Cummins S, Ross PJ, Wasan H, McDonald A, Crosby T, Ma YT, Patel K, Sherriff D, Soomal R, Borg D, Sothi S, Hammel P, Hackert T, Jackson R, Buchler MW. *Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet. 2017; **389**(10073): 1011-1024.
38. Rau BM, Moritz K, Schuschank S, Alsfasser G, Prall F, Klar E. *R1 resection in pancreatic cancer has significant impact on long-term outcome in standardized pathology modified for routine use*. Surgery. 2012; **152**(3 Suppl 1): S103-11.
39. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol. 1997; **15**(6): 2403-13.
40. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C, Bennouna J, Bacht JB, Khemissa-Akouz F, Pere-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M. *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med. 2011; **364**(19): 1817-25.
41. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Taberner J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. N Engl J Med. 2013; **369**(18): 1691-703.
42. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol. 2007; **25**(15): 1960-6.

43. Tannapfel A. *Neue S3-Leitlinie exokrines Pankreaskarzinom*. Pathologe. 2012; **33 Suppl 2**: 266-8.
44. Z'Graggen K, Biral R, Thürig C, Gwerder C, Furrer T. *Das Pankreaskarzinom Aktuelle Epidemiologie, Diagnostik, Therapie*. Schweizer Zeitschrift für Onkologie. 2006(4): 14-16.
45. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. *IFIT3 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 [ Homo sapiens (human) ]* [Internet]. 2013, Last updated 07.07.2013 [zitiert am 09.07.2013]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3437>.
46. Zhou X, Michal JJ, Zhang L, Ding B, Lunney JK, Liu B, Jiang Z. *Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense*. Int J Biol Sci. 2013; **9**(2): 200-8.
47. Yu M, Tong JH, Mao M, Kan LX, Liu MM, Sun YW, Fu G, Jing YK, Yu L, Lepaslier D, Lanotte M, Wang ZY, Chen Z, Waxman S, Wang YX, Tan JZ, Chen SJ. *Cloning of a gene (RIG-G) associated with retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells and representing a new member of a family of interferon-stimulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; **94**(14): 7406-11.
48. de Veer MJ, Sim H, Whisstock JC, Devenish RJ, Ralph SJ. *IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes*. Genomics. 1998; **54**(2): 267-77.
49. Fensterl V, Sen GC. *The ISG56/IFIT1 gene family*. J Interferon Cytokine Res. 2011; **31**(1): 71-8.
50. Cerveny L, Straskova A, Dankova V, Hartlova A, Ceckova M, Staud F, Stulik J. *Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms*. Infect Immun. 2013; **81**(3): 629-35.
51. D'Andrea LD, Regan L. *TPR proteins: the versatile helix*. Trends Biochem Sci. 2003; **28**(12): 655-662.
52. Blatch GL, Lassle M. *The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions*. Bioessays. 1999; **21**(11): 932-9.
53. Platanias LC. *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol. 2005; **5**(5): 375-86.
54. Lou YJ, Pan XR, Jia PM, Li D, Xiao S, Zhang ZL, Chen SJ, Chen Z, Tong JH. *IRF-9/STAT2 [corrected] functional interaction drives retinoic acid-induced gene G expression independently of STAT1*. Cancer Res. 2009; **69**(8): 3673-80.
55. Lou YJ, Zhang ZL, Pan XR, Xu GP, Jia PM, Li D, Tong JH. *Intact JAK-STAT signaling pathway is a prerequisite for STAT1 to reinforce the expression of RIG-G gene*. Exp Cell Res. 2011; **317**(4): 513-20.
56. Huang X, Yang N, Ou X, Li D, Wang Z, Xie Q, Chen Y, Lin H, Yin G, Wen F. *Sequential activation of protein kinase C delta and JNK is required for interferon-alpha-induced expression of IFIT4*. Cell Signal. 2008; **20**(1): 112-9.
57. Wei L, Fan M, Xu L, Heinrich K, Berry MW, Homayouni R, Pfeffer LM. *Bioinformatic analysis reveals cRel as a regulator of a subset of interferon-stimulated genes*. J Interferon Cytokine Res. 2008; **28**(9): 541-51.
58. Gu ZM, Liu CX, Wu SF, Zhao M, Xu HZ, Liu W, Zhou HC, Chen GQ, Wu YL. *PU.1 directly regulates retinoic acid-induced expression of RIG-G in leukemia cells*. FEBS Lett. 2011; **585**(2): 375-80.
59. van den Pol AN, Robek MD, Ghosh PK, Ozduman K, Bandi P, Whim MD, Wollmann G. *Cytomegalovirus induces interferon-stimulated gene expression*

- and is attenuated by interferon in the developing brain.* J Virol. 2007; **81**(1): 332-48.
60. Ternette N, Wright C, Kramer HB, Altun M, Kessler BM. *Label-free quantitative proteomics reveals regulation of interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) and 5'-3'-exoribonuclease 2 (XRN2) during respiratory syncytial virus infection.* Virol J. 2011; **8**(1): 442.
61. Ovstebo R, Olstad OK, Brusletto B, Moller AS, Aase A, Haug KB, Brandtzaeg P, Kierulf P. *Identification of genes particularly sensitive to lipopolysaccharide (LPS) in human monocytes induced by wild-type versus LPS-deficient Neisseria meningitidis strains.* Infect Immun. 2008; **76**(6): 2685-95.
62. Zhang L, Liu J, Bai J, Du Y, Wang X, Liu X, Jiang P. *Poly(I:C) inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in MARC-145 cells via activation of IFIT3.* Antiviral Res. 2013; **99**(3): 197-206.
63. Liu XY, Chen W, Wei B, Shan YF, Wang C. *IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1.* J Immunol. 2011; **187**(5): 2559-68.
64. Xiao S, Li D, Zhu HQ, Song MG, Pan XR, Jia PM, Peng LL, Dou AX, Chen GQ, Chen SJ, Chen Z, Tong JH. *RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; **103**(44): 16448-53.
65. Stawowczyk M, Van Scoy S, Kumar KP, Reich NC. *The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis.* J Biol Chem. 2011; **286**(9): 7257-66.
66. Huang X, Shen N, Bao C, Gu Y, Wu L, Chen S. *Interferon-induced protein IFIT4 is associated with systemic lupus erythematosus and promotes differentiation of monocytes into dendritic cell-like cells.* Arthritis Res Ther. 2008; **10**(4): R91.
67. Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, van de Merwe JP, Drexhage HA, Versnel MA. *Systemic increase in type I interferon activity in Sjogren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells.* Eur J Immunol. 2008; **38**(7): 2024-33.
68. Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, Biancolini D, Beretta O, Severa M, Coccia EM, Confalonieri P, Morandi L, Mora M, Mantegazza R, Bernasconi P. *Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies.* Neurology. 2011; **76**(24): 2079-88.
69. Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A. *Pathways connecting inflammation and cancer.* Curr Opin Genet Dev. 2008; **18**(1): 3-10.
70. Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. *Progression of chronic atrophic gastritis associated with Helicobacter pylori infection increases risk of gastric cancer.* Int J Cancer. 2004; **109**(1): 138-43.
71. Ullman TA, Itzkowitz SH. *Intestinal inflammation and cancer.* Gastroenterology. 2011; **140**(6): 1807-16.
72. Coussens LM, Werb Z. *Inflammation and cancer.* Nature. 2002; **420**(6917): 860-867.
73. Shacter E, Weitzman SA. *Chronic inflammation and cancer.* Oncology (Williston Park). 2002; **16**(2): 217-26, 229; discussion 230-2.
74. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Cancer-related inflammation.* Nature. 2008; **454**(7203): 436-44.

75. Delitto D, Black BS, Sorenson HL, Knowlton AE, Thomas RM, Sarosi GA, Moldawer LL, Behrns KE, Liu C, George TJ, Trevino JG, Wallet SM, Hughes SJ. *The inflammatory milieu within the pancreatic cancer microenvironment correlates with clinicopathologic parameters, chemoresistance and survival.* BMC Cancer. 2015; **15**: 783.
76. Candido J, Hagemann T. *Cancer-related inflammation.* J Clin Immunol. 2013; **33 Suppl 1**: S79-84.
77. Lippitz BE. *Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review.* Lancet Oncol. 2013; **14**(6): e218-28.
78. Mahadevan D, Von Hoff DD. *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma.* Mol Cancer Ther. 2007; **6**(4): 1186-97.
79. Roshani R, McCarthy F, Hagemann T. *Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer.* Cancer Lett. 2013; **345**(2): 157-63.
80. Balkwill F, Mantovani A. *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet. 2001; **357**(9255): 539-45.
81. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. *Inflammation and cancer: how hot is the link?* Biochem Pharmacol. 2006; **72**(11): 1605-21.
82. Grivennikov SI, Karin M. *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection.* Curr Opin Genet Dev. 2010; **20**(1): 65-71.
83. Lu H, Ouyang W, Huang C. *Inflammation, a key event in cancer development.* Mol Cancer Res. 2006; **4**(4): 221-33.
84. Sansone P, Bromberg J. *Environment, inflammation, and cancer.* Curr Opin Genet Dev. 2011; **21**(1): 80-5.
85. Chu WM. *Tumor necrosis factor.* Cancer Lett. 2013; **328**(2): 222-5.
86. Zhao X, Fan W, Xu Z, Chen H, He Y, Yang G, Yang G, Hu H, Tang S, Wang P, Zhang Z, Xu P, Yu M. *Inhibiting tumor necrosis factor-alpha diminishes desmoplasia and inflammation to overcome chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma.* Oncotarget. 2016; **7**(49): 81110-22.
87. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A. *Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis.* Cancer Res. 2008; **68**(5): 1443-50.
88. Balkwill F. *Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?* Cytokine Growth Factor Rev. 2002; **13**(2): 135-41.
89. Ishizuka T, Terada N, Gerwins P, Hamelmann E, Oshiba A, Fanger GR, Johnson GL, Gelfand EW. *Mast cell tumor necrosis factor alpha production is regulated by MEK kinases.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; **94**(12): 6358-63.
90. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS. *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway.* Infect Immun. 1999; **67**(8): 3824-9.
91. Hoareau L, Bencharif K, Rondeau P, Murumalla R, Ravanan P, Tallet F, Delarue P, Cesari M, Roche R, Festy F. *Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes.* J Inflamm (Lond). 2010; **7**: 1.
92. Balkwill F. *Tumour necrosis factor and cancer.* Nat Rev Cancer. 2009; **9**(5): 361-71.
93. Lin WW, Karin M. *A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.* J Clin Invest. 2007; **117**(5): 1175-83.

94. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, Gould D, Ayhan A, Balkwill F. *The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells*. Cancer Res. 2007; **67**(2): 585-92.
95. Schmiegel W, Roeder C, Schmielau J, Rodeck U, Kalthoff H. *Tumor necrosis factor alpha induces the expression of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; **90**(3): 863-7.
96. Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. *Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; **92**(7): 2840-4.
97. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. *Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression*. Cancer Cell. 2004; **6**(3): 297-305.
98. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. *Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis*. Mol Cell Biol. 1997; **17**(7): 4015-23.
99. Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH. *Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR*. Cancer Res. 2003; **63**(14): 4181-7.
100. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha*. Nature. 1987; **329**(6140): 630-2.
101. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M. *Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1*. J Biol Chem. 1996; **271**(45): 28220-8.
102. Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, Psallidas I, Sherrill TP, Pitsinos EN, Vassiliou S, Karatza M, Papis SA, Graf D, Orphanidou D, Light RW, Roussos C, Blackwell TS, Kalomenidis I. *Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion*. Cancer Res. 2007; **67**(20): 9825-34.
103. Rice GE, Bevilacqua MP. *An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion*. Science. 1989; **246**(4935): 1303-6.
104. Rice GE, Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP. *Tumor cell-endothelial interactions. Increased adhesion of human melanoma cells to activated vascular endothelium*. Am J Pathol. 1988; **133**(2): 204-10.
105. Rosen EM, Goldberg ID, Liu D, Setter E, Donovan MA, Bhargava M, Reiss M, Kacinski BM. *Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor cell motility*. Cancer Res. 1991; **51**(19): 5315-21.
106. Wang X, Lin Y. *Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?* Acta Pharmacol Sin. 2008; **29**(11): 1275-88.
107. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C. *Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases*. Carcinogenesis. 2004; **25**(8): 1543-9.

108. Montesano R, Soulie P, Eble JA, Carrozzino F. *Tumour necrosis factor alpha confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells*. J Cell Sci. 2005; **118**(Pt 15): 3487-500.
109. Dima SO, Tanase C, Albuлесcu R, Herlea V, Chivu-Economescu M, Purnichescu-Purtan R, Dumitrascu T, Duda DG, Popescu I. *An exploratory study of inflammatory cytokines as prognostic biomarkers in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas. 2012; **41**(7): 1001-7.
110. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. *Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer*. Cancer Treat Rev. 2012; **38**(7): 904-10.
111. Rincon M. *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases*. Trends Immunol. 2012; **33**(11): 571-7.
112. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. *Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev. 2013; **24**(2): 163-73.
113. Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M, Emanuelli G. *Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival*. Cancer Immunol Immunother. 2006; **55**(6): 684-98.
114. Weidle UH, Klostermann S, Eggle D, Kruger A. *Interleukin 6/interleukin 6 receptor interaction and its role as a therapeutic target for treatment of cachexia and cancer*. Cancer Genomics Proteomics. 2010; **7**(6): 287-302.
115. Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. *Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells*. Endocr Relat Cancer. 2010; **17**(1): 241-53.
116. Naugler WE, Karin M. *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer*. Trends Mol Med. 2008; **14**(3): 109-19.
117. Aggarwal BB, Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Ichikawa H. *Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution*. Ann N Y Acad Sci. 2006; **1091**: 151-69.
118. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. *Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res. 2002; **62**(12): 3351-5.
119. Zhang X, Zhang J, Wei H, Tian Z. *STAT3-decoy oligodeoxynucleotide inhibits the growth of human lung cancer via down-regulating its target genes*. Oncol Rep. 2007; **17**(6): 1377-82.
120. Wang XH, Liu BR, Qu B, Xing H, Gao SL, Yin JM, Wang XF, Cheng YQ. *Silencing STAT3 may inhibit cell growth through regulating signaling pathway, telomerase, cell cycle, apoptosis and angiogenesis in hepatocellular carcinoma: potential uses for gene therapy*. Neoplasma. 2011; **58**(2): 158-71.
121. Tang RF, Wang SX, Zhang FR, Peng L, Wang SX, Xiao Y, Zhang M. *Interleukin-1alpha, 6 regulate the secretion of vascular endothelial growth factor A, C in pancreatic cancer*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2005; **4**(3): 460-3.
122. Jee S-H, Chu C-Y, Chiu H-C, Huang Y-L, Tsai W-L, Liao Y-H, Kuo M-L. *Interleukin-6 Induced Basic Fibroblast Growth Factor-Dependent Angiogenesis*

- in Basal Cell Carcinoma Cell Line via JAK//STAT3 and PI3-Kinase//Akt Pathways.* J Invest Dermatol. 2004; **123**(6): 1169-1175.
123. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. *Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis.* Oncogene. 2002; **21**(13): 2000-8.
124. Van Snick J. *Interleukin-6: an overview.* Annu Rev Immunol. 1990; **8**: 253-78.
125. Mitsunaga S, Ikeda M, Shimizu S, Ohno I, Furuse J, Inagaki M, Higashi S, Kato H, Terao K, Ochiai A. *Serum levels of IL-6 and IL-1beta can predict the efficacy of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer.* Br J Cancer. 2013; **108**(10): 2063-9.
126. Okada S, Okusaka T, Ishii H, Kyogoku A, Yoshimori M, Kajimura N, Yamaguchi K, Kakizoe T. *Elevated serum interleukin-6 levels in patients with pancreatic cancer.* Jpn J Clin Oncol. 1998; **28**(1): 12-5.
127. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. *Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis.* Cancer. 2004; **101**(12): 2727-36.
128. Angst E, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. *Mononuclear cell-derived interleukin-1 beta confers chemoresistance in pancreatic cancer cells by upregulation of cyclooxygenase-2.* Surgery. 2008; **144**(1): 57-65.
129. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions.* Cancer Metastasis Rev. 2006; **25**(3): 387-408.
130. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawa R, Kikuchi T, Matsushima K, Nukiwa T. *Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction.* J Immunol. 2002; **169**(1): 469-75.
131. Verma G, Bhatia H, Datta M. *Gene expression profiling and pathway analysis identify the integrin signaling pathway to be altered by IL-1beta in human pancreatic cancer cells: role of JNK.* Cancer Lett. 2012; **320**(1): 86-95.
132. Giavazzi R, Garofalo A, Bani MR, Abbate M, Ghezzi P, Boraschi D, Mantovani A, Dejana E. *Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice.* Cancer Res. 1990; **50**(15): 4771-5.
133. Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, Dinarello CA. *Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro.* J Natl Cancer Inst. 1996; **88**(3-4): 198-205.
134. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. *IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; **100**(5): 2645-50.
135. Garofalo A, Chirivi RG, Foglieni C, Pigott R, Mortarini R, Martin-Padura I, Anichini A, Gearing AJ, Sanchez-Madrid F, Dejana E, et al. *Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases.* Cancer Res. 1995; **55**(2): 414-9.
136. Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H. *Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines.* Cancer Res. 2002; **62**(3): 910-6.

137. Apte RN, Voronov E. *Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions*. Semin Cancer Biol. 2002; **12**(4): 277-90.
138. Barber MD, Powell JJ, Lynch SF, Fearon KC, Ross JA. *A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer*. Br J Cancer. 2000; **83**(11): 1443-7.
139. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy*. Immunity. 2013; **38**(1): 13-25.
140. Eklund JW, Kuzel TM. *Interleukin-2 in the treatment of renal cell carcinoma and malignant melanoma*. Cancer Treat Res. 2005; **126**: 263-87.
141. Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. *Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system*. Cytokine Growth Factor Rev. 2006; **17**(5): 349-366.
142. Neuner A, Schindel M, Wildenberg U, Muley T, Lahm H, Fischer JR. *Prognostic significance of cytokine modulation in non-small cell lung cancer*. Int J Cancer. 2002; **101**(3): 287-92.
143. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev. 2002; **13**(2): 169-83.
144. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol. 1993; **11**: 165-90.
145. Terai M, Eto M, Young GD, Berd D, Mastrangelo MJ, Tamura Y, Harigaya K, Sato T. *Interleukin 6 mediates production of interleukin 10 in metastatic melanoma*. Cancer Immunol Immunother. 2012; **61**(2): 145-55.
146. Mosser DM, Zhang X. *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. Immunol Rev. 2008; **226**: 205-18.
147. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K. *IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response*. J Immunol. 1995; **155**(4): 2240-7.
148. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. *Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint*. J Leukoc Biol. 2005; **78**(5): 1043-51.
149. Huang S, Ullrich SE, Bar-Eli M. *Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience*. J Interferon Cytokine Res. 1999; **19**(7): 697-703.
150. Tanikawa T, Wilke CM, Kryczek I, Chen GY, Kao J, Nunez G, Zou W. *Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis*. Cancer Res. 2012; **72**(2): 420-9.
151. von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Johnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. *Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients*. Clin Cancer Res. 2001; **7**(3 Suppl): 925s-932s.
152. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, Gentilini O, Braga M. *Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours*. Cancer Lett. 1996; **104**(1): 1-5.
153. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. *Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients*. Am J Pathol. 1999; **155**(2): 537-47.
154. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. *In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice*. Neoplasia. 1999; **1**(1): 50-62.

155. Stanbridge E. *Mycoplasmas and cell cultures*. Bacteriol Rev. 1971; **35**(2): 206-227.
156. Svasti J, Panijpan B. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works*. J Chem Educ. 1977; **54**(9): 560.
157. Camaj P, Ischenko I, Seeliger H, Renner A, Krebs S, Arnold GJ, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. *Sox9-associated overexpression of IFIT3 leads to pancreatic cancer progression by activation of »pseudoinflammatory« pathways*. In: Gradinger R, Menger MD, Meyer HJ, Hrsg. *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010 für experimentelle und chirurgische Forschung*. Forumband 39. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2010: 59-60.
158. Niess H, Camaj P, Mair R, Renner A, Zhao Y, Jackel C, Nelson PJ, Jauch KW, Bruns CJ. *Overexpression of IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) in pancreatic cancer: cellular "pseudoinflammation" contributing to an aggressive phenotype*. Oncotarget. 2015; **6**(5): 3306-18.
159. Seeliger H, Camaj P, Ischenko I, Kleespies A, De Toni EN, Thieme SE, Blum H, Assmann G, Jauch KW, Bruns CJ. *EFEMP1 expression promotes in vivo tumor growth in human pancreatic adenocarcinoma*. Mol Cancer Res. 2009; **7**(2): 189-98.
160. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev. 1997; **18**(1): 4-25.
161. Camaj P, Jackel C, Krebs S, De Toni EN, Blum H, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns CJ. *Hypoxia-independent gene expression mediated by SOX9 promotes aggressive pancreatic tumor biology*. Mol Cancer Res. 2014; **12**(3): 421-32.
162. Fidler IJ. *Critical determinants of metastasis*. Semin Cancer Biol. 2002; **12**(2): 89-96.
163. Hanahan D, Weinberg RA. *The Hallmarks of Cancer*. Cell. 2000; **100**(1): 57-70.
164. Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H. *Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta*. Cancer Res. 2004; **64**(4): 1331-7.
165. Green DR, Martin SJ. *The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy*. Curr Opin Immunol. 1995; **7**(5): 694-703.
166. Munoz-Pinedo C. *Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense*. Adv Exp Med Biol. 2012; **738**: 124-43.
167. Caraglia M, Vitale G, Marra M, Budillon A, Tagliaferri P, Abbruzzese A. *Alpha-interferon and its effects on signalling pathways within cells*. Curr Protein Pept Sci. 2004; **5**(6): 475-85.
168. Krammer PH. *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature. 2000; **407**: 789.
169. Los M, Herr I, Friesen C, Fulda S, Schulze-Osthoff K, Debatin KM. *Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases)*. Blood. 1997; **90**(8): 3118-29.
170. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocr Rev. 1992; **13**(1): 18-32.
171. Moserle L, Casanovas O. *Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance*. J Intern Med. 2013; **273**(2): 128-37.

172. von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R, Plath T, Schirner M, Heidenreich R, Breier G, Riecken EO, Wiedenmann B, Rosewicz S. *De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop.* Gastroenterology. 2000; **119**(5): 1358-72.
173. Schoppmann SF. *Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis.* Anticancer Res. 2005; **25**(6c): 4503-11.
174. Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. *High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma.* Cancer. 2000; **88**(10): 2239-45.
175. Luqmani YA. *Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy.* Med Princ Pract. 2005; **14 Suppl 1**: 35-48.
176. Pestka S, Krause CD, Walter MR. *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.* Immunol Rev. 2004; **202**: 8-32.
177. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity.* Annu Rev Immunol. 2005; **23**: 307-36.
178. Smith JB, Herschman HR. *The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, and GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains.* Arch Biochem Biophys. 1996; **330**(2): 290-300.
179. Schmeisser H, Mejido J, Balinsky CA, Morrow AN, Clark CR, Zhao T, Zoon KC. *Identification of alpha interferon-induced genes associated with antiviral activity in Daudi cells and characterization of IFIT3 as a novel antiviral gene.* J Virol. 2010; **84**(20): 10671-80.
180. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.* Science. 1994; **264**(5164): 1415-21.
181. Yang CH, Murti A, Pfeffer SR, Basu L, Kim JG, Pfeffer LM. *IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; **97**(25): 13631-6.
182. Pfeffer LM. *The role of nuclear factor kappaB in the interferon response.* J Interferon Cytokine Res. 2011; **31**(7): 553-9.
183. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. *Interleukin-1 (IL-1) pathway.* Sci Signal. 2010; **3**(105): cm1.
184. Nishina H, Bachmann M, Oliveira-dos-Santos AJ, Kozieradzki I, Fischer KD, Odermatt B, Wakeham A, Shahinian A, Takimoto H, Bernstein A, Mak TW, Woodgett JR, Ohashi PS, Penninger JM. *Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes.* J Exp Med. 1997; **186**(6): 941-53.
185. Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M. *JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection.* Immunity. 1999; **11**(6): 721-31.
186. Vanden Bush TJ, Bishop GA. *TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation.* Eur J Immunol. 2008; **38**(2): 400-9.
187. Krause A, Holtmann H, Eickemeier S, Winzen R, Szamel M, Resch K, Saklatvala J, Kracht M. *Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is*

- required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. J Biol Chem. 1998; 273(37): 23681-9.*
188. Zhao Y, Altendorf-Hofmann A, Pozios I, Camaj P, Daberitz T, Wang X, Niess H, Seeliger H, Popp F, Betzler C, Settmacher U, Jauch KW, Bruns C, Knosel T. *Elevated interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) is a poor prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2017; 143(6): 1061-8.*

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: IFIT3 wird in L3.6pl-Zellen auf mRNA- (semi-quantitative RT-PCR) und auf Proteinebene (Western Blot) überexprimiert. $\beta$ -Aktin: Housekeeping Gen, FG: COLO357FG-Zelllinie.....	53
Abb. 2: Zellzyklusanalyse bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien .....	55
Abb. 3: VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand der verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien .....	56
Abb. 4: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit 5-FU.....	57
Abb. 5: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit Gemcitabin .....	57
Abb. 6: Chemosensitivitätsassay, Veränderungen der Apoptoseraten wurden dargestellt als x-faches des Anteils (%) apoptotischer Zellen bei zunehmenden Konzentrationen mit Irinotecan.....	58
Abb. 7: IFN-induzierte IFIT3-mRNA-Expression in COLO357FG- und L3.6pl-Zellen (vgl. 5.3.2) .....	59
Abb. 8: Regulationsmechanismen der IFIT3-Transkription in COLO357FG-Zellen: Veränderung der IFIT3-mRNA-Expression bei verschiedenen Behandlungen der Zellen.....	61
Abb. 9: Regulationsmechanismen der IFIT3-Transkription in L3.6pl-Zellen: Veränderung der IFIT3-mRNA-Expression bei verschiedenen Behandlungen der Zellen.....	61
Abb. 10: ausgeprägter Rückgang der IFIT3-mRNA-Expression nach Inhibition des Transkriptionsfaktors Sox9 durch Sox9shRNA in L3.6pl-6TR-SOX9shRNA- Zellen. $\beta$ -Aktin: Housekeeping Gen.....	62
Abb. 11: Unterschiede der IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null,COLO357FG/CMV-IFIT3- und L3.6pl/CMV-null-Zellen (jeweils ohne (-IFN) und mit IFN-Behandlung (+IFN)), dargestellt als Vielfaches der IL-6-Konzentration/Mio. Zellen im Zellkulturüberstand von unbehandelten COLO357FG/CMV-null-Zellen .....	64

---

Abb. 12: IL-6 Produktion von L3.6pl-6TR-Sox9shRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung).....	65
Abb. 13: IL-6 Produktion von L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung,+IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung).....	65
Abb. 14: Unterschiede der TNF- $\alpha$ Konzentration im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen, COLO357FG/CMV-IFIT3-Zellen und L3.6pl/CMV-null-Zellen, dargestellt als Vielfaches der TNF- $\alpha$ -Konzentration/Mio. Zellen im Zellkulturüberstand von COLO357FG/CMV-null-Zellen .....	66
Abb. 15: TNF- $\alpha$ Produktion von L3.6pl-6TR-Sox9shRNA-Zellen, (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung).....	67
Abb. 16: TNF- $\alpha$ Produktion in L3.6pl-6TR-LacZshRNA-Zellen (-IFN: ohne IFN-Behandlung, +IFN: mit IFN-Behandlung, -Tetrazyklin: ohne Tetrazyklinbehandlung, +Tetrazyklin: mit Tetrazyklinbehandlung).....	67
Abb. 17: Pseudoinflammationshypothese .....	84

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
5-FU	5- Fluorouracil
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	All-trans Retinsäure
Bcl-2	b-cell lymphoma 2
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp/ kbp	Basepair/ kilo basepair
BRCA2	Breast cancer 2, Tumorsuppressorgen
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
c-jun	Transkriptionsfaktor
cm <sup>2</sup> , cm <sup>3</sup>	Quadratzenimeter, Kubikzenimeter
CMV	Zytomegalievirus
c-myc	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
COX-2	Cyclooxygenase-2
cRel	NF-κB Protein
C-terminal	Carboxyterminal
DMEM	Dulbecco's Minimal Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, cDNA, gDNA	Desoxyribonukleinsäure, komplementäre DNA, genomische DNA
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermial growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2

<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorter
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>Forw</b>	Forward
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>g</b>	Schwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>GAPDH</b>	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GARG-49</b>	Glucocorticoid attenuated response gene 49
<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphatase
<b>HE-Färbung</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HER2/neu</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>IC<sub>50</sub></b>	Mittlere inhibitorische Konzentration
<b>IFIT2, IFIT3, IFIT4</b>	Interferon induced gene with tetratricopeptide repeats 2, -3, -4
<b>IFN, IFN-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\beta</math>, IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon, - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$
<b>IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10</b>	Interleukin 1, -2, -6, -8, -10
<b>IPMN</b>	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
<b>IRF-1, IRF-9, IRF-3</b>	IFN regulatory factor 1, -9, -3
<b>ISG, ISG2, ISG60</b>	IFN stimulated gene, -2, -60
<b>ISGF3</b>	Interferon-stimulated gene factor 3
<b>ISRE</b>	Interferon stimulated response element
<b>IU</b>	International Unit
<b>JAB1</b>	Jun activation-domain binding protein 1
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>k-ras</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
<b>LacZ</b>	E. coli-Gen, kodiert $\beta$ -Galaktosidase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>M</b>	Molar, Mol
<b>mA</b>	Milliamper
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MAVS</b>	Mitochondrialer antiviraler Signalkomplex
<b>MCN</b>	Muzinös-zystische Neoplasien
<b>mg</b>	Milligramm
<b>mM</b>	Millimolar, Millimol
<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>MOPS</b>	3-(n-Morpholino-)propansulfonsäure
<b>M-Phase</b>	Mitose

<b>NEAA</b>	nicht essentielle Aminosäuren
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor κB
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>nm</b>	Nanometer
<b>N-terminal</b>	Aminoterminal
<b>p16, p21, p27</b>	Inhibitoren zyklinabhängiger Kinasen
<b>p53</b>	Tumorsuppressor
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PanIN</b>	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>pH</b>	pondus Hydrogenii
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PKCδ</b>	Proteinkinase C δ
<b>PRRS</b>	Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>R0/R1 Resektion</b>	Resektion ohne mikroskopisch (R0) oder makroskopisch (R1) erkennbare Reste
<b>Rev</b>	Reverse
<b>RIG-G</b>	Retinoic acid-induced gene-G
<b>RKI</b>	Robert-Koch-Institut
<b>RNA, mRNA, rRNA, shRNA</b>	Ribonukleinsäure, messenger RNA, ribosomale RNA, small hairpin RNA
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
<b>s</b>	Sekunde
<b>s.</b>	siehe
<b>s.c.</b>	subkutan
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
<b>Smad3</b>	Signaltransduktionsprotein
<b>Sox9</b>	sex determining region Y-box 9
<b>Src</b>	Tyrosinkinase
<b>STAT1, STAT3</b>	Signal transducer and activator of transcription 1, -3
<b>T</b>	Thymin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBK1</b>	TNFR-associated factor family member-associated NF-κB activator-binding kinase 1

<b>TBS</b>	Tris buffered saline
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>Tet</b>	Tetrazyklin
<b>TGF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\alpha$ , - $\beta$
<b>Th1, Th2, Th17</b>	T-Helferzellen 1, -2, -17
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TPR</b>	Tetratricopeptide repeats
<b>T<sub>reg</sub>-Zelle</b>	Regulatorische T-Zelle
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TTBS</b>	TBS und Tween 20
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF/ VPF</b>	Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>Wnt</b>	Wingless-Int
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogramm
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Karl-Walter Jauch, ehem. Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, jetzt Ärztlicher Direktor des Klinikums Großhadern und Herrn Prof. Dr. med. Jens Werner, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Großhadern dafür danken, dass ich diese Arbeit in ihrer Klinik anfertigen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns. Ich möchte ich für die Aufnahme als Doktorandin in Ihre Arbeitsgruppe und für das Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit danken. Sie hat meine Arbeit stets unterstützt und mir auch die Möglichkeit gegeben, meine Ergebnisse auf Kongressen zu präsentieren. Die Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe war eine sehr lehrreiche Zeit und eine große Bereicherung für mich.

Meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Peter Camaj danke ich für seine Unterstützung während der Durchführung der Experimente, sowie für die fachlichen Gespräche und Diskussionen.

Ein großer Dank geht auch an alle Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. Yue Zhao, Frau Dr. Bettina Schwarz, Herrn Dr. Hanno Nieß und Frau Dr. Andrea Renner. Vielen Dank auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeiter\*innen der chirurgischen Forschung für die wertvolle fachliche Unterstützung und die gemeinsame Zeit im Labor.

Für die Vermittlung des Kontakts zu Frau Prof. Dr. med. C. J. Bruns möchte ich Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf danken.

Außerdem danke ich allen meinen Freunden, die mich während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Vor allem danke ich auch meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.