

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Julia Mayerle

**Epigenetische Reprogrammierung von  
Pankreaskarzinomzellen zur Aufhebung der  
molekularen Heterogenität**

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

vorgelegt von  
Anna Maria Denz, geb. Kirmayr

aus  
Rosenheim

Jahr  
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Ivonne Regel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ralph A. W. Rupp Prof. Dr. Robert Schneider
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	07.11.2024

Teile der Daten wurden für folgende Publikation verwendet:

Zhou, Q., Pichlmeier, S., Denz, A. M., Schreiner, N., Straub, T., Benitz, S., Wolff, J., Fahr, L., Del Socorro Escobar Lopez, M., Kleeff, J., Mayerle, J., Mahajan, U. M., & Regel, I. (2024). *Altered histone acetylation patterns in pancreatic cancer cell lines induce subtype-specific transcriptomic and phenotypical changes*. *International journal of oncology*, 64(3), 26. <https://doi.org/10.3892/ijo.2024.5614>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>16</b>
1.1. Das Pankreas.....	16
1.2. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	17
1.2.1. Therapieoptionen.....	18
1.2.1.1. Kurativer Therapieansatz.....	18
1.2.1.2. Palliativer Therapieansatz.....	20
1.2.2. Risikofaktoren .....	20
1.2.3. Tumorentstehung.....	22
1.2.4. Inter- und intratumorale Heterogenität.....	23
1.3. Epigenetik.....	25
1.3.1. DNA-Methylierung .....	26
1.3.2. Histonmodifikationen .....	27
1.3.3. Epigenetische Therapieansätze.....	29
1.3.3.1. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren .....	30
1.3.3.2. Histondeacetylase-Inhibitoren .....	31
1.3.3.3. Inhibitor für spezifische Histon H3K27 Methylierung.....	32
1.3.3.4. Inhibitor für Histon H3K4 Demethylierung .....	32
1.3.3.5. Inhibitor für Histon H2AK119 Ubiquitinierung.....	33
<b>2. Zielstellung</b> .....	<b>34</b>
<b>3. Material</b> .....	<b>35</b>
3.1. Chemikalien und Reagenzien .....	35
3.2. Kits.....	37
3.3. Antikörper.....	38

3.3.1.	Primäre Antikörper .....	38
3.3.1.1.	Western Blot .....	38
3.3.1.2.	Immunfluoreszenz .....	39
3.3.2.	Sekundäre Antikörper .....	40
3.3.2.1.	Western Blot .....	40
3.3.2.2.	Immunfluoreszenz .....	40
3.4.	Primer .....	40
3.5.	Zelllinien .....	42
3.6.	Epigenetische Inhibitoren und das Chemotherapeutikum Gemcitabin .....	43
3.7.	Verbrauchsmaterial .....	44
3.8.	Geräte .....	45
3.9.	Software .....	46
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>47</b>
4.1.	Zellbiologische Methoden .....	47
4.1.1.	Zellkulturbedingungen .....	47
4.1.2.	Auftauen von Zellen .....	47
4.1.3.	Passagieren von Zellen .....	47
4.1.4.	Zellzahlbestimmung .....	48
4.1.5.	Einfrieren von Zellen .....	48
4.1.6.	MTT-Test .....	48
4.1.6.1.	MTT-Test nach Behandlung von Zellen mit epigenetischen Inhibitoren und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin .....	49
4.2.	Molekularbiologische Methoden .....	50
4.2.1.	RNA-Isolation .....	50
4.2.2.	RNA-Quantifizierung .....	50
4.2.3.	cDNA-Synthese .....	51
4.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion .....	52
4.2.5.	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	52
4.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese .....	54
4.3.	Proteinbiochemische Methoden .....	54

4.3.1.	Proteinisolierung.....	54
4.3.2.	Proteinkonzentrationsmessung .....	55
4.3.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	56
4.3.4.	Western Blot Analyse.....	57
4.4.	Immunhistochemische Methoden.....	58
4.4.1.	Immunfluoreszenzfärbung.....	58
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
5.1.	Die Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms .....	60
5.1.1.	Morphologische und immunhistologische Zelleigenschaften .....	60
5.1.2.	Zellproliferation.....	61
5.1.3.	Überlebensrate nach Behandlung mit Gemcitabin .....	62
5.1.4.	Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene.....	63
5.2.	Epigenetisches Profil der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms.....	66
5.2.1.	Genexpressionsanalyse epigenetischer Remodeler .....	66
5.2.2.	Western Blot Analyse spezifischer Histonmodifikationen.....	68
5.2.3.	Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter Histonmodifikationen.....	70
5.3.	Behandlung mit epigenetischen Modulatoren .....	72
5.3.1.	Überlebensrate nach epigenetischer Behandlung .....	72
5.3.2.	Western Blot Analyse spezifischer Histonmodifikationen nach epigenetischer Behandlung.....	73
5.3.3.	Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene nach epigenetischer Behandlung .....	75
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
6.1.	Die Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms .....	77
6.2.	Das epigenetische Profil der verschiedenen Subtypen .....	79
6.3.	Gezielte Therapieansätze durch epigenetische Behandlungsmöglichkeiten .....	81
6.4.	Fazit und Ausblick.....	85
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Affidavit.....</b>	<b>102</b>

<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>105</b>

## **Zusammenfassung**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist durch begrenzte Therapiemöglichkeiten und eine hohe Letalität gekennzeichnet. Genexpressionsanalysen konnten molekulare Tumorsubtypen identifizieren, welche unterschiedlich auf vorhandene Behandlungsoptionen reagieren. Der genetische Mutationsstatus der Subtypen ist dabei sehr ähnlich, weshalb epigenetische Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung von Tumorzellcharakteristika spielen könnten. Ziel der Arbeit war es, ein epigenetisches Profil der molekularen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms zu erstellen. Zudem wurden epigenetische Therapiemöglichkeiten untersucht, welche eine Reprogrammierung der Tumorzellen zugunsten eines therapiesensibleren Phänotyps erreichen könnten.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass sowohl für den klassischen als auch den quasimesenchymalen Subtyp spezifische Gene epigenetisch reguliert werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die subtypenklassifizierenden Gene mit bestimmten Acetylierungsmustern an den Transkriptionsstartpunkten korrelieren und Gene des quasimesenchymalen Subtyps mehr von Histonacetylierungen bestimmt sind als Gene des klassischen Subtyps. Passend dazu ergab die Analyse epigenetischer Enzyme, welche für die vielfältigen Modulierungen an DNA- und Chromatinstrukturen verantwortlich sind, ein ähnliches Genexpressionsmuster innerhalb der Tumorsubtypen. Zugleich ließ sich der klassische Subtyp vom quasimesenchymalen Subtyp anhand des epigenetischen Profils unterscheiden.

Die Ergebnisse legen nahe, dass epigenetische Mechanismen Einfluss auf die Tumorzellcharakteristika der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms nehmen. Weiter galt es daher zu überprüfen, ob durch eine Behandlung mit epigenetischen Wirkstoffen eine Veränderung der Tumorzellcharakteristika erreicht werden kann. Zunächst konnte vor allem nach der Behandlung mit Vorinostat und PRT4165 ein Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen nachgewiesen werden. Das Ansprechen der Tumorzellen ausgewählter Zelllinien korrelierte dabei mit den molekularen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. In der anschließenden Expressionsanalyse verschiedener Histonmodifikationen konnte nach epigenetischer Behandlung bei den Inhibitoren Vorinostat und GSK126 eine gute Wirksamkeit beobachtet werden. In Hinblick auf die



epigenetischen Wirkstoffe PRT4165 und LSD1-Inhibitor konnte keine entsprechende Änderung der Histonmodifikationen aufgezeigt werden. Auch eine abschließende Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene ergab nach epigenetischer Behandlung keine Änderung des Genexpressionsprofils zugunsten verbesserter Tumorzellcharakteristika. Trotz der begrenzt positiven Ergebnisse hinsichtlich der epigenetischen Monotherapie mit ausgewählten Wirkstoffen sollte weiter auf den vielversprechenden Fortschritten der letzten Jahre im Bereich der Epigenetik und epigenetischer Behandlungsmöglichkeiten zur Umprogrammierung von Tumorzellen aufgebaut werden.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie des Pankreas .....	16
<b>Abbildung 2:</b> Histologie des Pankreas .....	17
<b>Abbildung 3:</b> Klassifizierung der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms .....	25
<b>Abbildung 4:</b> Veränderungen von DNA- und Chromatinstrukturen .....	26
<b>Abbildung 5:</b> DNA-Methyltransferase-Inhibitoren .....	31
<b>Abbildung 6:</b> Verschiedene Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms .....	61
<b>Abbildung 7:</b> Proliferationsrate .....	62
<b>Abbildung 8:</b> Überlebensrate nach Behandlung mit Gemcitabin .....	63
<b>Abbildung 9:</b> Von Collisson et al. publizierte Expressionsdaten ausgewählter Gene.....	63
<b>Abbildung 10:</b> Verifizierung der Expression von ausgewählten Genen in Krebszelllinien mit klassischem oder quasimesenchymalem Subtyp..	64
<b>Abbildung 11:</b> Epigenetische Modulationsmöglichkeiten an Transkriptionsstartpunkten ausgewählter Gene .....	65
<b>Abbildung 12:</b> Analyse von Acetylierungsmustern an Transkriptionsstartpunkten ausgewählter Gene .....	66
<b>Abbildung 13:</b> Epigenetisches Profil der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms .....	68
<b>Abbildung 14:</b> Analyse verschiedener Histonmodifikationen .....	69
<b>Abbildung 15:</b> Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter Histonmodifikationen .....	70
<b>Abbildung 16:</b> Überlebensrate nach epigenetischer Behandlung .....	73
<b>Abbildung 17:</b> Expressionsanalyse verschiedener Histonmodifikationen nach epigenetischer Behandlung .....	74
<b>Abbildung 18:</b> qPCR-Analyse nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren .....	76

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Chemikalien und Reagenzien .....	35
<b>Tabelle 2:</b> Kits .....	37
<b>Tabelle 3:</b> Primäre Antikörper Western Blot .....	38
<b>Tabelle 4:</b> Primäre Antikörper Immunfluoreszenz .....	39
<b>Tabelle 5:</b> Sekundäre Antikörper Western Blot .....	40
<b>Tabelle 6:</b> Sekundäre Antikörper Immunfluoreszenz .....	40
<b>Tabelle 7:</b> Primer .....	40
<b>Tabelle 8:</b> Zelllinien .....	42
<b>Tabelle 9:</b> Epigenetische Inhibitoren und das Chemotherapeutikum Gemcitabin .....	43
<b>Tabelle 10:</b> Verbrauchsmaterial .....	44
<b>Tabelle 11:</b> Geräte .....	45
<b>Tabelle 12:</b> Software .....	46
<b>Tabelle 13:</b> Zellkulturmedien .....	47
<b>Tabelle 14:</b> Den Zelllinien entsprechende Zellzahl zur Durchführung eines MTT-Tests und Bestimmung der Überlebensrate .....	49
<b>Tabelle 15:</b> Behandlungskonzentrationen ausgewählter Wirkstoffe zur Erstellung von Überlebenskurven mittels MTT-Test .....	49
<b>Tabelle 16:</b> cDNA-Synthese-Ansatz .....	51
<b>Tabelle 17:</b> PCR-Reaktionsansatz .....	52
<b>Tabelle 18:</b> PCR-Programm .....	52
<b>Tabelle 19:</b> qRT-PCR-Ansatz .....	53
<b>Tabelle 20:</b> qRT-PCR-Programm .....	53
<b>Tabelle 21:</b> Proteinisolation aus einer T-75 Zellkulturflasche .....	55
<b>Tabelle 22:</b> Proteinisolation aus einer 6-Well Zellkulturplatte .....	55
<b>Tabelle 23:</b> Zusammensetzung der Gele für die Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Ac	Acetylierung
ADEX	Aberrantly differentiated endocrine exocrine
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BET	Bromodomain and extra-terminal domain
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CBP	cAMP response element-/ E1A Bindeprotein
CBX4	Chromobox homolog 4
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHD	Chromodomänen-Helikase-DNA-bindend
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
Ct-Wert	Cycle-threshold-Wert
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dd	Doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	Embryonic ectoderm development
EGCG	Epigallocatechingallat

EPCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FBS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOLFIRINOX	Oxaliplatin, Irinotecan, Leucovorin und Fluoruracil
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GNAT	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase
h	Human
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histondeacetylasen
HRP	Meerrettichperoxidase
INO80	Inositol requiring 80
IPMN	Papillär-muzinöse Neoplasie
ISWI	Imitation switch
KDM	Histondemethylase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LSD	Lysin-spezifische Demethylase
Lys	Lysin
M	Molare Masse
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
Me	Methylierung
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MYST	Moz, Ybf2, Sas2, Tip60
n	Größe der Stichprobe
N	Newton
nab-Paclitaxel	Nanopartikel-Albumin-gebundenes Paclitaxel
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

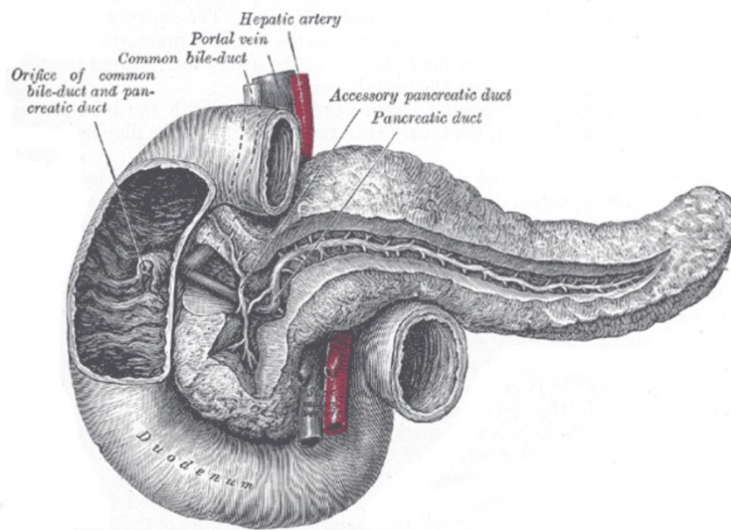
nM	Nanomolar
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PH1	Polyhomeotic homolog 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRT4165	2-Pyridine-3-yl-methylene-indan-1,3-dione
PSA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion
RbAp46/48	Retinoblastoma (Rb)-associated protein 46/48
RG108	N-Phthalyl-L-tryptophan
RING1B	Ring Finger Protein 2
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SMAD	Sma- und mad-verwandtes Protein
SUZ12	Suppressor of zeste 12
SWI/SNF	Switching defective/sucrose nonfermenting
TBP	TATA-Bindeprotein
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TP53	Tumor Protein p53
U	Atomare Masseneinheit
Ub	Ubiquitinierung
UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VIM	Vimentin
x g	Erdbeschleunigung

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Pankreas

Das Pankreas ist ein quer im Oberbauch verlaufendes Organ des menschlichen Körpers. Es wird in Caput, Corpus und Cauda unterteilt und zeigt eine enge Lagebeziehung zum Duodenum (Abbildung 1) (Schünke et al., 2018).



**Abbildung 1: Anatomie des Pankreas.** Makroskopische Anatomie des Pankreas. Der Kopf des Pankreas wird von der duodenalen C-Schlinge ummantelt. Der Ductus pancreaticus mündet nach der Vereinigung mit dem Ductus choledochus auf der Papilla duodeni major im Duodenum. Graphik entnommen aus (Gray, 1918).

Als größte Drüse des Körpers übernimmt das Pankreas wichtige Funktionen im exokrinen und endokrinen System (Bardeesy & DePinho, 2002). Morphologisch ist der exokrine Teil des Pankreasgewebes durch Drüsenazini aufgebaut, die in Verbindung mit dem Pankreasgangsystem stehen (Abbildung 2) (Bardeesy & DePinho, 2002). In den Azinuszellen des exokrinen Kompartments wird ein Pankreassekret produziert, welches wichtige Verdauungsenzyme wie Proteasen, Glykosidasen, Lipasen und Nukleasen enthält. Um eine Autodigestion der Bauchspeicheldrüse zu vermeiden, werden die Enzyme als Proenzyme synthetisiert und sezerniert. Erst im Lumen des Duodenums werden sie aktiviert (Pandol, 2011; Aumüller et al., 2020). Der Ductus pancreaticus verläuft durch das Pankreas und leitet das Sekret von den Azinuszellen in das Duodenum (Bardeesy & DePinho, 2002; Schünke et al., 2018). Das endokrine Kompartiment besteht



aus den Langerhans-Inseln, die nur einen kleinen Teil des gesamten Pankreasgewebes ausmachen. Sie setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen und steuern durch Abgabe von Hormonen vor allem den Blutzuckerspiegel. Beta-Zellen der Langerhans-Inseln produzieren Insulin und senken dadurch den Glukosespiegel. In den Alpha-Zellen wird Glukagon gebildet, welches eine Steigerung des Blutzuckerspiegels bewirkt (Aumüller et al., 2020; Dubois, 1999).



**Abbildung 2: Histologie des Pankreas.** Drüsenazinus des exokrinen Pankreas. Die Azini des Pankreas werden durch kreisförmig angeordnete Azinuszellen gebildet. Die dort produzierten Enzyme werden in das zentrale Lumen sezerniert und durch das Pankreasgangsystem weitergeleitet. Dieses wird durch flache Epithelzellen begrenzt. Gangepithelzellen, die bis in den Azinus hineinreichen, werden als zentroazinäre Zellen bezeichnet. Graphik entnommen aus (Aumüller et al., 2020).

## 1.2. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Etwa 3,5 - 4 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland sind im Pankreas lokalisiert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei zwischen 70 – 80 Jahren (Robert Koch-Institut, 2019). Klinische Symptome wie Oberbauchschmerzen, Ikterus, unspezifische Rückenschmerzen, Erbrechen, neu aufgetretener Diabetes mellitus oder ungeklärter Gewichtsverlust können Hinweise auf ein Tumorgeschehen im Pankreas sein (Luchini et al., 2016; Holly et al., 2004). Diagnostisch reihen sich dem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom verschiedene Untersuchungen an. Im Gegensatz zur Verlaufsdagnostik sind bislang noch keine spezifischen Tumormarker zur Diagnosestellung bekannt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Die Diagnose der Erkrankung erfolgt häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium, viele der Patienten weisen dort bereits Metastasen auf (Singhi et al., 2019; Siegel et al., 2021). Anhand

sonographischer, endosonographischer und radiologischer Bildgebung wird eine Stadieneinteilung getroffen und die Tumorausbreitung beurteilt. Im Anschluss daran werden die Behandlungsoptionen festgelegt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Begrenzte Therapiemöglichkeiten und das Auftreten von meist unspezifischen Symptomen in einem späten Tumorstadium bedingen eine hohe Letalität der Erkrankung (Bardeesy & DePinho, 2002). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt lediglich bei 9 %. Insgesamt gesehen ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Todesursache aller Krebssterbefälle in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2019).

### **1.2.1. Therapieoptionen**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist aufgrund von Therapieresistenzen und häufig auftretenden Rezidiven nur schwer therapierbar (Chakraborty & Singh, 2013). Hinzu kommt die meist sehr späte klinische Manifestation. Eine kurative Heilung kann in fortgeschrittenen Tumorstadien nicht mehr gewährleistet werden. Therapeutisch lässt sich ein kurativer Behandlungsansatz von einem palliativen Verfahren unterscheiden. Eine kurative Therapiemöglichkeit setzt eine chirurgisch vollständige Entfernung des Tumorgewebes voraus (Doi et al., 2008). Bei nicht resektablen Karzinomen des Pankreas ist hingegen meist eine palliative Chemotherapie zur Verbesserung der Lebensqualität und Verlängerung der Lebenszeit indiziert (Yip et al., 2006; Seufferlein et al., 2013).

#### **1.2.1.1. Kurativer Therapieansatz**

Die Resektabilität eines Tumors ist abhängig von der lokalen und metastatischen Ausbreitung, Gefäß- und Organinfiltration, sowie der chirurgischen Umsetzbarkeit (Seufferlein et al., 2013; Takaori et al., 2016). Darüber hinaus spielen häufig Komorbiditäten der Patienten eine entscheidende Rolle und können unter Umständen die Resektion des Tumors im Rahmen eines großen operativen Eingriffes verhindern (American College of Physicians, 1997; Seufferlein et al., 2013). Ist ein Tumor resektabel, stellt der chirurgische Eingriff die einzig potenziell kurative Behandlungsmöglichkeit dar (Shrikhande et al., 2006). Einen signifikanten Einfluss auf das Überleben haben zudem Faktoren wie der Tumordurchmesser, der Resektionsstatus, der Lymphknotenstatus und das histologische Grading (Winter et al., 2006). Ein

multimodales Therapiekonzept soll die erhöhte Rezidivrate nach Resektion eines Tumors verringern (Hishinuma et al., 2006; Seufferlein et al., 2013). Es wird deshalb empfohlen, innerhalb von 12 Wochen nach durchgeführter Operation eine adjuvante Chemotherapie zu beginnen. Das krankheitsfreie Überleben kann dadurch signifikant verbessert werden (Valle et al., 2014; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Häufig jedoch führen postoperative Komplikationen oder schwerwiegende Komorbiditäten dazu, dass eine Chemotherapie im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff nicht durchgeführt werden kann. Zudem kommt es bei vielen Patienten im Verlauf, aufgrund von Chemotherapie-induzierten Nebenwirkungen, zu einem Abbruch der adjuvanten Therapie (Chikhladze et al., 2019). Um eine geeignete Behandlungswahl treffen zu können, wird der ECOG Performance Status eines Patienten berücksichtigt. Mithilfe dieser Klassifizierung wird der Allgemeinzustand des Erkrankten vor Therapiebeginn eingeschätzt (Oken et al., 1982). Bei Patienten unter 80 Jahren mit einem sehr guten oder guten Allgemeinzustand (ECOG 0-1) besteht die Möglichkeit einer modifizierten Therapie mit FOLFIRINOX (Oettle et al., 2018). Durch die Kombination von Oxaliplatin, Irinotecan, Leucovorin und Fluoruracil kann im Vergleich zu einer Gemcitabin-Monotherapie ein signifikant längeres krankheitsfreies Überleben, wie auch Gesamtüberleben erreicht werden. Das Auftreten von Nebenwirkungen ist dabei jedoch erhöht (Conroy et al., 2018). Bei Patienten mit einem ECOG-Status > 1-2 werden als Standardchemotherapeutika in der adjuvanten Behandlung des Pankreaskarzinoms die Zytostatika Gemcitabin und Capecitabin verwendet (Neoptolemos et al., 2018). Die Kombinationstherapie der beiden Chemotherapeutika erzielt im Vergleich zu einer Gemcitabin-Monotherapie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens ohne Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens. Das Therapieprotokoll sieht in beiden Fällen eine Anwendung über 6 Monate vor (Neoptolemos et al., 2017; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Bei einer Gemcitabin-Unverträglichkeit kann eine Chemotherapie mit 5-Fluoruracil/Folinsäure erwogen werden. Diese gilt prinzipiell als gleichwertig, lediglich die Nebenwirkungsrate konnte bei einer Behandlung mit Gemcitabin als günstiger eingeschätzt werden (Neoptolemos et al., 2010; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Im Rahmen von Studien ist es zudem möglich, bei grenzwertig-resektablen oder lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen eine neoadjuvante Chemotherapie durchzuführen (Versteijne et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Die Einschätzung hängt dabei von anatomischen, biologischen und konditionalen Kriterien ab (Isaji et al., 2017). Empfohlen wird eine Kombinationschemotherapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin und nab-

Paclitaxel (Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

### **1.2.1.2. Palliativer Therapieansatz**

Bei lokal fortgeschrittenen Stadien oder einer metastatischen Ausbreitung der Tumorerkrankung kann die Überlebenszeit durch eine palliative Chemotherapie verlängert werden (Yip et al., 2006). Bei ausreichend gutem Allgemeinzustand wird den Betroffenen empfohlen, direkt nach Diagnosestellung eine entsprechende Therapie zu beginnen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Patienten mit sehr gutem oder gutem Allgemeinzustand (ECOG 0-1) können von einer Chemotherapie mit FOLFIRINOX oder der Kombination aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel profitieren (Conroy et al., 2011; Goldstein et al., 2015). Für Patienten mit einem ECOG-Status  $\geq 2$  erwies sich auch hier das Zytostatikum Gemcitabin als geeignet. Es wurde lange als Standardmedikament zur Behandlung von Pankreaskarzinomen in palliativer Situation verwendet (Seufferlein et al., 2013, Sohal et al., 2018). Alternativ wird Gemcitabin mittlerweile mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib kombiniert. Durch das Verknüpfen beider Therapeutika konnte ein verlängertes Überleben erzielt werden (Moore et al., 2007). Neben der Chemotherapie beinhaltet der palliative Ansatz zudem symptomorientierte Maßnahmen wie eine adäquate Schmerztherapie, die Implantation von Stents im Rahmen einer tumorbedingten Cholestase oder auch das Einleiten einer parenteralen Ernährung bei Gewichtsabnahme und Unterernährung (Oettle et al., 2018).

### **1.2.2. Risikofaktoren**

Die Behandlungsoptionen bei einem fortgeschrittenen Tumorgeschehen im Pankreas sind begrenzt (Bardeesy & DePinho, 2002). Umso relevanter ist daher die Identifizierung von Risikogruppen. Ein gezieltes Screening von Hochrisikopatienten und zielgerichtete Diagnostik bei unspezifischen Symptomen kann eine frühere Diagnosestellung ermöglichen. Ein kurativer Therapieansatz ist dann optimalerweise noch möglich.

Ein Hauptrisikofaktor für das Auftreten eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas stellt das Rauchen dar (Iodice et al., 2008). Die Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches beeinflussen durch Entzündung, Mutation und Immunsuppression die Tumorbiologie und

begünstigen hierdurch die Karzinogenese (Zhang et al., 2017). Adipositas (Fettleibigkeit) ist als weiterer Risikofaktor bei der Entstehung eines duktales Pankreaskarzinoms zu berücksichtigen (World Cancer Research Fund, 2018). Hierbei können sowohl chronische Entzündungsreaktionen als auch erhöhte Insulinspiegel und ein veränderter Glukosemetabolismus tumorfördernd wirken (Yeo & Lowenfels, 2012). Auch starker Alkoholkonsum erhöht durch das Induzieren einer Pankreatitis das Risiko für die Entstehung eines duktales Adenokarzinoms (Tramacere et al., 2010; Genkinger et al., 2009). Bei der Pankreatitis handelt es sich um eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, die akut und chronisch verlaufen kann. Die Genese einer akuten Pankreatitis ist meist biliären oder alkoholinduzierten Ursprungs (Pandol et al., 2007). Die häufigste Ursache der chronischen Pankreatitis stellt der Alkoholabusus dar (Becker, 2014; Pandol et al., 2007). Pathophysiologisch liegt eine Schädigung des Pankreasgewebes durch die intrapankreatische Aktivierung von Verdauungsenzymen zugrunde (Mayerle et al., 2019). Wiederkehrende Entzündungsreaktionen führen zu einer zunehmenden Fibrosierung des Parenchyms mit exokriner und endokriner Pankreasinsuffizienz. Die Entstehung und Entwicklung einer Pankreatitis begünstigt zudem eine maligne Transformation der Zellen des Bauchspeicheldrüsengewebes. Betroffene Patienten weisen daher ein deutlich erhöhtes Risiko auf, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Beyer et al., 2020). Ferner konnte in bestimmten Gruppen der Bevölkerung ein erhöhtes Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas festgestellt werden. Dazu gehören vor allem Personen mit familiärer Vorbelastung, chronisch Erkrankte mit genetischer Veranlagung und Betroffene von genetischen Hochrisikosyndromen (Chhoda et al., 2019). So geht ein familiärer Hintergrund mit zwei oder mehr erkrankten Verwandten 1. Grades nachweislich mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit eines Pankreaskarzinoms einher. Es können dabei Mutationen in den Genen *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* oder auch *PALB2* zugrunde liegen (Becker et al., 2014; Yurgelun et al., 2018). Ebenso konnten Betroffene einer hereditären Pankreatitis (Mutation in *PRSSI*-Gen), Erkrankte eines Peutz-Jeghers- (Mutationen im *STK11*-Gen), FAMMM- (Mutation in *CDKN2A*-Gen) oder Lynch-Syndroms (unter anderem Mutationen in *MLH1*-, *MSH2*- und *MSH6*-Gen), sowie Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (Mutation in *APC*-Gen) der Hochrisikogruppe zugeordnet werden (Chhoda et al., 2019).

### 1.2.3. Tumorentstehung

Die Entstehung eines duktales Adenokarzinoms im Pankreas ist multifaktoriell bedingt und bis heute nicht gänzlich verstanden. Die Identifizierung von Vorläuferläsionen des duktales Adenokarzinoms stellt einen Meilenstein in der Pankreasforschung dar (Esposito et al., 2014). Klinische und histopathologische Studien beschreiben als Vorläuferläsionen des Pankreastumors insbesondere die intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) und die muzinöszystischen Neoplasien (MCN) (Hezel et al., 2006; Basturk et al., 2015). PanINs sind maximal 5 mm große epitheliale Vorläuferläsionen, welche vor allem in kleineren Pankreasgängen auftreten (Hruban et al., 2008). Sie lassen sich angelehnt an die klinische Relevanz in niedrig- und hochgradige Dysplasien unterteilen (Basturk et al., 2015). Besonders hochgradige PanIN-Läsionen weisen stark ausgeprägt dysplastische Zellveränderungen auf (Hruban et al., 2008; Hezel et al., 2006). IPMNs sind zystische Pankreasläsionen, die durch ein dysplastisches, muzinöses Epithel und eine papilläre Differenzierung gekennzeichnet sind. Je nach Beteiligung des Pankreasgangsystems können sie morphologisch in den Haupt- und Seitengangtyp eingeteilt werden (Sereni et al., 2019). Das Malignitätsrisiko variiert dabei signifikant, eine Beteiligung des Hauptganges geht häufig mit einer schlechteren Prognose einher (Tanaka et al., 2006; Esposito et al., 2014). MCNs sind zystische Pankreasläsionen, die sich durch ein charakteristisches ovarielles Stroma von den IPMNs unterscheiden (Tanaka et al., 2006). Sie treten nahezu ausschließlich bei Frauen auf und sind im Pankreaskörper oder -schwanz lokalisiert (Castellano-Megias et al. 2014; Tanaka et al., 2006). MCNs sind meist unilokulär und stehen nicht in Verbindung mit dem Pankreasgangsystem (Nicolas et al., 2019).

PanINs sind die häufigsten Vorläuferläsionen und weisen bereits genetische Mutationen auf (Hruban et al., 2008; Hezel et al., 2006). So finden sich schon früh in der Tumorentwicklung onkogene Veränderungen in dem Gen *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Mehr als 90% der invasiven Adenokarzinome des Pankreas weisen genetische *KRAS*-Veränderungen auf und nahezu alle invasiven Pankreaskarzinome inaktivieren durch genetische Mutationen oder epigenetische Mechanismen zudem das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A) (Kanda et al., 2012). In fortgeschrittenen Tumorstadien können Mutationen

in den Tumorsuppressorgenen *TP53* und *SMAD4* nachgewiesen werden (Hezel et al., 2006).

Aufgrund der histologischen Ähnlichkeit zu normalen Pankreasgangzellen ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob das Karzinom aus den dukталen Drüsenzellen oder den Azinuszellen des exokrinen Pankreasgewebes hervorgeht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Azinuszellen beim Vorliegen von onkogenen KRAS-Mutationen leichter entarten und damit wahrscheinlich vorrangig zur Tumorentstehung beitragen. Eine bedeutende Rolle spielt dabei die azinäre-dukтale Metaplasie (ADM) mit einer fortschreitenden Progression zu den genannten Vorläuferläsionen (Flowers et al., 2021; Aichler et al., 2012; Morris et al., 2010).

Das genauere Verständnis der Karzinogenese und der Progression des Tumors setzt die Grundlage für verbesserte Therapieoptionen und zielgerechtere Behandlungen (Hezel et al., 2006). Es bleibt daher das Ziel weiterer Forschung, tiefere Einblicke in die Entstehung des dukталen Adenokarzinoms im Pankreas zu gewinnen.

#### **1.2.4. Inter- und intratumorale Heterogenität**

Genomsequenzierungen und Genexpressionsanalysen von humanen Pankreastumorgeweben weisen auf eine intertumorale Heterogenität hin, die sich in prognostischer Hinsicht als relevant erweist (Collisson et al., 2011; Moffitt et al., 2015; Bailey et al., 2016). Einzelzellanalysen konnten darüber hinaus eine intratumorale Heterogenität nachweisen (Chan-Seng-Yue et al., 2020; Hwang et al., 2020).

Im Jahr 2011 konnte Collisson et al. erstmalig zeigen, dass auf molekularer Ebene verschiedene Subtypen des dukталen Pankreaskarzinoms existieren. Die Subtypen unterteilen sich in einen klassischen, einen quasimesenchymalen und einen exokrin-ähnlichen Typus (Abbildung 3). Der klassische Subtyp besitzt eine hohe Genexpression epithelialer Marker, während der quasimesenchymale Typus durch hohe Transkriptionslevel mesenchymaler Gene gekennzeichnet ist. Der exokrin-ähnliche Subtyp charakterisiert sich durch eine hohe Expression verdauungsrelevanter Gene (Collisson et al., 2011). Die verschiedenen Subtypen scheinen auch in Hinblick auf das Überleben eine Rolle zu spielen. So wird dem klassischen Subtyp die beste Prognose,

dem quasimesenchymalen Subtyp hingegen die schlechteste Überlebenswahrscheinlichkeit zugeschrieben (Grant et al., 2016). Darüber hinaus zeigt sich bei dem klassischen Subtyp ein besseres Therapieansprechen auf den Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Collisson et al., 2011). Auch Moffitt et al. beschäftigte sich im Jahr 2015 erneut mit der molekularen Einteilung des duktaalen Pankreaskarzinoms. Tumorspezifische Transkriptomprofile werden in dieser Studie in einen klassischen und basal-ähnlichen Subtypen unterteilt (Abbildung 3). Das Genexpressionsprofil des klassischen Subtypen von Moffitt et al. ähnelt dabei sehr dem beschriebenen klassischen Subtyp von Collisson et al.. Ebenso entspricht der basal-ähnliche Subtyp von Moffitt et al. dem quasimesenchymalen Subtyp von Collisson et al.. Die Genexpressionscharakteristika des exokrin-ähnlichen Subtypen scheinen ferner mit denen von normalem Pankreasgewebe zu überlappen (Moffitt et al., 2015). Auch Moffitt et al. konnte eine prognostische Relevanz der Subtypen aufzeigen. So ist der klassische Subtyp durch eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu scheint der basal-ähnliche Typus mit einer schlechteren Prognose einherzugehen (Moffitt et al., 2015). Ein Jahr später publizierte Bailey et al. eine Klassifizierung in vier Subtypen. Mit Hilfe von Genomsequenzierungen und Genexpressionsanalysen beschrieb er einen squamösen, ADEX (*aberrantly differentiated endocrine exocrine*), Pankreas-Vorläufer und immunogenen Subtypen (Abbildung 3). Die zwei Subtypen squamös und ADEX korrelieren dabei mit dem von Collisson et al. definierten quasimesenchymalen und exokrin-ähnlichen Subtypen. Der klassische Subtyp von Collisson et al. wurde in einen Pankreas-Vorläufer und immunogenen Subtypen unterteilt. Dieser charakterisiert sich durch eine hohe Genexpression immunologisch relevanter Gene (Bailey et al., 2016). Im Jahr 2020 konnte Chan-Seng-Yue et al. die bisherigen Erkenntnisse nochmals erweitern. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl der klassische-, als auch der basal-ähnliche Subtyp mindestens zwei molekulare Subcluster Typ-A und -B beinhalten (Abbildung 3). So treten klassische Tumore häufiger in frühen Erkrankungsphasen auf. Der basal-ähnliche Subtyp-A findet sich vor allem in fortgeschrittenen Stadien. Er geht mit einer hohen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit einher. Basal-ähnliche Typ-B Tumore lassen sich dagegen eher in Krankheitsstadien nachweisen, in denen eine chirurgische Resektabilität des Tumorgewebes noch gegeben ist. Die Einteilung lässt somit eine Korrelation mit unterschiedlichen Krankheitsstadien zu und zeichnet sich zudem durch eine prognostische Relevanz aus. Darüber hinaus konnte Chan-Seng-Yue et al. durch



Einzelzellanalysen darlegen, dass innerhalb eines Tumors Genexpressionssignaturen beider Subtypen existieren können (Chan-Seng-Yue et al., 2020).

Klassisch		Basal-ähnlich		Moffitt et al.
Klassisch		Exokrin-ähnlich	Quasimesenchymal	Collisson et al.
Pankreas-Vorläufer	Immunogen	ADEX	Squamös	Bailey et al.
Klassisch A	Klassisch B	Hybrid	Basal-ähnlich A    Basal-ähnlich B	Yue et al.

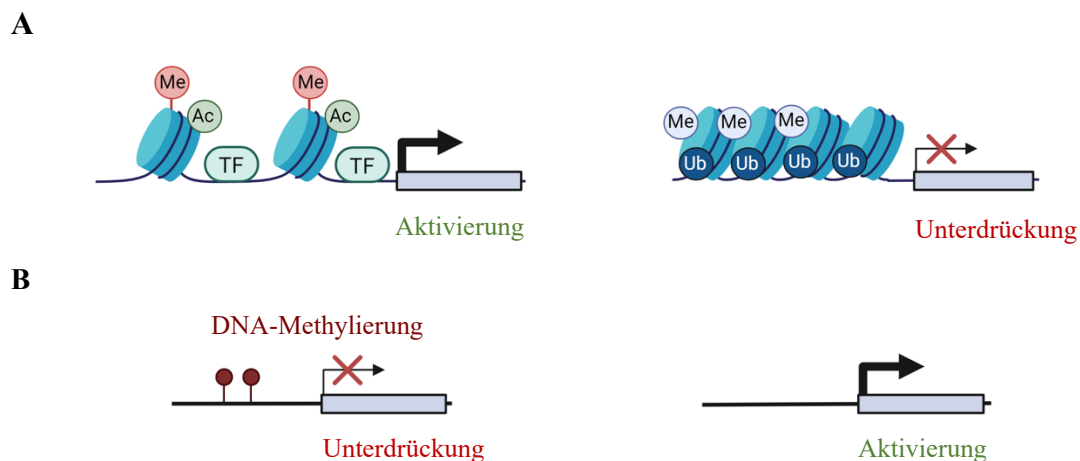
**Abbildung 3: Klassifizierung der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms.** Gegenüberstellung der Subtypen-Einteilung beschriebener Studien von (Moffitt et al., 2015), (Collisson et al., 2011), (Bailey et al., 2016) und (Yue et al., 2020).

Insgesamt gesehen zeigt sich im Hinblick auf die intertumorale Heterogenität im Wesentlichen eine molekulare Einteilung in zwei Untergruppen, einen klassischen und einen quasimesenchymalen Subtypen (Regel et al., 2020, Versemann et al., 2022). Tumore des klassischen Subtypen sprechen dabei besser auf eine Erstlinien-Chemotherapie an, als Tumore des quasimesenchymalen Subtypen. Die Klassifizierung ist zudem ein prognostischer Indikator (Aung et al., 2018). Der Mutationsstatus erweist sich innerhalb der Subtypen als sehr ähnlich. Die Tumorzelleigenschaften variieren jedoch teils deutlich. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten epigenetische Mechanismen sein (Juiz et al., 2019). Erste Studien wiesen darauf hin, dass epigenetische Modifikationen von DNA- und Chromatinstrukturen maßgeblich die Genexpression und damit die intertumorale Heterogenität und den zellulären Tumorphänotypen zugunsten von molekularen Subtypen beeinflussen (Mishra et al., 2017; Lomberk et al., 2018; Patil et al., 2020).

### 1.3. Epigenetik

Der Begriff Epigenetik beschreibt vererbare Veränderungen von DNA- und Chromatinstrukturen, welche die Genexpression beeinflussen, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Chromatin bezeichnet dabei einen makromolekularen Komplex aus DNA und Histonproteinen. Die funktionelle Grundeinheit stellt das Nukleosom dar, ein von DNA umwickeltes Histonoktamer. Chromatin kann in zwei Arten unterteilt werden, Hetero-

und Euchromatin. Während Heterochromatin aus vorwiegend inaktiven Genen besteht, enthält Euchromatin aktive Gene (Dawson & Kouzarides, 2012). Durch epigenetische Veränderungen, wie posttranslationale Modifikationen von Histonen oder die Methylierung der DNA, wird die Chromatinkonformation reguliert. Die Transkription von Zielgenen kann so aktiviert oder unterdrückt werden (Abbildung 4) (Ciernikova et al., 2020). Eine Veränderung der Chromatinstruktur wird durch Chromatin-Remodeling-Komplexe reguliert (Morrison & Shen, 2009). Diese modulieren ATP-abhängig die Histon-DNA-Kontakte und beeinflussen die Struktur und Positionierung von Nukleosomen (Dawson et al., 2012). Sie variieren damit den Zugang zu DNA-Abschnitten und regulieren gemeinsam mit histonmodifizierenden Enzymen zellbiologische Abläufe (Kouzarides, 2007).



**Abbildung 4: Veränderungen von DNA- und Chromatinstrukturen.** (A) Histone können durch Acetylierungen (Ac), Methylierungen (Me) oder Ubiquitinierungen (Ub) modifiziert werden. Die epigenetischen Veränderungen beeinflussen die Chromatinkonformation (offen oder geschlossen) und führen so zu einer Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription. (B) DNA-Methylierungen im Bereich von Promotorregionen blockieren die Genexpression. Die Demethylierung der DNA führt zu einer Reaktivierung der Transkription. Grafik generiert mit BioRender.com.

### 1.3.1. DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA ist, neben den Histonmodifikationen, der wichtigste Vertreter epigenetischer Veränderungen. Sie kann meistens an 5'-Kohlenstoffatomen von Cytosinresten innerhalb von CpG-Inseln nachgewiesen werden (Dawson, 2012). Häufig

sind diese im Bereich von Promotorregionen lokalisiert (Ciernikova et al., 2020). Für die DNA-Methylierungsmuster sind DNA Methyltransferasen (DNMT) verantwortlich, welche in zwei Gruppen unterschieden werden (Cheng et al., 2008). Die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) erhält während der Replikation die Methylierungsmuster des Elternstranges (Ciernikova et al., 2020). DNMT3a und DNMT3b werden als De-novo-DNA Methyltransferasen bezeichnet und sind vor allem während der Embryogenese und der Keimzellentwicklung von Bedeutung. Die DNA-Methylierung führt durch eine geschlossene Chromatinkonformation zu einer Stummschaltung der Genexpression (Kulis et al., 2010). Durch die epigenetische Regulierung von Zielgenen konnte so unter anderem ein Einfluss auf die Embryonalentwicklung, die genomische Prägung, die Inaktivierung von X-Chromosomen sowie die Stabilität von Chromosomen nachgewiesen werden (Robertson, 2005). Es konnte zudem gezeigt werden, dass im Rahmen maligner Transformationen häufig eine Hypermethylierung im Bereich der Promotorregionen bestimmter Tumorsuppressorgene auftritt und diese inaktiviert. Andererseits scheint jedoch auch die Hypomethylierung zu einer genomischen Instabilität zu führen und damit die Zelltransformation zu begünstigen (Kulis et al., 2010; Ciernikova et al., 2020).

### **1.3.2. Histonmodifikationen**

Histone können posttranslational modifiziert werden und regulieren damit neben der Transkription auch die Reparatur, Replikation und Rekombination der DNA (Bannister & Kouzarides, 2011). Die epigenetischen Modifikationen befinden sich vorwiegend an den N-terminalen Enden der Histone außerhalb der Nukleosomen. Verschiedene posttranslationale Histonmodifikationen können die Chromatinstruktur entscheidend beeinflussen. Histone können beispielsweise an den Aminosäuren Lysin und Arginin acetyliert, methyliert oder ubiquitiniert werden, wohingegen die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin eine Phosphorylierung aufweisen können (Kimura, 2013). Histonmodifikationen, außer Methylierungen, regulieren die Struktur von Chromatin, indem sie die Ladung der Histone verändern und internukleosomale Wechselwirkungen abwandeln. Es entstehen offene oder geschlossene Chromatinbereiche, welche den Zugang von DNA-bindenden Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, regulieren (Tan et al., 2011; Bannister & Kouzarides, 2011). Zusätzlich können Histonmodifikationen von

Proteinen mit spezifischen Domänen erkannt werden und eine Änderung der Chromatinstruktur bewirken (Jenuwein, 2001).

Mithilfe von Acetyl-CoA katalysieren Histonacetyltransferasen (HATs) den Transfer einer Acetylgruppe auf die Aminogruppe von Lysin-Seitenketten (Bannister & Kouzarides, 2011). Es ergibt sich eine Neutralisation der positiven Ladung von Lysin und damit eine abgeschwächte Wechselwirkung zwischen den Histonen und der negativ geladenen DNA. Die Folge ist eine offeneren Chromatinkonformation und eine Aktivierung der Transkription. Das Histon H3 kann insbesondere an den Lysinresten K9, K14, K18, K23 und K27 acetyliert werden (Kimura, 2013), das Histon H4 wiederum an den Positionen K5, K8, K12 und K16 (Su et al., 2016). Die Histonacetyltransferasen können anhand ihrer zellulären Lokalisation klassifiziert werden. Die Typ A Histonacetyltransferasen befinden sich überwiegend im Zellkern und können in die GNAT- (*GCN5-related N-acetyltransferase*), MYST- (benannt nach den zugehörigen Enzymen Moz, Ybf2, Sas2, Tip60) und CBP/p300-Familie (*cAMP response element-/EIA binding protein*) unterteilt werden (Dawson et al., 2012). Die Typ B Histonacetyltransferasen sind dahingegen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und acetylieren freie Histone (Sterner & Berger, 2000). So wie die Acetylierung mit einer Aktivierung der Genexpression korreliert, löst die Deacetylierung eine Unterdrückung der Transkription aus (Sterner & Berger, 2000). Verantwortlich sind hierfür Histondeacetylasen (HDACs). Die Histonacetylierung und -deacetylierung stellen damit hoch dynamische Vorgänge dar, die einen erheblichen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität verschiedener Gene haben (Ciernikova et al., 2020). Für die Methylierung von Histonen sind Histon Methyltransferasen verantwortlich, die ein, zwei oder drei Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf die Aminogruppe von Lysinresten übertragen (Zhang et al., 2011). Je nach Methylierungsgrad und -stelle kann dadurch eine Aktivierung oder eine Repression der Genexpression ausgelöst werden (Kimura, 2013). Die Methylierung von H3K4, H3K36 und H3K97 korreliert oftmals mit einer Steigerung der Transkription, eine Modifikation von H3K9, H3K27 und H4K20 bewirkt dahingegen eher eine Stummschaltung von Genen (Dawson et al., 2012). Die Methylierung von Histonen ist, wie die Acetylierung, ein reversibler Prozess (Tsukada et al., 2005). Es wurden jedoch Histondemethylasen (KDM) identifiziert, die mithilfe unterschiedlicher Mechanismen eine Abspaltung von Methylgruppen bewirken (Dawson et al., 2012). Das Enzym LSD1 (Lysin-spezifische Demethylase 1; KDM1A)

demethyliert über eine Oxidationsreaktion insbesondere das Histon H3K4 und fungiert somit als Transkriptionsrepressor (Shi et al., 2004). Jumonji C-Domäne enthaltende Demethylasen modifizieren die Histone abhängig von den Cofaktoren Eisen und  $\alpha$ -Ketoglutarat (Tsukada et al., 2005). Histondemethylasen können in sechs Untergruppen eingeteilt werden (KDM2 – 7) (Johansson et al., 2014). Die Ubiquitinierung von Histonen besteht aus einer dreiteiligen Reaktion, an der E1-aktivierende, E2-konjugierende und E3-ligierende Enzyme beteiligt sind. Als besonders relevant hat sich die Monoubiquitinierung der Histone H2A und H2B erwiesen. Während die Monoubiquitinierung an H2AK119 eine Inaktivierung der Genexpression bewirkt, aktiviert H2BK120ub1 die Transkription. Die Histonmodifikation ist, wie die Acetylierung und Methylierung, reversibel und kann durch Isopeptidasen abgespalten werden. Sie werden als deubiquitinierende Enzyme bezeichnet (Weake & Workman, 2008; Bannister & Kouzarides, 2011).

### **1.3.3. Epigenetische Therapieansätze**

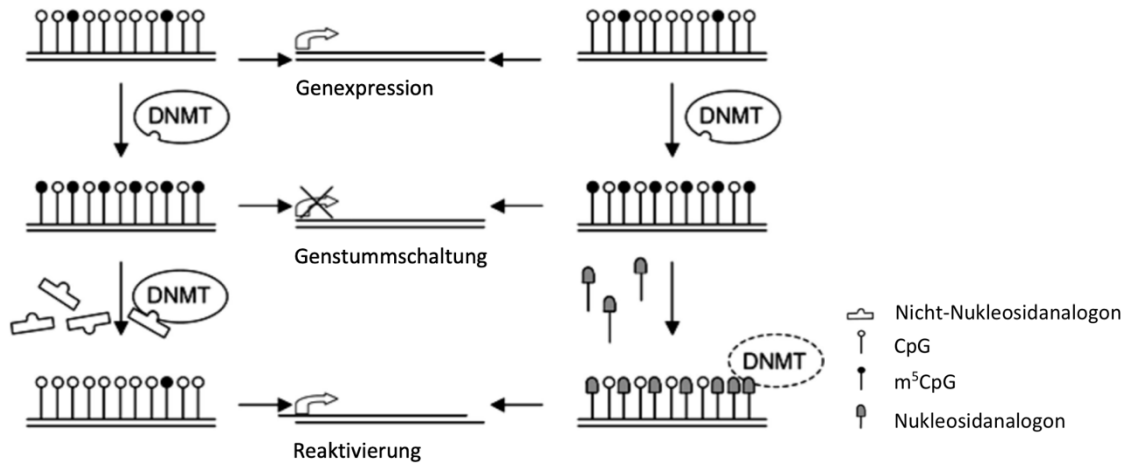
Die Therapiemöglichkeiten des dukalen Pankreaskarzinoms sind begrenzt und Resistenzen gegenüber den Standard-Chemotherapeutika erschweren die Behandlung der Patienten zusätzlich. Um das Ansprechen auf vorhandene Therapieoptionen zu verbessern, scheint der Ansatz epigenetischer Modulation vielversprechend. Das Ziel dabei ist es, die Tumorzellen durch epigenetische Medikamente zu reprogrammieren, um die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen. Epigenetische Veränderungen von DNA- und Chromatinstrukturen regulieren die Expression von Zielgenen, welche wiederum zellbiologische Abläufe beeinflussen. Indem sie wichtige Tumorsuppressorgene stummschalten, Onkogene aktivieren oder auch Differenzierungsgene inhibieren, können epigenetische Modifikationen die Tumorentstehung und -progression fördern. Tumorzellen erlangen dadurch die Fähigkeit, sich unkontrolliert zu vermehren und einen geringen Differenzierungsgrad zu erreichen (Su et al., 2016, Paradise et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass die Dedifferenzierung von Zellen ein wichtiger Schritt in der Tumorentstehung im Pankreas ist (Benitz et al., 2016; Benitz et al., 2019). Zudem ist eine niedrige Differenzierung von Krebszellen mit einer aggressiveren Tumorbiologie assoziiert (Kumar et al., 2014). Da epigenetische Veränderungen reversibel sind, bieten sie die Möglichkeit zur therapeutischen Modulation. Eine Änderung der Tumorzelleigenschaften könnte so den

Weg zu einer wirksameren Therapie erleichtern (Paradise et al., 2018). Zwei Gruppen epigenetischer Modulatoren, DNA-Methyltransferase- und Histondeacetylase-Inhibitoren, haben bei der Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen bereits Einzug in die klinische Anwendung gefunden. Die Therapieoptionen des duktales Pankreaskarzinoms konnten bislang durch epigenetische Wirkstoffe noch nicht maßgeblich erweitert werden (Ciernikova et al., 2020). Mehrere präklinische und klinische Studien konnten jedoch die Relevanz epigenetischer Therapieansätze aufzeigen und eine Veränderung des Tumorphänotypen erreichen (Hessmann et al., 2017; Paradise et al., 2018; Verseemann et al., 2022). Ein vielversprechendes Konzept könnte die Kombinationstherapie aus etablierten Chemotherapeutika und epigenetischen Wirkstoffen sein (Ciernikova et al., 2020; Verseemann et al., 2022).

### **1.3.3.1. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren**

Die Methylierung der DNA durch epigenetische Modulatoren ist reversibel und bietet dadurch einen geeigneten Ansatzpunkt für therapeutische Strategien. Die Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) unterscheiden sich in Nukleotidanaloga und Nicht-Nukleotidanaloga. Zu den Nukleotidanaloga gehören Azacitidin (*5-Azacitidin*) und Decitabin (*5-Aza-2'-Deoxycytidin*), welche Derivate des Nukleotids Cytidin darstellen (Lyko & Brown, 2005). Die Analoga werden in die DNA eingebaut, binden kovalent die DNMTs und inaktivieren diese (Abbildung 5). Die entstehende Demethylierung der DNA im Promoterbereich resultiert in einer Reaktivierung der Genexpression (Brueckner et al., 2007). Die epigenetischen DNMT-Inhibitoren sind klinisch zugelassen und finden vor allem Anwendung bei der akuten myeloischen Leukämie und dem myelodysplastischen Syndrom (Jones et al., 2019). Das Ziel weiterer Forschung ist es, DNMT-Inhibitoren mit einer erhöhten Spezifität gegenüber den verschiedenen Gruppen von Methyltransferasen zu entwickeln und die toxischen Nebenwirkungen zu verringern (Fahy et al., 2012). Zu den Nicht-Nukleotidanaloga gehören unter anderem EGCG (*Epigallocatechingallat*) und RG108 (*N-Phthalyl-L-tryptophan*). Sie binden an das aktive Zentrum der Enzyme und inhibieren somit direkt die Aktivität der DNMTs (Abbildung 5) (Lyko & Brown, 2005). Tumorzellen des duktales Pankreaskarzinoms weisen häufig eine Überexpression von DNMTs und eine damit verbundene Hypermethylierung der DNA auf. Die Expression von Zielgenen wird hierdurch unterdrückt und vor allem Tumorsuppressor- und Differenzierungsgene vermehrt stillgelegt (Esteller, 2002). Das führt zu negativen

Tumorzelleigenschaften und begünstigt die Tumorentstehung und -progression. Das Ziel geeigneter DNMT-Inhibitoren ist DNA-Methyltransferasen zu inaktivieren und somit Tumorzellcharakteristika, wie den Proliferations- oder Differenzierungsgrad, zu verändern (Lefebvre et al., 2010; Paradise et al., 2018).



**Abbildung 5: DNA-Methyltransferase-Inhibitoren.** Darstellung der unterschiedlichen Wirkmechanismen. **(Links)** Nicht-Nukleotidanaloga binden an DNA-Methyltransferasen und inhibieren diese dadurch direkt. **(Rechts)** Nukleotidanaloga werden in die DNA eingebaut und binden kovalent an DNA-Methyltransferasen. Graphik entnommen und modifiziert aus (Brueckner et al., 2007).

### 1.3.3.2. Histondeacetylase-Inhibitoren

Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDACs) blockieren häufig das katalytische Zentrum der Enzyme und erhöhen dadurch den Grad der Acetylierung von Histonen (Miranda Furtado et al., 2019). Dies führt in der Folge zu einer offeneren Chromatinkonformation und einer Aktivierung der Transkription (Kimura, 2013). Durch die Beeinflussung von Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden Genen kommt es zu einem gestörten Ablauf des Zellzyklus und einer vermehrten Apoptose der Tumorzellen (Eckschlager et al., 2017). Im Jahr 2006 wurde Vorinostat (auch SAHA (*Suberoylanilide Hydroxamic Acid*)) als erster HDAC-Inhibitor von der *Food and Drug Administration*, der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde, zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen. Drei Jahre später folgte die Zulassung für Romidepsin, im Jahr 2014 die Zulassung von Belinostat. Beide Medikamente werden, wie auch Vorinostat, bei der Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms angewendet. Ein weiterer HDAC-Inhibitor,

Panobinostat, wurde ein Jahr später für die Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom zugelassen (Ho et al., 2020). In Bezug auf das duktales Pankreaskarzinom scheint eine Überexpression von HDACs mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu korrelieren (Miyake et al., 2008; Fritsche et al., 2009). Eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren könnte die Tumorzellen für eine Standardchemotherapie sensibilisieren und den Behandlungserfolg dadurch verbessern (Meidhof et al., 2015).

#### **1.3.3.3. Inhibitor für spezifische Histon H3K27 Methylierung**

GSK126 ist ein Inhibitor für EZH2 (*Enhancer of zeste homologue 2*), welcher die Proliferation, Angiogenese und Apoptose von Tumoren beeinflusst (Paradise et al., 2018). EZH2 ist eine Untereinheit des Proteinkomplexes PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*), der die Komponenten EED (*Embryonic ectoderm development*), SUZ12 (*Suppressor of zeste 12*) und RbAp46/48 (*Retinoblastoma (Rb)-associated protein 46/48*) beinhaltet. Der Proteinkomplex katalysiert die Methylierung von H3K27 und indiziert somit eine Repression verschiedener Gene. Es konnte gezeigt werden, dass EZH2 einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung des Tumorgeschehens hat (Kim et al., 2016). Im duktales Pankreaskarzinoms kann häufig eine Überexpression von EZH2 nachgewiesen werden. Durch eine verringerte Transkription von EZH2 können mitunter Differenzierungsgene wieder aktiviert werden (Lee et al., 2006; Van Vlerken et al., 2013). Im Januar 2020 wurde in den USA der EZH2-Inhibitor Tazemetostat zur Behandlung eines lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Epitheloidsarkoms bei Erwachsenen und Jugendlichen ab 16 Jahren zugelassen. Tazemetostat verringert die Methylierung von H3K27 und wirkt wachstumshemmend auf Tumorzellen (Hoy, 2020).

#### **1.3.3.4. Inhibitor für Histon H3K4 Demethylierung**

Das Enzym LSD1 (*Lysin-spezifische Demethylase*; KDM1A) gehört zu den Histon Demethylasen und bewirkt insbesondere durch die Abspaltung von Methylgruppen an H3K4 eine verringerte Transkription (Dawson et al., 2012). Im Rahmen verschiedener Krebserkrankungen kann oftmals eine Überexpression von LSD1 nachgewiesen werden. Dies bewirkt eine erhöhte Proliferation von Tumorzellen und eine Stummschaltung von Differenzierungsgenen (Qin et al., 2014; Roth et al., 2017). Das Ziel von LSD1-



Inhibitoren ist es, eine Differenzierung in Krebszellen zu induzieren und somit ein verbessertes Ansprechen auf verschiedene Therapieformen zu erreichen (Willenbrock et al., 2019).

#### **1.3.3.5. Inhibitor für Histon H2AK119 Ubiquitinierung**

PRT4165 (*2-Pyridine-3-yl-methylene-indan-1,3-dione*) ist ein Inhibitor der PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*)-vermittelten Ubiquitinierung von Histon H2A (Ismail et al., 2013). PRC1 bezeichnet dabei einen Proteinkomplex, der sich zum Beispiel aus den Untereinheiten RING1B (*ring finger protein 2*), BMI1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*), PH1 (*polyhomeotic homolog 1*) und CBX4 (*chromobox homolog 4*) zusammensetzt (Simon & Kingston, 2009). Im Rahmen des dukalen Pankreaskarzinoms konnte eine Überexpression von unter anderem RING1B und BMI1 nachgewiesen werden (Martínez-Romero et al., 2009). Durch verschiedene Mechanismen scheinen die einzelnen Komponenten von PRC1 zur Tumorentstehung und -progression beizutragen. So konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von Bmi1 mit einer erhöhten Proliferation und Invasion von Tumorzellen sowie einer reduzierten Zelldifferenzierung assoziiert ist (Rodolosse et al., 2004; Martínez-Romero et al., 2009; Grenzda et al., 2011). Auch durch die Ring1b-katalysierte Ubiquitinierung von H2AK119 werden unter anderem Differenzierungsgene epigenetisch ausgeschaltet. Insbesondere Gene, die in pankreatischen Azinuszellen exprimiert sind, werden bei der Pankreaskarzinogenese über H2AK119ub inhibiert und somit die Tumorentstehung und -progression vorangetrieben (Benitz et al., 2016; Benitz et al., 2019).

## 2. Zielstellung

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die molekularen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms - definiert als intertumorale Heterogenität - ein unterschiedliches Therapieansprechen aufweisen. Basierend auf Genexpressionsanalysen gruppieren sich die Subtypen in einen klassischen und einen quasimesenchymalen Typ. Den aggressivsten Verlauf zeigt der quasimesenchymale Subtyp, die klassischen Subtypen weisen dagegen ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie auf. Da der genetische Mutationsstatus in den Subtypen sehr ähnlich ist, könnten epigenetische Mechanismen für die differierenden Tumorzellcharakteristika verantwortlich sein. In der Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung von epigenetischen Enzymen eine Veränderung der Genexpression verursacht, wodurch die Entstehung von verschiedenen Subtypen hervorgerufen wird. Ziel der Arbeit ist es, epigenetische Profile der unterschiedlichen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms zu erstellen und mögliche epigenetische Behandlungen zu untersuchen, die zu einer Reprogrammierung der Subtypen führen könnten. Ebenfalls soll ermittelt werden, ob auch eine übergreifende epigenetische Reprogrammierung von Pankreastumorzellen unabhängig von der intertumorale Heterogenität erreicht werden kann. Dabei wird evaluiert, ob nach epigenetischer Behandlung verschiedene oder ähnliche Tumorzellphänotypen auftreten. Hierfür werden in der Arbeit humane Pankreastumorzelllinien verwendet, welche die unterschiedlichen Subtypen repräsentieren. Sie werden mit verschiedenen epigenetischen Inhibitoren behandelt, welche die Histonacetylierung, -methylierung und -ubiquitinierung beeinflussen.

### 3. Material

#### 3.1. Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
2-Propanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose SERVA für DNA Elektrophorese	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Neufahrn, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - hoher Glukoseanteil	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eindeckmedium für Immunfluoreszenzfärbungen	Agilent, Santa Clara, USA
Eserserum 100 ml unsteril	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure 100 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	SAV LP, Flintsbach, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

FastStart Essential DNA Green Master	Roche, Basel, Schweiz
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Kollagenase P	Roche, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid Pellets	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Plus vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce™ Phosphatase-Inhibitor Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Protease-Inhibitor Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ReadyMix™ REDTaq® PCR Reaktionsmischung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (1X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Rotiphorese® NF-Acrylamid / Bis-Lösung 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBR™ Safe DNA-Gel-Färbemittel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Hydrochlorid PUFFERAN® (Tris- HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Base PUFFERAN®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA Lösung (10X)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsininhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien**

### 3.2. Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy® Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RevertAid Erststrang-cDNA-Synthesekit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Femto Substrat mit maximaler Empfindlichkeit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SpectraDrop™ Mikrovolumen Starter Kit	Molecular Devices, San José, USA

Verso cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
-------------------------	--

**Tabelle 2: Kits**

### 3.3. Antikörper

#### 3.3.1. Primäre Antikörper

##### 3.3.1.1. Western Blot

Antikörper	Applikation	Hersteller
Acetyl-Histone H3 (Lys14) (D4B9) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Acetyl-Histone H3 (Lys27) (D5E4) XP® Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) Maus-IgG-Antikörper	1 : 4000, 5 % Milch / TBS-T	Meridian Life Science Inc., Memphis, USA
Histone H3 (D1H2) XP® Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % Milch / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Tri-Methyl Histone H3 (Lys27) (C36B11) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Tri-Methyl Histone H3 (Lys36) (D5A7) XP® Kaninchen-IgG- Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Tri-Methyl Histone H3 (Lys9) (D4W1U) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 1000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Ubiquityl-Histone H2A (Lys119) (D27C4) XP® Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 5000, 5 % BSA / TBS-T	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

**Tabelle 3: Primäre Antikörper Western Blot**

### 3.3.1.2. Immunfluoreszenz

Antikörper	Applikation	Hersteller
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EPCAM) Maus-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Tri-Methyl Histone H3 (Lys27) (C36B11) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Ubiquityl-Histone H2A (Lys119) (D27C4) XP® Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Vimentin (D21H3) XP® Kaninchen-IgG-Antikörper	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

**Tabelle 4: Primäre Antikörper Immunfluoreszenz**

### 3.3.2. Sekundäre Antikörper

#### 3.3.2.1. Western Blot

Antikörper	Host	Applikation	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	Esel	1 : 5000, 1 % Milch / TBS-T	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	Schaf	1 : 4000, 1 % Milch / TBS-T	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper Western Blot

#### 3.3.2.2. Immunfluoreszenz

Antikörper	Host	Applikation	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG, FITC-konjugiert	Esel	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Anti-Maus-IgG, Cy3-konjugiert	Schaf	1 : 200 1 % BSA / 0,1 % Triton-X / PBS	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper Immunfluoreszenz

### 3.4. Primer

Alle entworfenen Primer wurden bei Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bestellt (25N, entsalzt).

Primer	Vorwärtssequenz 5' → 3'	Rückwärtssequenz 3' → 5'	Ampli- fikat (bp)
h-ACTL6A	AACTCCTCCAAGTATGCGGTT	AAAGAGGCTAGAATGGAGCCG	96
h-ARID1A	ACAATGAAAGACATTGGAACCCCG	ATCTAATGCCCATGTGCTCTCTG	90
h-ARID1B	ATGCAGAAGGTCATGCCAC	CCACGCCTCAGGAGTAACGAT	174
h-ATF2	TGCAGTCCCACTCGTTTCG	ACCAATCCGCTACCATGACC	177
h-BMI1	ACCAGAACAGATTGGATCGGAA	ATTGCTGCTGGGCATCGTAA	94
h-BRD2	CAGGGAGCCCTCTTACGTG	GGCTTCTTAATGGTGTAGGGCT	147



h-BRD4	TCCCCGCTTATGATACATTCCC	ACGAGCTCCTGTTTCTTAGG	102
h-BRD8	GGCTACCTCTGGGGTCAATG	GGGGAGGCTGCAACAGTATT	147
h-CBX3	AGAGATGCTGCTGACAAACCA	GCACCAAGTCTGCCTCATCT	133
h-CBX4	AGGCTGGTCGCCCAAATATAA	TTCGGCCCTCTCTCCGATA	126
h-CBX5	GTCTTTCAGGTGGAACGGTGT	ATTGTGCTCCTCAGAAAAGCCT	173
h-CBX7	CGTGCGGAAGGGTAAAGTCG	TCTCTCCTCCTTCTCCTCGTAG	132
h-CHD3	CGTCCTGCACAAGGTTCTGA	CTGCGCTCGGACATCTGAAG	129
h-CHD4	TGGCGGAAAGTCATCAGCAC	TTCTTCCAGCTGTTTCAGAAGTTT	95
h-CREBBP	GTACCATTCTCGCGATGCT	ATCAACGAAAGGTTCCGGGGT	191
h-DNMT1	GTGGAAGCCGGCAAAGC	TCCCACTCGAGCCTTCCATA	125
h-DNMT3A	CTCGCGATTCTCGAGTCCA	ATACCGGGAAGGTTACCCCA	96
h-DNMT3B	CTACCCGGGATGAACAGGATCT	AGTAGTCCTTCAGAGGGGGCG	145
h-EED	TGTGAAAATGCCATTGTGTGCT	CCAATGCAAGCATCTTTTGCCAG	169
h-EHMT1	CTCGACTCGGAAAAACCCAAG	GAGCGCTTATTCTGGTGCTC	146
h-EP300	TGGCAGAAAGTTGGAGTTCTCTC	AAGAAACGCTCTCCCTTGG	152
h-EZH1	GCGTGGACTTAAGAAGCACC	TCATAGACCTTCCGCGTCG	156
h-EZH2	TTGCTGGCACCATCTGACG	CCACCACAAAATCATTGTTCAAGTT	184
h-HAT1	GGAAATGGCGGGATTGGTG	ATCCCCAAAGAGTTGATGGGT	190
h-HDAC1	GCCTTCTACACCACGGACC	TTGGACATGACCCGGCTTGAAA	185
h-HDAC2	GAGGTGGCTACACAATCCGT	TCATTATATGGCAACTCATTGGGA	97
h-HDAC3	TGGACTTCTACCAACCCACG	ATTCAACGCATTCCCCATGC	114
h-HMG20A	TGAGGAAAAACAGCGCTACCT	CGGGCTGCATCTTGCCATAG	156
h-INO80	CTCGGCTCAAGTCTCAAGGG	TCCTGTAAACCATGTATCCTCCA	90
h-KAT2A	AGCAGAAAGAGATCATCAAGAAGC	TCTCTCGAATGCCAGGAACG	132
h-KAT2B	CCACGGATCCCGTACACAG	GGTTTCCAGCCTGTCTCTAAT	185
h-KAT5	CAACCACCGCTCAACGAAAC	TCGATTTTCGCTTCCGTCTT	146
h-KDM1A	GAATACCCGCTCCACGAGTC	ATCAAAACACAACACCACCTTGT	187
h-KDM2B	ACTGTAACCACGTCACCGAC	ACCTTATTGCAGTCAGACAGGT	103
h-KDM3A	GGAGCTCCACATCAGGTTCA	CCTGAGTAAGCCAGAAGCAGT	100
h-KDM3A	GGAGCTCCACATCAGGTTCA	CCTGAGTAAGCCAGAAGCAGT	100
h-KDM4A	AGCAAGCATAAGAACGGGCG	GAGACAGTCCTGGCTCACTATGT	138
h-KDM5A	TTTTAACCGGGTGGTGAGCAG	CTGTGTCCTTCATGTCGTAGCC	122
h-KDM6A	TCCTAATGGGTTCTTGGTGGC	GCCAATTTATACTGGCAGGCTGT	193
h-KDM6B	CCCCTACCGCCTATCAGTA	TCTTGAACAAGTCGGGGTCG	145
h-KDM7A	TGGAATGTGGATACCATGTCAAG	CGCTGCTGTCCACATAATTCC	183
h-KMT1A	TGTCAACCACAGTTGTGACCC	TGTGGCAAAGAAAGCGATGC	94
h-KMT2A	CTCGGAGGGCAACTAGCAT	GATGGGAGACCTGTAGACACCA	98
h-KMT2D	ACAACGTGTACCTGGCTCG	TGTAGATGCCTCGATTCTGCTC	165
h-KMT5B	TGGAAAGAGTGGGGAACAGATTTA	AGAAAATAGTGCCGTGCCAT	145
h-MBD3	TTTACTATAGCCCGAGCGGGAA	CTGGCGGCTCTTGTTCATCT	137
h-MBD4	GGTCTCTACGATCTTCGGGC	TCTTCAGGGTGCACCAATCC	108
h-MECP2	CCGGGGACCCATGTATGATG	GGCTTTCCCTGGGGATTGA	124

h-PCGF1	GCCTTTAAGATGGCGTCTCCTC	ACTCGAACCTCCTCCTCGTTC	116
h-PCGF2	AGGGGGCTCTGAGTGATGAT	CGCACCCCTGTTTTCTCTTTG	127
h-PCGF6	AGTACATCAGACACAACCTCTTT	GCTGTGGAACAGCAGGTTTA	161
h-PHC1	CGGCCCCAGATAGCTCAAAT	AATTGTGGCCTGCTGGACG	168
h-PHC2	GGCTTGTGCAAAGAGGTACAAC	GTAACCGAAAGGGGCACAGT	186
h-PRMT5	GACCTCCACGAGCGGAATG	TGCAGAGGAAATCAAACCCCT	92
h-RBBP4	AGAAGATGCAGAAGACGGGC	TCTCTGCCATTTGCCACACT	152
h-RBBP7	TCTGCGGATAAGACCGTAGC	GGCGGTGAGTACCAGTTGAA	145
h-RING1A	CGTTCACGACGTTGAATGGC	ACAGGGATACCCATGGTCC	157
h-RING1B	ACAGGCCATGAACAGACTGC	TGCAGTGTGAACTGTCACCA	89
h-RTF1	CAGCTGTCAAGCTGCCATC	TGCCTTGACCCTTGCTCATT	96
h-RUVBL2	CGGTCCGGCAGTCCTTATTG	CCGTCTCCTCCTTGATGCGA	200
h-SETD1A	CTGACGAGATGGTCATCGAA	TGCAGCAGTGGTTGATGAAT	180
h-SETD1B	CAAGTTCAACCAGCTCAAGTTCC	TAACGCTTCTCCCGCATGTC	168
h-SETD2	GATGGACCTGGGAACTCCAAC	GACGATGAACTGGGACATCTCTTTT	142
h-SETDB1	AAAGAGGACACTGACGACCGA	CAGGACATCATCAGGGTTGGAC	177
h-SETDB2	CGGCCGCTTCCTTAATCATAG	CCTGTTGGTGAAGAATGCCAC	106
h-SIRT1	GGCGGCTTGATGGTAATCAG	TGGCATGTCCCACTATCACTG	139
h-SIRT2	CGCTAAGCTGGATGAAAGAGAAGA	CTGGGAGGCTCTCACCAAAAA	108
h-SMARCA2	ACAAAGATAGGTGTAACGTGGAGA	AGACTTCACTGAGCTGTCCG	90
h-SMARCA4	ACTACGAGCTCATCCGCAAG	GGAGTCTTCATAGATCAGGGAGC	161
h-SMARCA5	GGTCTTGGCATCAATCTTGCG	TGTGCTCGGTCCATAGCCTG	95
h-SMARCB1	GACGACGGCGAGTTCTACAT	CCGTGATCATGTGACGATGC	152
h-SMARCC1	AGTGGATCCCACCTACGGTC	TTTTCTCTTCAGCTCCTTCAAGC	90
h-SMARCC2	CTTGGTGGAGGCCATGTTG	CCGCTCTCCTCAATCCGCT	135
h-SMARCD1	TGCTTATGCCACCAGAACCT	CCACCACATCAGTCATTGTCTTG	198
h-SMARCD3	GCTCCTCATGCTGGACTACC	GGGACAATCAAAAATCTGCTGG	200
h-SMARCE1	CTCCGGACGCGAGGG	TAAGAATGAATCTGAGACACCGC	97
h-SUZ12	TCCATGTCATGAAGCATGGGTTT	TGCATTTACGGAGCTTGTA	199
h-TCF3	ACTTCTCGTCCAGCCCTTCT	CCTCGTCCAGGTGGTCTTCT	153
h-USP16	CGGAGACAGTGAATGGACCAA	AAAACCAGCCTGCTGAAATCTCT	141

**Tabelle 7: Primer, h: Human**

### 3.5. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Charakterisierung</b> (Leibniz-Institut DSMZ, o. D.)	<b>Klassifizierung nach</b> <b>Collisson et al., 2011</b>
------------------	--	--

Pa-Tu-8988T	Humane Pankreastumorzelllinie, isoliert aus der Lebermetastase eines primären Pankreaskarzinoms einer 64-jährigen Frau	Quasimesenchymaler Subtyp
Pa-Tu-8988S	Humane Pankreastumorzelllinie, isoliert aus der Lebermetastase eines primären Pankreaskarzinoms einer 64-jährigen Frau	Klassischer Subtyp
Capan-2	Humane Pankreastumorzelllinie, isoliert aus einem primären Pankreaskarzinom eines 56-jährigen Mannes	Klassischer Subtyp
Panc-1	Humane Pankreastumorzelllinie, isoliert aus Gangzellen eines Pankreaskopfkarzinoms eines 56-jährigen Mannes	Quasimesenchymaler Subtyp

**Tabelle 8: Zelllinien**

### 3.6. Epigenetische Inhibitoren und das Chemotherapeutikum Gemcitabin

<b>Wirkstoff</b>	<b>Gemcitabin</b>	<b>Vorinostat</b>	<b>PRT4165</b>	<b>LSD1-Inhibitor</b>	<b>GSK126</b>
<b>Lösungsmittel</b>	DMEM	DMSO	DMSO	DMEM	DMSO
<b>Lagerung</b>	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C	- 20 °C
<b>Haltbarkeit</b>	1 Monat	1 Monat	1 Monat	3 Monate	3 Monate
<b>Lösungsmittelkontrolle</b>	DMEM	DMSO	DMSO	DMEM	DMSO
<b>Firma</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 9: Epigenetische Inhibitoren und das Chemotherapeutikum Gemcitabin**

### 3.7. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
96-Well Platte (qRT-PCR), weiß	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Filter Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Kryoröhrchen	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Lab-Tek™ II Chamber Slides, 4-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lab-Tek™ II Chamber Slides, 6-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
PCR Reaktionsgefäß	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Sterile Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Xtra-Clear Advanced Polyolefin Starseal	STARLAB, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflasche T-25, PS, Oberfläche: Standard TC für adhärenente Zellen (25 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflasche T-75, PS, Oberfläche: Standard TC für adhärenente Zellen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten (96-Well)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterial**

### 3.8. Geräte

Geräte	Hersteller
AEJ200-4CM	Kern & Sohn, Stuttgart, Deutschland
EW4200-2NM	Kern & Sohn, Stuttgart, Deutschland
Fusion FX	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Heracell 240 CO2 Inkubator	Marshall Scientific, Hampton, USA
Leica DMI6000 B	Leica, Wetzlar, Deutschland
IX50 Invertiertes Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Shinjuku, Japan
LightCycler® 96	Roche, Basel, Schweiz
Mastercycler® Pro Vapo.protect	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Herkules, USA
Mini Trans-Blot® Modul	Bio-Rad, Herkules, USA
Minizentrifuge für Platten - 230EU	Corning, New York, USA
Pipetboy acu 2	Integra, Biebertal, Deutschland
PIPETMAN® classic	Gilson, Middleton, USA
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad, Herkules, USA
Sonoplus HD2070 mit MS72 Mikrospritze	Bandelin, Berlin, Deutschland
SpectraMax® Plus 384 Mikroplatten Reader	Molecular Devices, San José, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, Herkules, USA
TS1 ThermoShaker	Biometra, Göttingen, Germany
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 11: Geräte**

### 3.9. Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FusionCaptAdvance (7.17.02a)	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ	By Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA
Lightcycler®96 Software	Roche, Basel, Schweiz
Microsoft® Office 365®	Microsoft, Redmond, USA
Leica MM AF	Leica, Wetzlar, Deutschland

**Tabelle 12: Software**

## 4. Methoden

### 4.1. Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1. Zellkulturbedingungen

Pa-Tu-S; Pa-Tu-T	DMEM hoher Glukoseanteil, 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (v/v), 10 % FBS (v/v)
Capan-2	DMEM hoher Glukoseanteil, 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (v/v), 20 % FBS (v/v)
Panc-1	RPMI 1640 Medium, 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep) (v/v), 10 % FBS (v/v)

**Tabelle 13: Zellkulturmedien**

Die Zelllinien wurden bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % in dem aufgelisteten Zellkulturmedium (Tabelle 13) kultiviert. Das Arbeiten mit Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Durchlicht-Mikroskopiebilder wurden mit dem IX50 Mikroskop von Olympus bei einer 100-fachen Vergrößerung angefertigt.

#### 4.1.2. Auftauen von Zellen

Die bei -150 °C gelagerten Zellen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in 10 ml entsprechendes Zellkulturmedium (Tabelle 13) überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 225 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine T-25 Zellkulturflasche gegeben.

#### 4.1.3. Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von 70 - 90 % wurden die Zellen passagiert. Das Zellkulturmedium wurde entnommen, die Zellen mit 10 ml (PBS) gewaschen und für 5 min bei 37 °C in 2 ml 1x Trypsin/EDTA Lösung in PBS inkubiert. Um die Trypsinaktivität zu unterbinden, wurden anschließend 8 ml Zellkulturmedium mit FBS hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 20 verdünnt.





Lysepuffer aufgelöst. Die Reduktion des MTT wurde 24 h später im SpectraMax® Plus 384 Mikroplatten Reader mithilfe photometrischer Messungen bei einer Absorption von 570 nm detektiert.

#### **4.1.6.1. MTT-Test nach Behandlung von Zellen mit epigenetischen Inhibitoren und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin**

Um die Wirksamkeit verschiedener epigenetischer Inhibitoren und dem Chemotherapeutikum Gemcitabin zu verifizieren, wurden Überlebenskurven der Zelllinien unter Behandlung ermittelt. Hierzu wurde eine der Zelllinie entsprechende Zellzahl in jedes Well einer 96-Well Zellkulturpatte ausgesät (Tabelle 14). Nach 24 h wurden die Zellen mit den Wirkstoffen ansteigender Konzentration behandelt (Tabelle 15). 72 h später wurden jeweils 20 µl MTT hinzugegeben und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen durch Hinzugeben von 100 µl DMSO lysiert. Die Reduktion des MTT wurde 30 min später im SpectraMax® Plus 384 Mikroplatten Reader mithilfe photometrischer Messungen bei einer Absorption von 570 nm detektiert.

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellen / Well</b>
Pa-Tu-S	10.000
Pa-Tu-T	5.000
Capan-2	10.000
Panc-1	5.000

**Tabelle 14: Den Zelllinien entsprechende Zellzahl zur Durchführung eines MTT-Tests und Bestimmung der Überlebensrate**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Konzentration</b>
Vorinostat	0 – 1.000 nM
PRT4165	0 – 1.000 µM
LSD1-Inhibitor	0 – 100 µM
GSK126	0 – 300 nM
Gemcitabin	0 – 500 nM

**Tabelle 15: Behandlungskonzentrationen ausgewählter Wirkstoffe zur Erstellung von Überlebenskurven mittels MTT-Test**

## 4.2. Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1. RNA-Isolation

RNA wurde mithilfe des *RNeasy® Plus Mini Kit* gemäß den Herstellerangaben isoliert. Zur Vorbereitung wurden in einem Reaktionsgefäß 10 µl β-Mercaptoethanol mit 1 ml RLT Plus Puffer sorgfältig vermischt. Die Zellen wurden anschließend entweder als Zellpellet oder direkt in der Zellkulturplatte durch 350 µl des mit β-Mercaptoethanol versetzten RLT Plus Puffer lysiert. Das Zelllysate wurde in eine gDNA Eliminator Spin Column transferiert und für 30 s bei 8.000 x g, RT zentrifugiert. Die Säule wurde entsorgt und der Durchfluss mit 350 µl 70 % Ethanol (v/v) vermischt. Das Gemisch wurde in eine RNeasy Spin Column überführt und 15 s bei 8.000 x g, RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 700 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert und 15 s bei 8.000 x g, RT zentrifugiert. Anschließend wurden zweimal jeweils 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und 15 s bei 8.000 x g, RT bzw. 2 min bei 8.000 x g, RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Die RNeasy Spin Column wurde in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) gesetzt und für 1 min bei maximaler Leistung zentrifugiert. Die Säule wurde dann erneut in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) transferiert und es wurden 30 – 50 µl Nuklease-freies Wasser auf die Membran pipettiert. Nach 1 min wurde die RNeasy Spin Column bei 8.000 x g, RT zentrifugiert, das RNA Eluat erneut auf die Membran gegeben und für 1 min bei 8.000 x g, RT zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und die RNA-Konzentration mithilfe des SpectraMax® Plus 384 Mikroplatten Readers gemessen. Die gewonnene RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

### 4.2.2. RNA-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der RNA wurde das *SpectraDrop™ Mikrovolumen Starter Kit* verwendet. Hierbei wurden 2 µl der gewonnenen RNA in markierte Bereiche einer Glasplatte aufgetragen und durch eine entsprechende Deckplatte fixiert. Bei 260 und 280 nm wurde anschließend durch ein SpectraMax® Photometer die Absorption der Probe gemessen und diente der quantitativen Bestimmung der Nukleinsäuren. Es konnte die RNA-Konzentration berechnet und durch das Absorptionsverhältnis  $A_{260} / A_{280}$  die Qualität und Reinheit der Probe dargestellt werden.

### 4.2.3. cDNA-Synthese

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurde das *Thermo Scientific Verso cDNA Synthese Kit* verwendet.

Volumen	Reagenz
2 µg	RNA
1 µl	Random Hexamer Primer
auf 12 µl	Nuklease-freies Wasser
12 µl	Zwischenvolumen
4 µl	Reaktionspuffer (5X)
1 µl	RiboLock RNase Inhibitor (20 U / µl)
2 µl	10 mM dNTP Mix
1 µl	RevertAid M-MuLV RT (200 U / µl)
20 µl	Zwischenvolumen
80 µl	Nuklease-freies Wasser
100 µl	Endvolumen (20 ng / µl)

**Tabelle 16: cDNA-Synthese-Ansatz**

Alle Protokollschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden 2 µg RNA und 1 µl Random Hexamer Primer in ein Reaktionsgefäß pipettiert und auf 12 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U / µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U / µl) hinzugefügt und sorgfältig vermischt. Der Synthese-Ansatz wurde 5 min bei 25 °C, weitere 60 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 70 °C inkubiert. Durch Verdünnung mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser wurde eine cDNA-Konzentration von 20 ng / µl erreicht (Tabelle 16). Das Produkt wurde direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte. Durch Denaturierung der doppelsträngigen DNA ist es spezifischen Primern möglich, an die Einzelstränge zu binden. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer mithilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs). Die PCR wurde in einem Mastercycler® von Eppendorf durchgeführt (Tabelle 18).

Volumen	Reagenz
2 µl	cDNA (20 ng / µl)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
10 µl	ReadyMix™ REDTaq® PCR-Reaktionsmischung
6 µl	ddH <sub>2</sub> O
20 µl	Endvolumen

**Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz**

Initiale Denaturierung	120 s bei 95 °C
Amplifikation – 38 Zyklen	
Denaturierung	30 s bei 95 °C
Annealing	30 s bei 55 °C
Extension	30 s bei 72 °C
Finale Extension	60 s bei 72 °C

**Tabelle 18: PCR-Programm**

#### 4.2.5. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die Expression bestimmter Gene wurde mithilfe der Real-time PCR quantifiziert. Durch eine konventionelle Polymerase-Kettenreaktion wurde die Menge an cDNA amplifiziert. Mithilfe von Fluoreszenzmessungen wurde diese während eines PCR-Zyklus in Echtzeit aufgezeichnet. Die Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden Farbstoffes SYBR Green stieg dabei proportional zur amplifizierten Menge des Zielgenes. Überstieg diese

die Hintergrund-Fluoreszenz, ergab sich daraus der sogenannte Ct-Wert. Alle Werte wurden auf ein Haushaltsgen normiert. Am Ende der PCR-Reaktion wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der verwendeten Primer überprüft. Zum Starten der Reaktion wurden jeweils 2 µl cDNA (20 ng / µl), 1 µl Vorwärtsprimer (10 µM), 1 µl Rückwärtsprimer (10 µM), 10 µl 2x SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix und 6 µl ddH<sub>2</sub>O in jedes Well einer 96-Well Zellkulturplatte pipettiert (Tabelle 19). Alle Proben wurden als Dubletten angelegt. Tabelle 20 zeigt den anschließenden Aufbau des qRT-PCR Programmes in dem LightCycler® 96 von Roche.

<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>
2 µl	cDNA (20 ng / µl)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
10 µl	SYBR <sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (2X)
6 µl	ddH <sub>2</sub> O
20 µl	Endvolumen

**Tabelle 19: qRT-PCR-Ansatz**

Initiale Denaturierung – 1 Zyklus	600 s bei 95 °C
Amplifikation – 45 Zyklen	
Denaturierung	15 s bei 95 °C
Annealing	15 s bei 55 °C
Extension	15 s bei 68 °C
Schmelzkurve – 1 Zyklus	
Denaturierung	10 s bei 95 °C
Hybridisierung	60 s bei 65 °C
Schmelzvorgang	1 s bei 97 °C
Abkühlung	30 s bei 37 °C

**Tabelle 20: qRT-PCR-Programm**

Aus den ermittelten Ct-Werten wurden die Mittelwerte gebildet und auf das Haushaltsgen normiert. Die relative Genexpression  $\Delta\text{Ct}$  wurde anhand der Formel 2 (1) berechnet. Im Rahmen der Behandlung von Zellen mit epigenetischen Wirkstoffen wurden die Werte anschließend noch auf unbehandelte Kontrollen normalisiert (Formel 2 (2)).

---

$$(1) \Delta\text{Ct} = \text{Ct-Wert Probe} - \text{Ct-Wert Haushaltsgen}$$

$$(2) \Delta\Delta\text{Ct} = 2^{-(\Delta\text{Ct behandelte Probe} - \Delta\text{Ct unbehandelte Kontrolle)}$$

---

### **Formel 2: Bestimmung der relativen Genexpression**

#### **4.2.6. Agarose-Gelelektrophorese**

TAE-Puffer (1X)                      40 mM Tris-Base, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA,  
mit Essigsäure auf pH 8 einstellen

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurde ein 1 % -iges Agarose-Gel hergestellt (Agarose in TAE-Puffer) und die PCR-Reaktion in die Geltaschen einpipettiert. Ein DNA-Größenmarker (100 bp DNA-Leiter) wurde zusätzlich als Vergleich aufgetragen. Um Nukleinsäuren nachzuweisen, enthielt das Gel das in die DNA interkalierende Färbemittel SYBR™ Safe (0,01 % (v/v)). Unter konstanter Spannung von 80 V wurde die DNA aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht in der Detektionskammer Fusion FX von Vilber sichtbar gemacht.

#### **4.3. Proteinbiochemische Methoden**

##### **4.3.1. Proteinisolierung**

Protein Lyse Puffer                      50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 % SDS (w/v)

Die in T-75 Zellkulturflaschen kultivierten Zellen wurden sorgfältig mit PBS gewaschen, für 5 min bei 37 °C in 1x Trypsin/EDTA Lösung in PBS inkubiert und mit 8 ml Zellkulturmedium vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß gegeben, 5 min bei 225 x g zentrifugiert und das überständige Medium

abgenommen. Das Zellpellet wurde mit einer entsprechenden Menge an Protein Lyse Puffer (Tabelle 21) sowie 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitoren angereichert und auf Eis lysiert.

Kultivierte Zellen in 6-Well Zellkulturplatten wurden hingegen sorgfältig mit PBS gewaschen, direkt mit einer entsprechenden Menge an Protein Lyse Puffer (Tabelle 22) sowie 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitoren angereichert und auf Eis lysiert.

Mithilfe eines Sonicaters wurden die Zellen durch Ultraschallkavitation aufgebrochen (10 s bei einer Amplitude von 30 %). Das Zelllysate wurde anschließend für 15 min bei 20.800 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Proteine von ungewollten Zellbestandteilen zu separieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zelllinie	Konfluenz	Protein Lyse Puffer
Pa-Tu-S	70-80%	500 µl
Pa-Tu-T	70-80%	500 µl
Capan-2	70-80%	300 µl
Panc-1	70-80%	500 µl

**Tabelle 21: Proteinisolation aus einer T-75 Zellkulturflasche**

Zelllinie	Zellen / Well	Protein Lyse Puffer
Pa-Tu-S	400.000	100 µl
Pa-Tu-T	300.000	100 µl
Capan-2	500.000	100 µl
Panc-1	400.000	100 µl

**Tabelle 22: Proteinisolation aus einer 6-Well Zellkulturplatte**

#### 4.3.2. Proteinkonzentrationsmessung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* verwendet. Dabei wurden 10 µl der Proteinprobe in 200 µl einer vorbereiteten Mischung aus Reagenz A / Reagenz B (Verhältnis 1:50) gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine BSA-Standardreihe bildete die Grundlage der Proteinkonzentrationsmessung (2.000 µg / ml, 1.500 µg / ml, 1.000 µg / ml, 750 µg / ml, 500 µg / ml, 250 µg / ml, 125 µg / ml,

25 µg / ml). Mithilfe des SpectraMax® Plus 384 Mikroplatten Reader wurde die Absorption bei 570 nm gemessen und abschließend die Proteinkonzentration bestimmt (Formel 3).

---

$$y = m * x + b$$

---

y = Proteinkonzentration (µg / ml)

m = Steigung

x = Absorption (nm)

b = Y-Achsenabschnitt

### **Formel 3: Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **4.3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

SDS-Probenpuffer (5X)      1 M Tris-Base, 10 % SDS (w/v), Bromphenolblau,  
5 % β-Mercaptoethanol (v/v), 50 % Glycerol (v/v)

Laufpuffer (1X)            25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,10 % SDS (w/v)

Zur Vorbereitung auf die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 20 µg der Proteinproben mit 5x SDS-Probenpuffer aufbereitet und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde anschließend die SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden 1 mm starke Gele auf Polyacrylamidbasis gegossen, bestehend aus einem 4 % - igem Sammelgel und einem 15 % - igem Trenngel (Tabelle 23). Die Taschen der vorbereiteten Gele wurden daraufhin mit den Proben befüllt. Zusätzlich wurde auf jedes Gel ein Protein Marker (Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus vorgefärbte Proteinleiter) aufgetragen. Die verwendete Elektrophorese-Kammer Mini PROTEAN® Tetra Cell von Bio-Rad wurde mit Laufpuffer befüllt und die Proteine zunächst in einem elektrischen Feld bei 0,03 A im oberen Gel gesammelt. Nach etwa 10 min wurden die Proteine dann bei einer angelegten Stromstärke von 0,05 A aufgetrennt.



Reagenz	Trenngel (15%)	Sammelgel (4%)
ddH <sub>2</sub> O	1,2 ml	1,5 ml
Acrylamid / Bis (30 %)	2,5 ml	375 µl
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,3 ml	-
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	-	650 µl
SDS 10 %	50 µl	25 µl
APS 10 %	25 µl	12,5 µl
TEMED	7,5 µl	5 µl

**Tabelle 23: Zusammensetzung der Gele für die Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

#### 4.3.4. Western Blot Analyse

Transferpuffer (1X)	192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20 % Methanol (v/v)
Blockierungspuffer (1X) bzw. Inkubationspuffer	5 % BSA (w/v), TBS (1X), 0,1 % Tween® 20 (v/v); 5 % Milchpulver (w/v), TBS-T (1X); 1 % Milchpulver (w/v), TBS-T (1X)
TBS-T (1X)	10 mM Tris Hydrochlorid (1 M, pH 6,8), 150 mM Natriumchlorid, 0,05 % Tween® 20 (v/v)
Detektionsreagenz	Pierce ECL Western Blotting-Substrat; SuperSignal™ West Femto Substrat mit maximaler Empfindlichkeit; SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz-Substrat

Um die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wurden diese zunächst auf eine Trägermembran transferiert. Verwendet wurde hierzu eine Nitrozellulosemembran, auf die kathodenseitig das Polyacrylamidgel gelegt und beides durch Filterpapier ummantelt wurde. Die Membran, wie auch die Filterpapiere, wurden zuvor für 10 min in Transferpuffer eingelegt. Das Blotting Sandwich wurde in einer Kassette des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems von Bio-Rad fixiert und die Proteine bei einer Spannung von 25 V innerhalb von 30 min auf die Nitrozellulosemembran

übertragen. Die Trägermembran wurde anschließend für 1 h bei RT in Blockierungspuffer (5 % BSA (w/v) in TBS-T) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Der primäre Antikörper wurde ebenfalls mit 5 % BSA (w/v) oder 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T gelöst und über Nacht bei 4 °C auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Unspezifisch bindende Antikörper wurden dann durch zweimaliges Waschen (15 min) mit TBS-T entfernt. Der mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper wurde in 1 % Milchpulver (w/v) / 1x TBS-T verdünnt und die Membran anschließend für 1 h bei RT darin inkubiert. Nach erneuter, dreimaliger Waschung (15 min) mit TBS-T wurden die Proteine in der Detektionskammer Fusion FX von Vilber detektiert. Dazu wurde die Trägermembran für 1 min in ein entsprechendes Detektionsreagenz gegeben und durch die darin enthaltenen Substrate eine Chemilumineszenzreaktion gestartet.

#### **4.4. Immunhistochemische Methoden**

##### **4.4.1. Immunfluoreszenzfärbung**

PBS-T (1X)	PBS (1X), 1 % Tween ® 20 (v/v)
IF-Blockierungspuffer	5 % Eseserum (v/v), 1 % BSA (w/v), 0,1 % Triton™ X-100 (v/v), PBS (1X)

Zur Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung wurden die ausgewählten Tumorzelllinien entsprechend der oben beschriebenen Zellkulturbedingungen in 4-Well Lab-Tek™ II Chamber Slides mit je 10.000 Zellen/Well oder in 8-Well Lab-Tek™ II Chamber Slides mit je 5.000 Zellen/Well kultiviert. Bei ausreichender Konfluenz wurde das Zellkulturmedium sorgfältig abgegossen. Zur Fixierung der Zellen auf dem Objektträger wurde 4 % Paraformaldehyd (v/v) in PBS verwendet und für 10 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 5 min wurde die Zellmembran der fixierten Tumorzellen durch eine 1 % BSA (w/v) / 1 % Triton-X (v/v) Lösung in PBS permeabilisiert (30 min bei 37 °C). Anschließend wurden die Kammern dreimal für jeweils 5 min mit PBS-T gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit IF-Blockierungspuffer für 1 h bei RT blockiert. Der primäre Antikörper wurde mit 1 % BSA (w/v) / 0,1 % Triton-X (v/v) Lösung in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Objektträger gegeben. Durch dreimaliges

Waschen mit PBS-T (5 min) wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer 1 % BSA (w/v) / 0,1 % Triton-X (v/v) Lösung in PBS 1:200 verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur in die Kammern gegeben. Der Objektträger wurde anschließend für 5 min mit PBS-T gewaschen. Um eine Färbung des Zellkernes zu erreichen, wurde bei RT der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (0,02 % (v/v) in IF-Blockierungspuffer) für 5 min aufgetragen. Die Objektträger wurden nochmals für 5 min mit PBS-T gewaschen und die Medienkammern vorsichtig entfernt. Abschließend wurde ein Eindeckmedium für Immunfluoreszenzfärbungen aufgetropft und möglichst blasenfrei ein Deckglas aufgesetzt. Die Objektträger wurden bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Zur Visualisierung der Immunfluoreszenzfärbung wurde ein Immunfluoreszenzmikroskop von Leica verwendet. Einzelbilder wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung angefertigt und mittels der Immunfluoreszenz-Software Leica MM AF zusammengefügt.

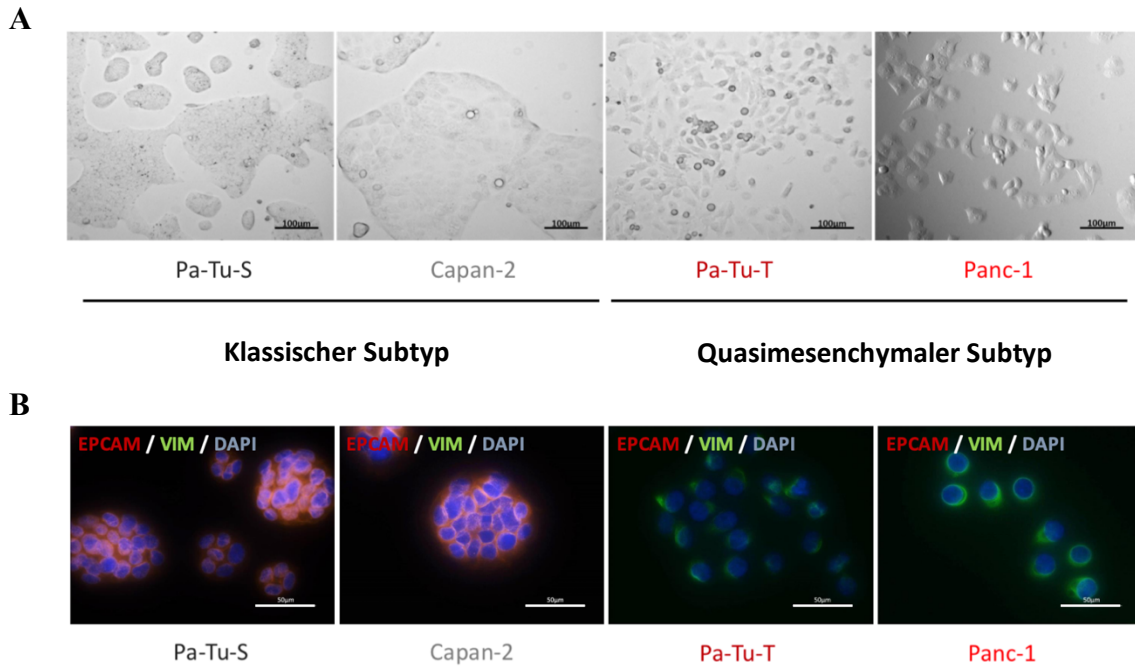
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Die Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms

2011 legte Collisson et al. den Grundstein für die Identifizierung intertumoraler Heterogenität. Zu Beginn der Arbeit wurden vier der dort charakterisierten Zelllinien ausgewählt. Als Vertreter des klassischen Subtyps wurden die humanen Krebszelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 verwendet. Die Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 sind hingegen dem quasimesenchymalen Tumorsubtyp zuzuordnen. Zunächst wurde die Zugehörigkeit zu den entsprechenden Subtypen verifiziert.

#### 5.1.1. Morphologische und immunhistologische Zelleigenschaften

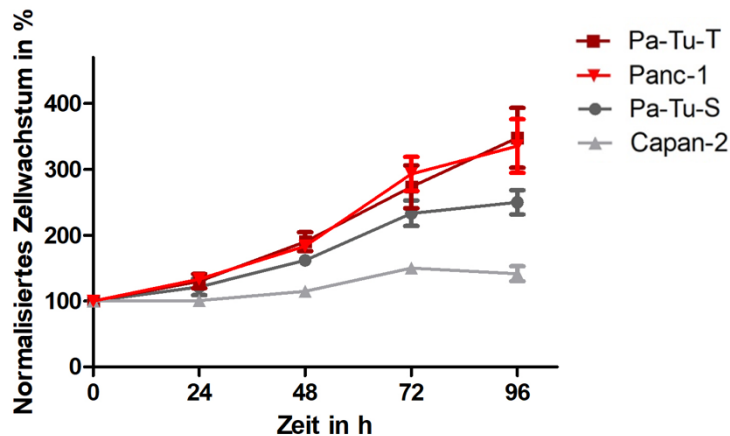
Für die morphologische Charakterisierung der vier ausgewählten Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms, Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1, wurden die Zellen unter Normbedingungen kultiviert und Durchlicht-Mikroskopiebilder angefertigt (Abbildung 6A). Die Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 weisen eine epithelartige Morphologie und enge Zell-Zell-Kontakte mit einem inselartigen Wachstum auf. Die Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 zeigen hingegen ein eher spindelförmiges (quasimesenchymales) Aussehen mit einer Verteilung der einzelnen Zellen, ohne enge Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 6A). Anhand der morphologischen Eigenschaften lassen sich die humanen Krebszelllinien in zwei Gruppen unterteilen, welche mit den molekularen Subtypen übereinstimmen. Um die Zugehörigkeit zu den Subtypen zu bestätigen, wurden alle vier Tumorzelllinien im nächsten Schritt durch Immunfluoreszenzfärbungen näher charakterisiert. Die Expression des epithelialen Markers, EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), und des mesenchymalen Markers, Vimentin (VIM), wurde dafür gemessen und später in rot beziehungsweise grün farblich dargestellt. In den klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 zeigt sich eine hohe EPCAM-Expression, Vimentin ist nicht nachweisbar. Umgekehrt hingegen verhält es sich in den quasimesenchymalen Krebszelllinien Pa-Tu-T und Panc-1. EPCAM kann hier nicht dargestellt werden, der mesenchymale Marker Vimentin ist jedoch vermehrt vorhanden. Der epitheliale Zellmarker EPCAM tritt sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig auf, während der mesenchymale Marker Vimentin vorrangig zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abbildung 6B).



**Abbildung 6: Verschiedene Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. (A)** Morphologie ausgewählter Krebszelllinien, welche den klassischen und quasimesenchymalen Subtypen darstellen. Maßstabsbalken 100 µm. **(B)** Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung humaner Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms zum Nachweis von EPCAM (epithelialer Zellmarker in rot) und Vimentin (mesenchymaler Marker in grün). Zellkernfärbung mittels DAPI (in blau). Maßstabsbalken 50 µm.

### 5.1.2. Zellproliferation

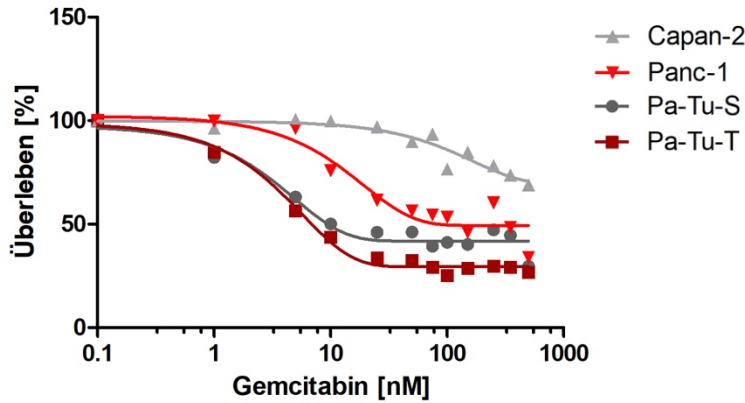
Zur weiteren Charakterisierung der vier humanen Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms wurden MTT-Assays durchgeführt, um die jeweiligen Proliferationsraten über einen Zeitraum von 96 Stunden zu erfassen. Hierbei zeigt sich, dass die für den quasimesenchymalen Subtyp repräsentativen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 eine höhere Zellwachstumsrate aufweisen als die Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2. Die Zelllinie Capan-2 zeigt insgesamt die geringste Zellproliferation (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Proliferationsrate.** Bestimmung der Proliferationsrate der aufgeführten Krebszelllinien nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) angegeben.

### 5.1.3. Überlebensrate nach Behandlung mit Gemcitabin

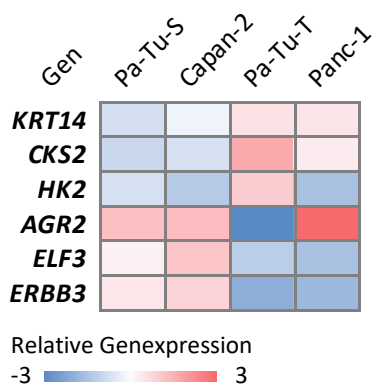
Collisson et al. konnte zeigen, dass Zelllinien des quasimesenchymalen Subtypen im Durchschnitt empfindlicher auf eine Behandlung mit Gemcitabin reagieren als Tumorzelllinien des klassischen Subtyps. Allerdings konnten spätere Untersuchungen nachweisen, dass Tumore des klassischen Subtypen besser auf Standard-Chemotherapeutika ansprechen als Tumore des quasimesenchymalen Subtypen (Aung et al., 2018). Anhand von MTT-Assays habe ich die gegensätzlichen Angaben zur Chemosensitivität für die vier ausgewählten Zelllinien Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1 überprüft. Hierzu wurden die quasimesenchymalen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 und die klassischen Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 mit ansteigenden Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin (0 – 500 nM) behandelt und das Überleben der Zellen mittels MTT-Assay gemessen. Nach der Behandlung mit Gemcitabin ergibt sich keine subtypenspezifische Korrelation der Überlebenskurven. Ein erhöhtes Therapieansprechen von Zelllinien des quasimesenchymalen Tumorsubtypen kann anhand der ausgewählten Krebszelllinien nicht verifiziert werden. Ebenso zeigt sich nach Zytostatikabehandlung keine bessere Ansprechrate der klassischen Pankreastumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Überlebensrate nach Behandlung mit Gemcitabin.** Die Tumorzellen wurden über 72 h mit ansteigenden Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin (0 - 500 nM) behandelt. Das Überleben der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Alle Daten sind als Mittelwert dargestellt (n = 3).

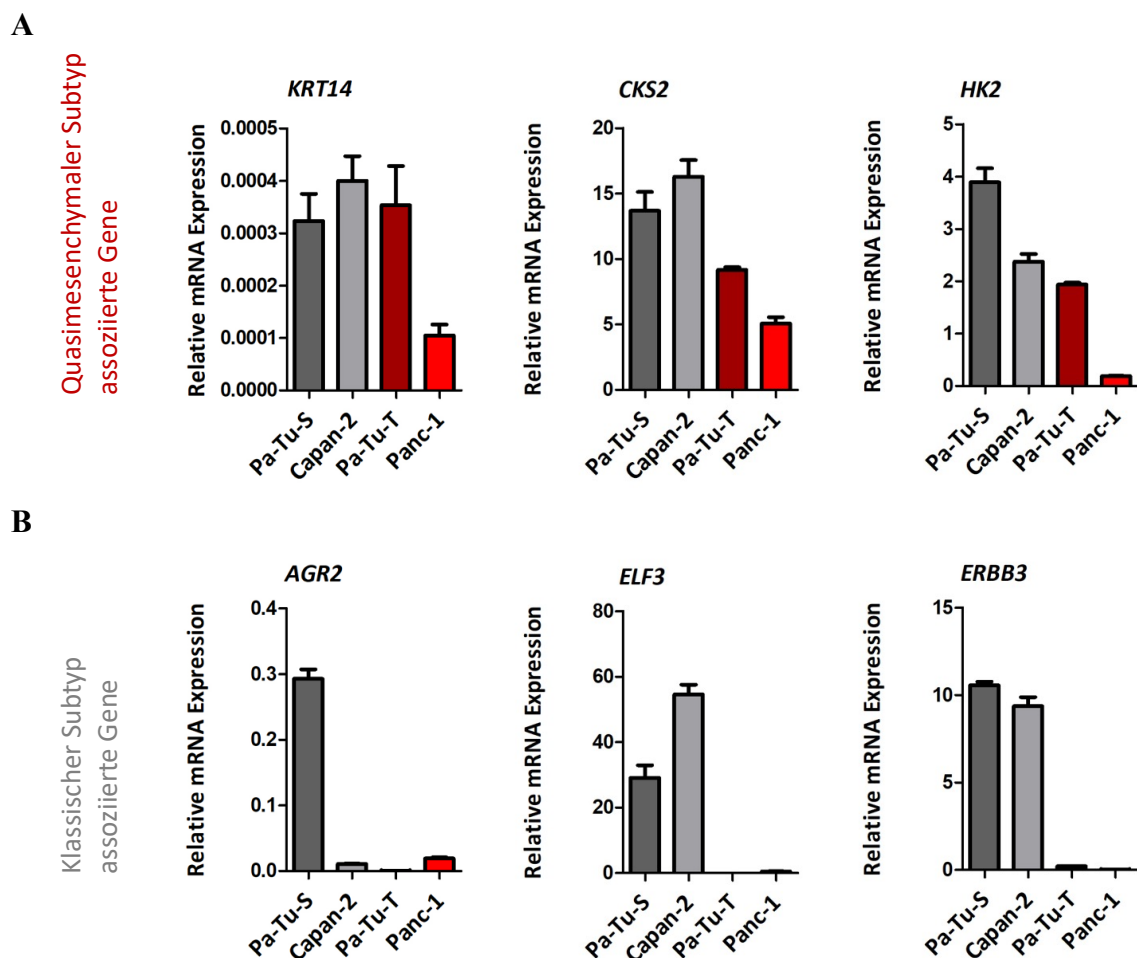
#### 5.1.4. Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene

Globale Genexpressionsanalysen von humanen Gewebeproben, primären und etablierten Zelllinien des Pankreaskarzinoms ermöglichten Collisson et al., Subtypen zu klassifizieren, welche spezifische Gensignaturen besitzen (Collisson et al., 2011). Einige der dafür relevanten Gene wurden für die vorliegende Arbeit herausgegriffen und deren Expression in den Subtypen mittels Heatmap dargestellt. Die ausgewählten Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* sind dabei mit dem quasimesenchymalen Subtyp assoziiert, die Gene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* hingegen mit dem klassischen Subtyp (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Von Collisson et al. publizierte Expressionsdaten ausgewählter Gene.** Dargestellt sind die Genexpressionsdaten der Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* sowie *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3*. Herausgegriffen wurden dabei die klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie die quasimesenchymalen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1. Daten entnommen aus (Collisson et al., 2011).

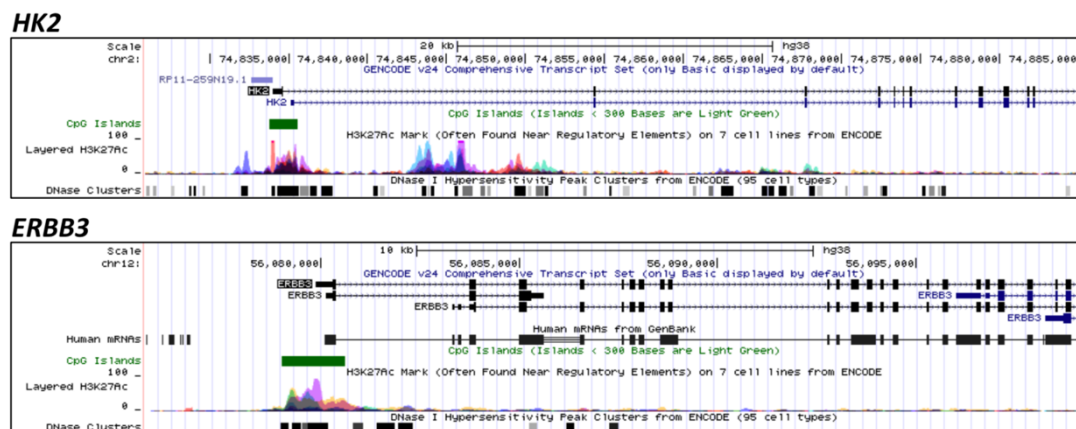
Die Expression der Subtyp-spezifischen Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* sowie *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* wurde anschließend mittels quantitativer Real-time PCR in den vier Pankreastumorzelllinien Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1 in der vorliegenden Arbeit verifiziert. Die mit dem quasimesenchymalen Subtyp assoziierten Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* weisen keine erhöhte Transkriptionsrate in den Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 auf (Abbildung 10A). Allerdings konnte eine erhöhte Expression der Gene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* in den klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 bestätigt werden (Abbildung 10B).



**Abbildung 10: Verifizierung der Expression von ausgewählten Genen in Krebszelllinien mit klassischem oder quasimesenchymalem Subtyp.** Analysiert wurden dabei die für den (A) quasimesenchymalen Subtyp spezifischen Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* sowie die für den (B) klassischen Subtyp spezifischen Gene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3*. Die Expressionswerte sind relativ zum Haushaltsgen *TBP* angegeben (n=3).



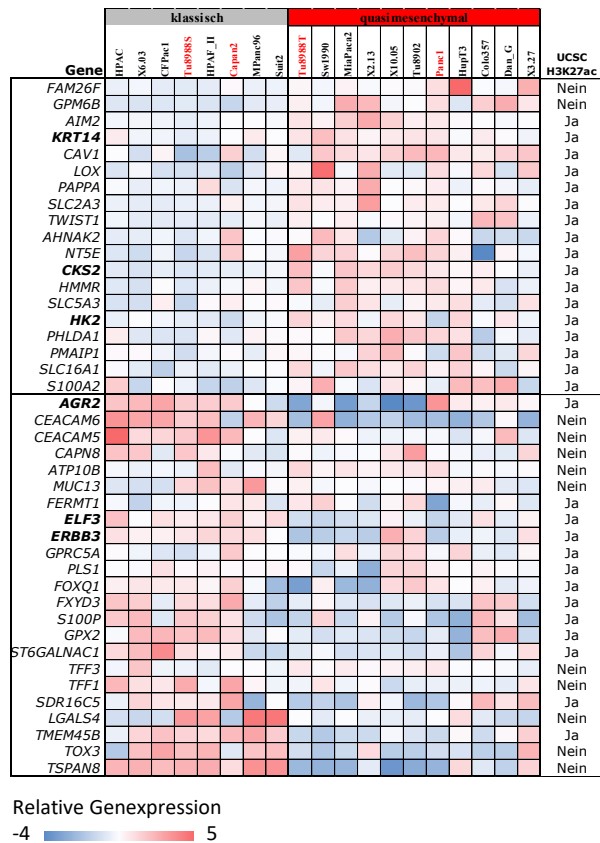
Im nächsten Schritt wurde eine mögliche epigenetische Regulation der Gene, die mit den Subtypen korrelieren, untersucht. Dazu wurden epigenetische Modulationsmöglichkeiten an den Transkriptionsstartpunkten der subtypenspezifischen Gene nach Collisson et al. mittels UCSC Browserdaten aufgezeigt. Abbildung 11 gibt dabei beispielhaft den Nachweis von Histonacetylierungen in den Genen *HK2* und *ERBB2* wieder. Es zeigt sich, dass sowohl die für den quasimesenchymalen Subtyp spezifischen Gene als auch die mit dem klassischen Subtyp assoziierten Gene epigenetisch reguliert werden.



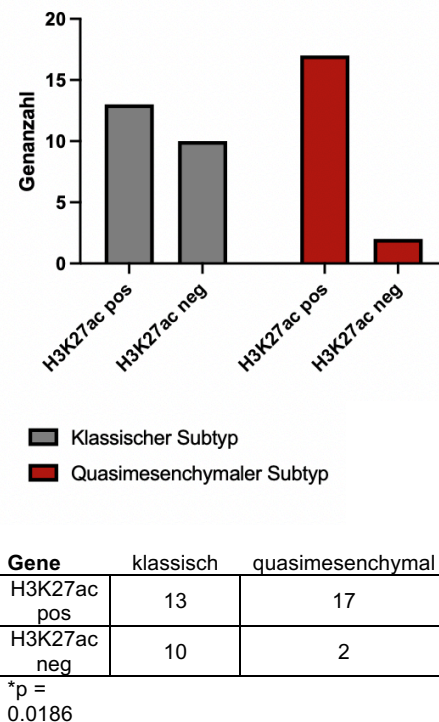
**Abbildung 11: Epigenetische Modulationsmöglichkeiten an Transkriptionsstartpunkten ausgewählter Gene.** Nachweis von CpG-Inseln und der Histonmodifikation H3K27ac an den Transkriptionsstartpunkten der Gene *HK2* (assoziiert mit dem quasimesenchymalen Subtyp) und *ERBB3* (assoziiert mit dem klassischen Subtyp). Die dargestellten Bilder wurden mit dem UCSC Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) erstellt.

Daraufhin wurde das gesamte von Collisson et al. publizierte Gencluster näher analysiert (Abbildung 12A). Die Gene wurden mithilfe des UCSC Browsers graphisch dargestellt und auf H3K27 Acetylierungen untersucht. Dabei fällt auf, dass die subtypenklassifizierenden Gene mit bestimmten Acetylierungsmustern korrelieren. An den Transkriptionsstartpunkten der Gene, welche dem quasimesenchymalen Tumorsubtyp zugeordnet sind, finden sich signifikant mehr aktivierende Histonacetylierungen. Gene des klassischen Subtyps scheinen hingegen weniger von Histonacetylierungsmustern bestimmt zu sein (Abbildung 12B).

A



B



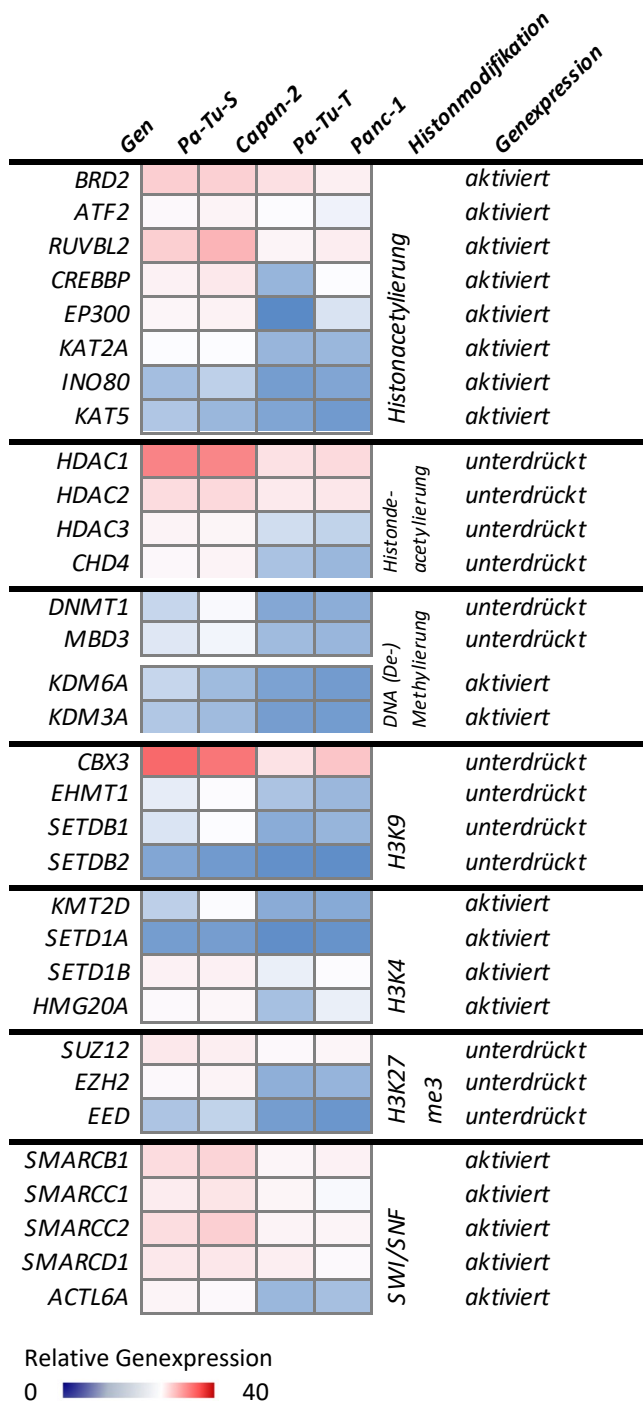
**Abbildung 12: Analyse von Acetylierungsmustern an Transkriptionsstartpunkten ausgewählter Gene. (A)** Von Collisson et al. publiziertes Cluster subtypenklassifizierender Gene. **(B)** Mithilfe des UCSC Browsers (<https://genome.ucsc.edu/>) wurden subtypendefinierende Gene auf Acetylierungen im Bereich ihrer Transkriptionsstartpunkte untersucht und eine mögliche Korrelation mittels Chi-Quadrat-Test überprüft. Daten entnommen aus (Collisson et al., 2011).

## 5.2. Epigenetisches Profil der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms

### 5.2.1. Genexpressionsanalyse epigenetischer Remodeler

Eine Reihe epigenetischer Enzyme ist verantwortlich für die vielfältigen Modulierungen an DNA- und Chromatinstrukturen. Des Weiteren wurde überprüft, ob ausgewählte epigenetische Remodeler im quasimesenchymalen und klassischen Subtyp unterschiedlich exprimiert werden. Mittels quantitativer Real-time PCR wurde das Transkriptionsniveau einzelner Enzym-kodierender Gene erfasst und ein epigenetisches Profil der Zelllinien Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1 erstellt. Die relative Genexpression wurde in einer Heatmap farblich kodiert dargestellt. Entsprechend ihrer epigenetischen Wirkung wurden die Histon- und DNA-modifizierenden Enzyme in

Gruppen unterteilt und übersichtlich dargestellt (Abbildung 13). Abhängig von den ausgewählten Tumorzelllinien zeigt sich in der Analyse ein unterschiedlicher Transkriptionsstatus der epigenetischen Modulatoren. Ein ähnliches Genexpressionsprofil kann in den Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie in den Tumorzelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 festgestellt werden. Das Ergebnis korreliert mit der Einteilung in den klassischen und quasimesenchymalen Subtypen. So zeigt sich zum Beispiel in Bezug auf die Gene *EP300*, *CHD4* und *EZH2* eine erhöhte Expression in den Pankreaskrebszelllinien Pa-Tu-S und Capan-2.

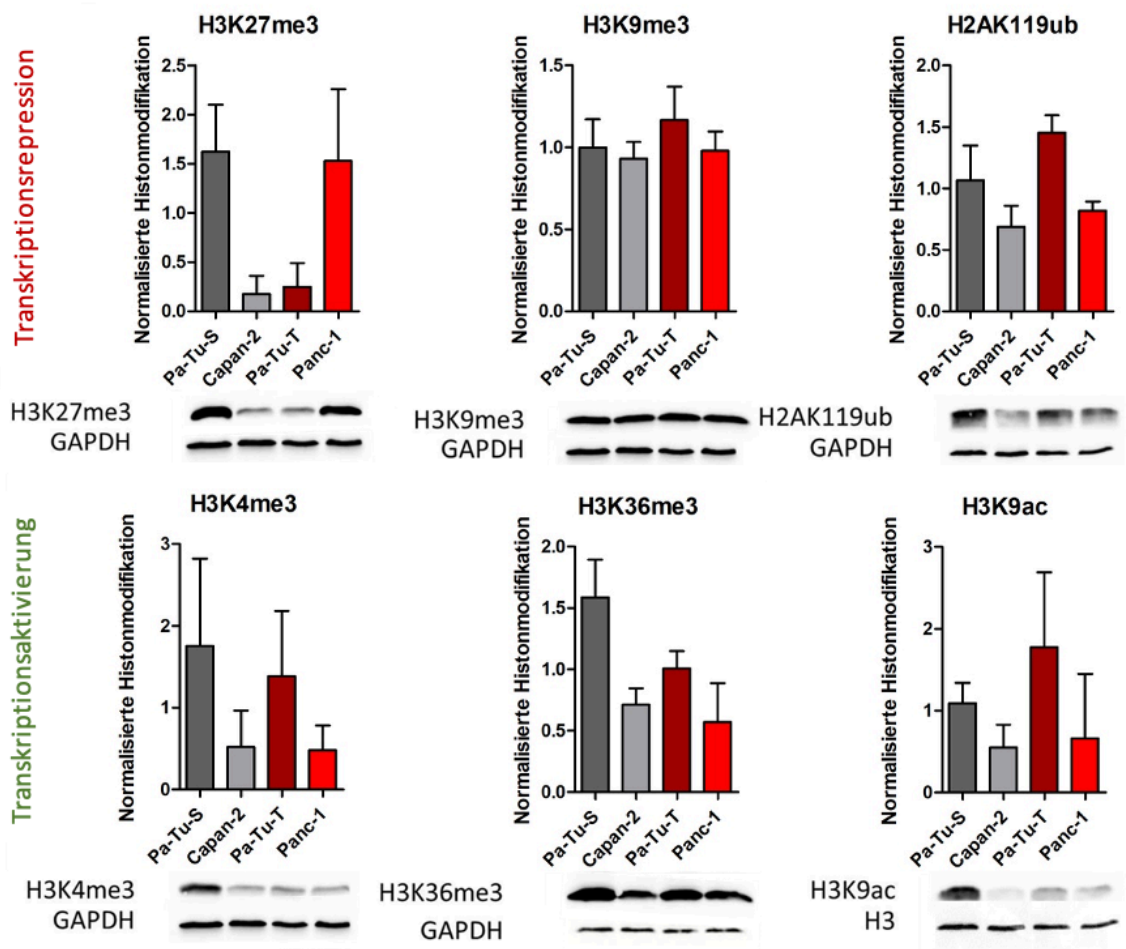


**Abbildung 13: Epigenetisches Profil der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms.** Die verschiedenen Krebszelllinien wurden auf ihr epigenetisches Profil analysiert. Dabei wurde ein Genexpressionsprofil von Enzymen erstellt, welche ein Remodelling von DNA- und Chromatinstrukturen bewirken. Die mRNA Expressionswerte sind in einer Heatmap als Mittelwert relativ zum Haushaltsgen *TBP* dargestellt (n = 3).

### 5.2.2. Western Blot Analyse spezifischer Histonmodifikationen

Zusätzlich wurden Immunblot Analysen mittels Western Blot durchgeführt, um einzelne Histonmodifikationen semi-quantitativ zu bestimmen. Es wurden hierfür zunächst Proteine aus den vier Tumorzelllinien isoliert und mithilfe spezifischer Antikörper die einzelnen Histonmodifikationen nachgewiesen. Die epigenetischen Modifikationen an den Histonen wurden entsprechend ihrer aktivierenden oder unterdrückenden Wirkung

auf die Transkription in zwei Gruppen unterschieden. Während die Histonmodifikationen H3K27me3, H3K9me3 und H2AK119ub eine Repression der Genexpression auslösen, führen H3K4me3, H3K36me3 und H3K9ac zu einer Erhöhung des Transkriptionsniveaus.



**Abbildung 14: Analyse verschiedener Histonmodifikationen.** Repräsentative Abbildung der Western Blot Analyse ausgewählter Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie Pa-Tu-T und Panc-1 für spezifische Histonmodifikationen H3K27me3, H3K9me3 und H2AK119ub (Transkriptionsrepression) sowie H3K4me3, H3K36me3 und H3K9ac (Transkriptionsaktivierung). Für die Quantifizierung wurden die Level der Histonmodifikationen auf das Haushaltsprotein GAPDH oder Histon H3 normalisiert und als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n = 3).

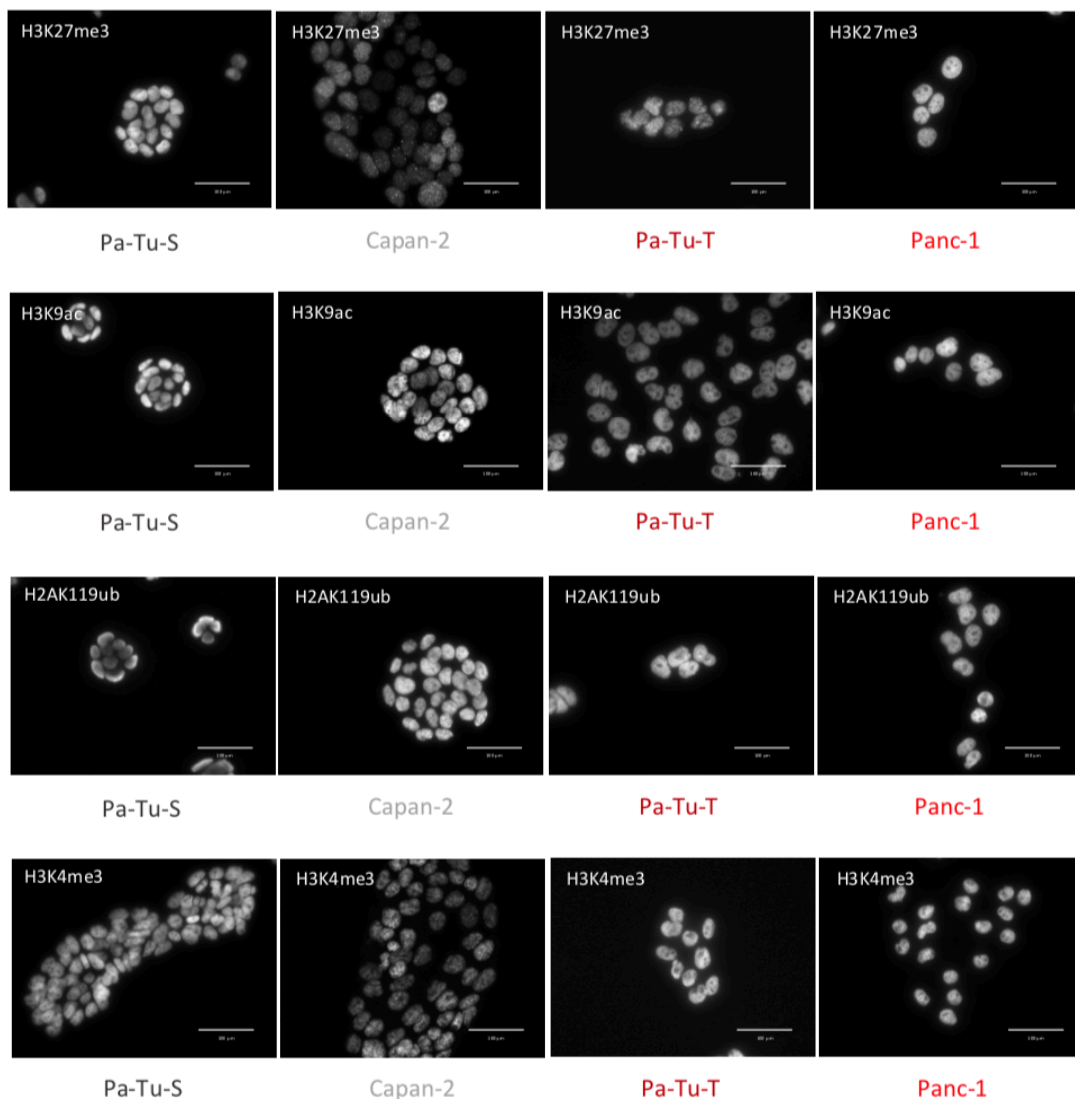
Abweichend von den Resultaten der mRNA-Expression korrelieren die Gesamtmengen der Histonmodifikationen nicht mit den entsprechenden Subtypen. Sowohl bei den transkriptionsaktiven als auch -repressiven Modifikationen kann kein ähnliches Niveau

innerhalb der subtypenspezifischen Krebszelllinien nachgewiesen werden. Vielmehr zeigen sich vorwiegend erhöhte Proteinkonzentrationen der Modifikationen H3K9me3, H2AK119ub, H3K4me3, H3K36me3 und H3K9ac in den Zelllinien Pa-Tu-S und Pa-Tu-T (Abbildung 14).

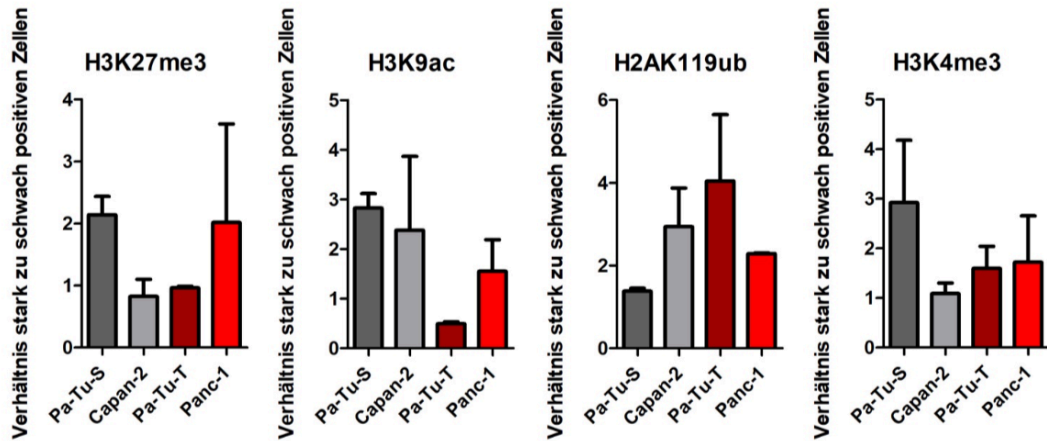
### 5.2.3. Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter Histonmodifikationen

Das Vorkommen der Histonmodifikationen H3K27me3, H3K9ac, H2AK119ub und H3K4me3 wurden darüber hinaus mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die Zelllinien Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1 wurden hierfür unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert und mithilfe spezifischer Antikörper für ausgewählte epigenetische Modifikationen markiert (Abbildung 15A).

A



B



**Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter Histonmodifikationen.** (A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung humaner Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms zum Nachweis der Histonmodifikationen H3K27me3, H3K9ac, H2AK119ub und H3K4me3. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m. (B) Analyse der Immunfluoreszenzfärbung unbehandelter Tumorzellen hinsichtlich ausgewählter Histonmodifikationen. Berechnet wurde das Verhältnis der relativen Anteile von stark zu schwach positiven Zellen. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2) dargestellt.

Alle Zelllinien zeigten eine kernspezifische Färbung der Histonmodifikationen H3K27me3, H3K9ac, H2AK119ub und H3K4me3 (Abbildung 15A). Für die anschließende Quantifizierung wurden mehrere Einzelbilder der jeweiligen Immunfluoreszenzfärbung angefertigt und daran der Anteil von stark zu schwach positiven Zellen ermittelt. Weiter wurde das Verhältnis der relativen Anteile von stark zu schwach positiven Zellen berechnet und graphisch dargestellt (Abbildung 15B). Die Zelllinien Pa-Tu-S und Panc-1 weisen dabei erhöhte H3K27me3 Level auf, einhergehend mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse. Das Verhältnis der stark zu schwach positiven Zellen in Bezug auf die Histonmodifikation H3K9ac korreliert mit den Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. Der Anteil der stark positiven Zellen zeigt sich in den Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 erhöht, während er in den Tumorzelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 nur erniedrigt nachweisbar ist. Kein subtypenspezifisches Expressionsmuster kann hingegen bei den Histonmodifikationen H2AK119ub und H3K4me3 dargestellt werden.

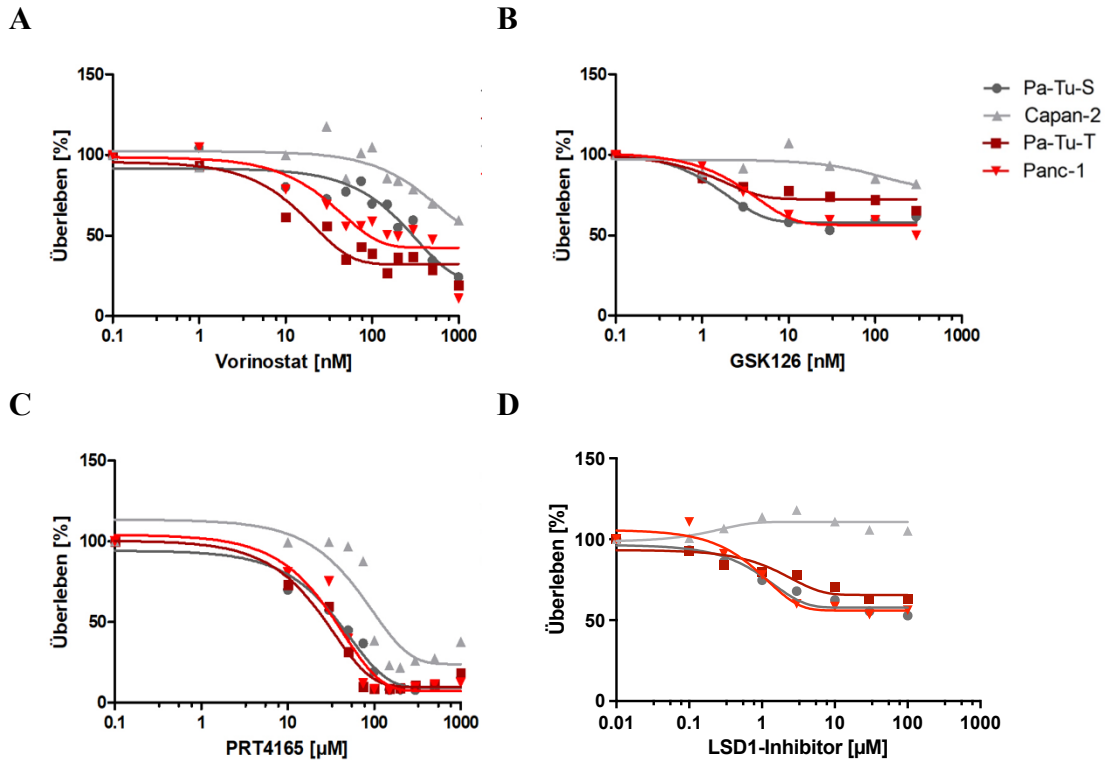
### **5.3. Behandlung mit epigenetischen Modulatoren**

Durch die weiteren experimentellen Untersuchungen galt es herauszufinden, ob durch die Behandlung mit epigenetischen Wirkstoffen eine Reprogrammierung der Tumorzellen erreicht werden kann. Dies könnte einen entscheidenden Beitrag leisten, Therapieoptionen durch eine veränderte Differenzierung der Tumorzellen wirksamer zu machen. Für die nachfolgenden Analysen wurden die vier epigenetischen Wirkstoffe PRT4165, Vorinostat, LSD1-Inhibitor und GSK126 verwendet.

#### **5.3.1. Überlebensrate nach epigenetischer Behandlung**

Um die Überlebensrate der Tumorzellen abhängig von den variierenden Konzentrationen der epigenetischen Inhibitoren darzustellen, wurden MTT-Tests durchgeführt (Abbildung 16). Im Anschluss daran wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) eines jeden Wirkstoffes bestimmt, um für folgende Analysen die optimale Dosierung der Inhibitoren in Bezug auf die ausgewählten Tumorzelllinien festzulegen. Die Zelllinien Pa-Tu-S, Capan-2, Pa-Tu-T und Panc-1 wurden daher mit ansteigenden Konzentrationen der epigenetischen Inhibitoren Vorinostat (0 - 1000 nM), GSK126 (0 - 300 nM), PRT4165 (0 - 1000  $\mu$ M) und LSD1-Inhibitor (0 - 100  $\mu$ M) für 72 Stunden behandelt. Dabei zeigt sich vor allem nach der Behandlung mit Vorinostat und PRT4165 ein Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen. Die quasimesenchymalen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 weisen gegenüber den klassischen Tumorzelllinien bessere Ansprechraten gegenüber Vorinostat und PRT4165 auf und sterben bereits bei niedrigeren Konzentrationen des Inhibitors ab. Die Tumorzellen der klassischen Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 reagieren hingegen erst bei höheren Dosierungen auf die Inhibitoren. Das Ansprechen der Tumorzellen ausgewählter Zelllinien korreliert somit in Bezug auf die Inhibitoren Vorinostat und PRT4165 mit den Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. Die epigenetischen Wirkstoffe GSK126 und LSD1-Inhibitor bewirkten lediglich ein geringes Absterben der Tumorzellen bei erst hohen Konzentrationen der Inhibitoren. In Bezug auf die Zelllinie Capan-2 lässt sich weiter feststellen, dass sie auf die epigenetischen Wirkstoffe nicht oder erst bei höheren Dosierungen reagiert. Sie scheint somit tendenziell eher resistent gegenüber den ausgewählten epigenetischen Inhibitoren zu sein.



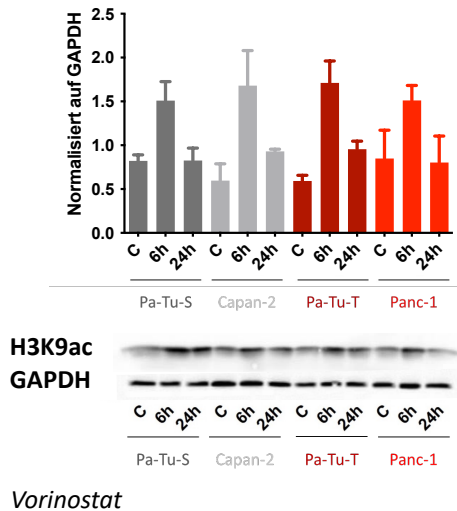


**Abbildung 16: Überlebensrate nach epigenetischer Behandlung.** Die Zelllinien Pa-Tu-S, Capan-2 sowie Pa-Tu-T und Panc-1 wurden über 72 h mit ansteigenden Konzentrationen der epigenetischen Inhibitoren (A) Vorinostat (0 - 1000 nM), (B) GSK126 (0 - 300 nM), (C) PRT4165 (0 - 1000 µM) und (D) LSD1-Inhibitor (0 - 100 µM) behandelt. Das Überleben der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Alle Daten sind als Mittelwert dargestellt (n = 3).

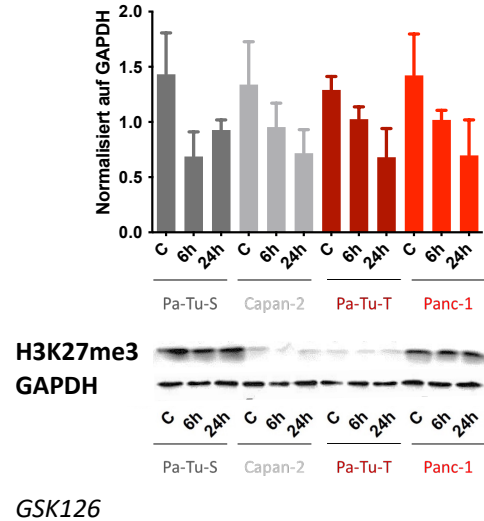
### 5.3.2. Western Blot Analyse spezifischer Histonmodifikationen nach epigenetischer Behandlung

Um die Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf Änderungen bei den Histonmodifikationen zu überprüfen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie Pa-Tu-T und Panc-1 wurden hierfür mit 150 nM Vorinostat, 20 nM GSK126, 50 µM PRT4165 oder 3 µM LSD1-Inhibitor für 6 und 24 Stunden behandelt.

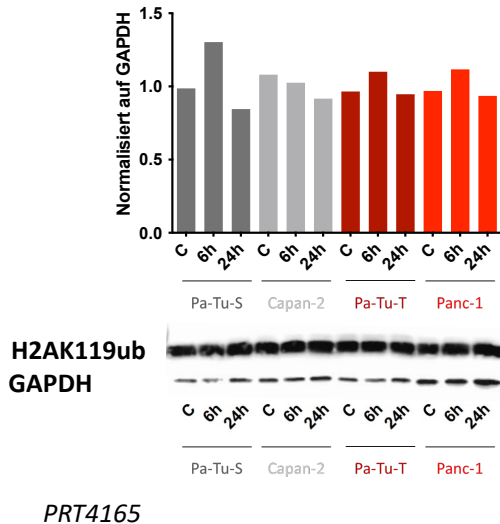
A



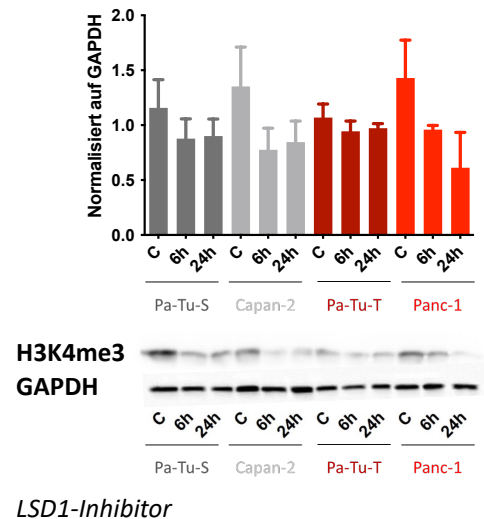
B



C



D



**Abbildung 17: Expressionsanalyse verschiedener Histonmodifikationen nach epigenetischer Behandlung.** Western Blot Analyse der Histonmodifikationen H3K9ac, H3K27me3, H2AK119ub, H3K4me3 und GAPDH. Die Zellen wurden mit (A) 150 nM Vorinostat, (B) 20 nM GSK126, (C) 50  $\mu$ M PRT4165 und (D) 3  $\mu$ M LSD1-Inhibitor behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 1-2) dargestellt, normalisiert auf GAPDH.

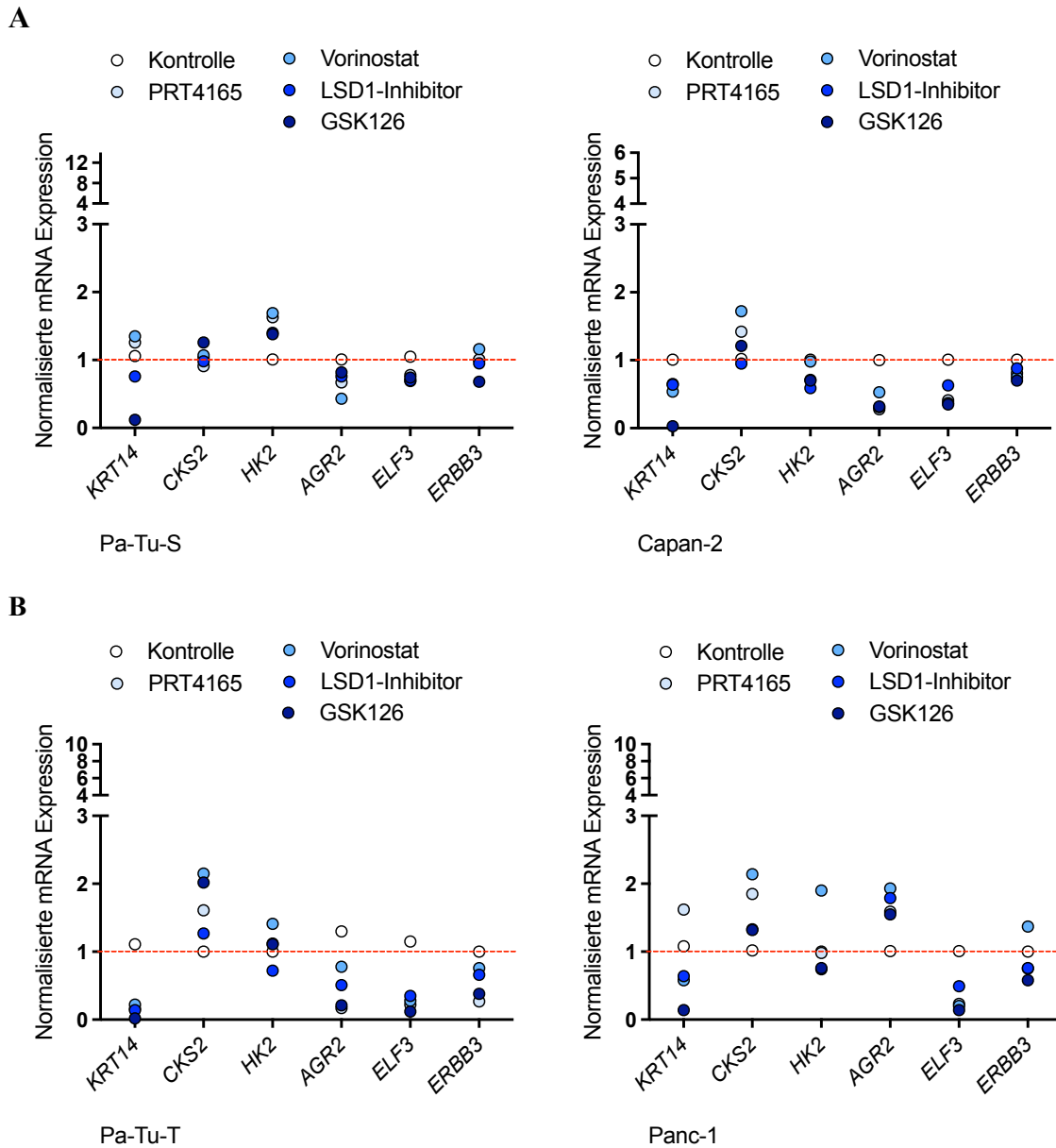
Der HDAC-Inhibitor Vorinostat weist einen positiven Effekt auf und bewirkt zum 6 Stunden-Zeitpunkt einen Anstieg der Acetylierung von H3K9ac (Abbildung 17A). Die erhöhte Acetylierung ist auf die Inhibierung von Histondeacetylasen zurückzuführen. Lediglich nach der Behandlung von Tumorzellen über 24 Stunden kann wieder ein Abfall der Histonmodifikation nachgewiesen werden. Eine gute Wirksamkeit kann auch bei dem

EZH2-Inhibitor GSK126 beobachtet werden. EZH2 ist eine Untereinheit des Proteinkomplexes PRC2 und katalysiert die Tri-Methylierung von H3K27 (Kim et al., 2016). Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle an beiden Zeitpunkten ein Rückgang der Methylierung von H3K27me3 in allen vier Zelllinien (Abbildung 17B). Der epigenetische Inhibitor PRT4165 blockiert den Proteinkomplex PRC1 und beeinflusst hierdurch die Ubiquitinierung von Histon H2A (Ismail et al., 2013). Obwohl die Tumorzellen dahingehend einen starken Rückgang bei den Überlebensraten gezeigt haben, konnte bei der verwendeten Konzentration des Inhibitors kein Verlust der Histonmodifikation H2AK119ub in der Western Blot Analyse detektiert werden (Abbildung 17C). Der LDS1-Inhibitor vermittelt seine Wirkung über die Inhibierung der entsprechenden Lysin-spezifischen Demethylase 1 und verringert hierdurch die Abspaltung von Methylgruppen an H3K4 (Dawson et al., 2012). Ein solcher Effekt auf die Histonmodifikation H3K4me3 kann in den Analysen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 17D).

### **5.3.3. Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene nach epigenetischer Behandlung**

Um herauszufinden, ob durch die Behandlung mit epigenetischen Wirkstoffen eine Reprogrammierung der Tumorzellen und eine Änderung des Expressionsprofils der subtypendefinierenden Gene induziert werden kann, wurde erneut eine Expressionsanalyse der subtypendefinierenden Gene nach epigenetischer Behandlung durchgeführt. Die Tumorzellen wurden zunächst über 24 Stunden mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Transkription der für den quasimesenchymalen Subtyp spezifischen Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* sowie der für den klassischen Subtyp spezifischen Gene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt (Abbildung 18). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen weisen die Expressionsprofile der behandelten Zelllinien einige Unterschiede auf. So stellt sich nach epigenetischer Behandlung beispielsweise eine erniedrigte Expression der klassisch-assoziierten Gene *AGR2* und *ELF3* in den klassischen Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 dar. Darüber hinaus zeigt sich *CKS2* in den quasimesenchymalen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 eher hoch- sowie *ELF3* eher herunterreguliert. In Bezug auf *AGR2* unterscheidet sich die Expression innerhalb des quasimesenchymalen Subtypen. Während sie in der Zelllinie Pa-Tu-T erniedrigt ist, stellt

sie sich in der Zelllinie Panc-1 erhöht dar. Allgemein kann keine subtypenspezifische Abhängigkeit der Genexpression in den verschiedenen Zelllinien nach der Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren festgestellt werden.



**Abbildung 18: qPCR-Analyse nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.** Die Tumorzellen der Zelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 des klassischen Subtypen (A) sowie der Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 des quasimesenchymalen Subtypen (B) wurden mit den epigenetischen Inhibitoren PRT4165 (50  $\mu$ M), Vorinostat (150 nM), LSD1-Inhibitor (3  $\mu$ M) oder GSK126 (20 nM) für 24 h behandelt. Die mRNA-Expressionswerte sind normalisiert auf unbehandelte Kontrollzellen als Mittelwert relativ zum Haushaltgen TBP dargestellt (n=1).

## **6. Diskussion**

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Todesursache aller Krebssterbefälle in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2019). Man geht davon aus, dass Bauchspeicheldrüsenkrebs bis 2030 die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache sein wird (Rahib et al., 2014). Aufgrund meist unspezifischer Symptome in fortgeschrittenen Krankheitsstadien erweist sich die Diagnosestellung als schwierig und das Tumorleiden wird häufig erst spät entdeckt. Eine kurative Behandlung durch die Resektion des Tumorgewebes ist häufig nicht mehr möglich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Umso wichtiger erscheint es daher, die Karzinogenese und Progression des Tumors als Grundlage für verbesserte Therapieoptionen und zielgerechtere Behandlungen besser zu verstehen (Hezel et al., 2006).

Durch die Beeinflussung diverser zellbiologischer Abläufe können epigenetisch regulierte Gene einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, die Tumorentstehung und -progression voranzutreiben (Su et al., 2016). Modulierungen an DNA- und Chromatinstrukturen beeinflussen die Expression verschiedenster Gene. Sie können so Tumorzellcharakteristika maßgeblich verändern und molekulare Tumorsubtypen schaffen (Paradise et al., 2018; Ciernikova et al., 2020). Epigenetische Therapieansätze könnten eine Veränderung des Tumorphänotypen erreichen und somit ein besseres Ansprechen auf vorhandene Behandlungsoptionen ermöglichen (Paradise et al., 2018; Verseemann et al., 2022).

Ziel dieser Arbeit war es, epigenetische Profile der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms zu erstellen und epigenetische Behandlungsmöglichkeiten zu untersuchen, die zu einer Reprogrammierung der Subtypen führen könnten.

### **6.1. Die Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms**

Anhand von Genexpressionsanalysen konnten zwei Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms definiert werden (Moffitt et al., 2015; Bailey et al., 2016; Chan-Seng-Yue et al., 2020). In dieser Arbeit wurde die von Collisson et al. im Jahr 2011 publizierte Einteilung zugrunde gelegt. Es wird dabei ein klassischer Subtyp von einem quasimesenchymalen Subtyp unterschieden (Collisson et al., 2011). Für die

durchgeführten Analysen wurden die Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2, repräsentativ für den klassischen Subtyp, sowie die Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1, repräsentativ für den quasimesenchymalen Subtyp, ausgewählt.

Den Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms werden morphologische und immunhistologische Zelleigenschaften zugeschrieben, welche in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnten. Der klassische Subtyp weist eine hohe Expression Adhäsions-assoziiierter und epithelialer Gene auf (Collisson et al., 2011; Moffitt et al., 2015; Raphael et al. 2017). Diese Beobachtung korreliert mit der epithelartigen Zellmorphologie und den engen Zell-Zell-Kontakten der repräsentativen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie der Expression des epithelialen Zellmarkers EPCAM in der Immunfluoreszenzfärbung. Das eher mesenchymale Expressionsprofil des quasimesenchymalen Subtypen (Collisson et al., 2011; Bailey et al., 2016; Chan-Seng-Yue et al., 2020) geht in den humanen Tumorzelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 mit einer erhöhten Nachweisbarkeit des mesenchymalen Markers Vimentin in der Immunfluoreszenzfärbung einher. Die Ergebnisse stützen die Klassifizierung von Pa-Tu-S und Capan-2 als klassische Tumorzelllinien sowie von Pa-Tu-T und Panc-1 als Zelllinien des quasimesenchymalen Subtyp. Der aggressivere Charakter des quasimesenchymalen Subtyp spiegelt sich darüber hinaus in den Proliferationsraten der ausgewählten Krebszelllinien wider. Die Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 weisen im Vergleich zu den klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 höhere Zellwachstumsraten auf. Ein subtypenabhängiges Ansprechen auf das Zytostatikum Gemcitabin konnte anhand der ausgewählten Tumorzelllinien nicht nachgewiesen werden. Bereits publizierte Daten zu subtypspezifischen Ansprechraten auf Chemotherapeutika weichen ebenfalls stark voneinander ab. So beschreibt Collisson et al. ein besseres Ansprechen auf Gemcitabin innerhalb des quasimesenchymalen Subtypen (Collisson et al., 2011). In späteren Analysen konnte hingegen gezeigt werden, dass Tumore des klassischen Subtyps besser auf Standard-Chemotherapeutika reagieren als Tumore des quasimesenchymalen Subtypen (Aung et al., 2018). Weitere Analysen mit größeren Kohorten an subtypspezifischen Tumorzelllinien oder definierten Patienten-basierten Organoidsystemen müssen zur weiteren Klärung eines subtypenbasierten Ansprechens auf Chemotherapie herangezogen werden.

Auf molekularer Ebene basiert die Klassifizierung in Subtypen auf spezifischen Genexpressionsprofilen. Es wurden daher einige subtypdefinierende Gene ausgewählt und deren Expression in den Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 sowie Pa-Tu-T und Panc-1 analysiert. Dabei konnte eine erhöhte Transkription der epithelialen Differenzierungsgene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* in den klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen Zelleigenschaften der klassischen Tumorzelllinien und stimmt zudem mit den von Collisson et al. publizierten Erkenntnissen überein (Collisson et al., 2011). In mehreren Untersuchungen wurde darüber hinaus eine negative Korrelation epithelialer Marker zum quasimesenchymalen Subtyp beschrieben (Bailey et al., 2016; Chan-Seng-Yue et al., 2020). Passend dazu ergab sich eine deutlich reduzierte Expression der klassisch-assoziierten Gene *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* in den quasimesenchymalen Tumorzelllinien Pa-Tu-T und Panc-1. Eine erhöhte Transkriptionsrate der mesenchymal-assoziierten Gene *KRT14*, *CKS2* und *HK2* konnte in den Tumorzelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 nicht dargestellt werden (Collisson et al., 2011). In dieser Arbeit wurden anhand globaler Genexpressionsanalysen die Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 repräsentativ für den klassischen Subtyp sowie die Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 repräsentativ für den quasimesenchymalen Subtyp ausgewählt. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass anhand der ausgewählten Tumorzelllinien kein konstant subtypenabhängiges Expressionsprofil analysierter Gene abgebildet werden kann.

Insgesamt gesehen kann die Einteilung des duktales Pankreaskarzinoms in Subtypen durch morphologische und immunhistologische Unterschiede bekräftigt werden. Darüber hinaus ergibt sich eine therapeutische Relevanz mit unterschiedlichem Therapieansprechen auf das Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Zudem haben sich die epithelialen Marker *AGR2*, *ELF3* und *ERBB3* als Gene herausgestellt, welche mit dem klassischen Subtyp korrelieren.

## **6.2. Das epigenetische Profil der verschiedenen Subtypen**

Genetische Veränderungen allein, allen voran Mutationen in den Genen *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4*, können viele Aspekte der Tumorerheterogenität nicht erklären. Vielmehr scheinen die Tumorzellcharakteristika das Ergebnis mehrerer Faktoren zu sein (Lomberg et al., 2018; Juiz et al., 2019). Einen wichtigen Schlüsselbereich stellt dabei die

Epigenetik dar. Epigenetische Strukturen prägen durch vererbare Veränderungen der DNA- und Chromatinstrukturen die Expression vieler Gene. Sie beeinflussen dadurch zellbiologische Prozesse und scheinen mitunter die verschiedenen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms zu kontrollieren (Mishra et al., 2017; Lomberk et al., 2018; Patil et al., 2020). Weiter galt es daher zu überprüfen, ob subtypendefinierende Gene epigenetisch reguliert werden und ob sich epigenetische Profile der Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms voneinander unterscheiden.

Gestützt werden kann die Annahme der epigenetischen Regulation subtypenbestimmender Gene durch die Darstellung epigenetischer Modulationsmöglichkeiten an den jeweiligen Transkriptionsstartpunkten. Es zeigte sich dabei, dass sowohl für den klassischen-, als auch für den quasimesenchymalen Subtyp relevante Gene epigenetisch reguliert sind. Dass sich die Ausprägung der epigenetischen Modifikationen dabei zwischen den Subtypen unterscheidet, zeigt die Analyse bestimmter Acetylierungsmuster an den Transkriptionsstartpunkten subtypenklassifizierender Gene. So weisen Gene, welche dem quasimesenchymalen Tumorsubtyp zugeordnet sind, signifikant mehr Histonacetylierungen auf. Es wurde dazu das gesamte von Collisson et al. publizierte Cluster subtypendefinierender Gene auf die Histonmodifikation H3K27ac untersucht (Collisson et al., 2011). Bereits Lomberk et al. konnte zeigen, dass tumorrelevante Gene eine hohe Assoziation zu epigenetischen Markierungen aufweisen und die Subtypen des Pankreaskarzinoms durch verschiedene epigenomische Signaturen geprägt sind (Lomberk et al., 2018). Das spiegelt sich auch in den epigenetischen Profilen der Subtypen wider. Es wurde dazu die Genexpression von Histon- und DNA-modifizierenden Enzymen untersucht, welche unter anderem eine Histonacetylierung (*CREBBP*, *EP300*) oder -deacetylierung (*HDAC1*, *CHD4*), eine Histon- (*SETD1A*, *SUZ12*, *EZH2*) oder auch DNA-Methylierung (*DNMT1*) sowie Histon-Demethylierung (*KDM6A*, *KDM3A*) bewirken. Die Transkriptionsniveaus der epigenetischen Remodeler ähnelten sich dabei innerhalb der Subtypen und ließen zugleich eine Abgrenzung des klassischen gegenüber des quasimesenchymalen Subtypen zu. Analysiert man weiter die absolute Proteinkonzentration der zugehörigen transkriptionsrepressiven Histonmodifikationen H3K27me<sub>3</sub>, H3K9me<sub>3</sub> und H2AK119ub sowie der transkriptionsaktivierenden Histonmodifikationen H3K4me<sub>3</sub>, H3K36me<sub>3</sub> und H3K9ac kann allerdings keine Korrelation zu den Subtypen nachgewiesen werden. Unberücksichtigt bleibt dabei, dass die vielfältigen epigenetischen



Modifikationen an den Transkriptionsstartpunkten der Zielgene individuell ausgeprägt sind. So ergeben sich unterschiedliche Genexpressionsprofile, welche die Tumorzellcharakteristika der Subtypen bestimmen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms durch unterschiedliche epigenetische Profile geprägt sind. In Anbetracht der hohen Komplexität epigenomischer Signaturen sind weiterführende Analysen dringend notwendig, um ein fundierteres Verständnis zu erlangen und die Zusammenhänge epigenetischer Veränderungen in Hinblick auf die verschiedenen Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms zu erfassen.

### **6.3. Gezielte Therapieansätze durch epigenetische Behandlungsmöglichkeiten**

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit des Pankreaskarzinoms liegt unter 10 % (Robert Koch-Institut, 2019). Verbunden ist die schlechte Prognose und Therapierbarkeit der Erkrankung mit einem hohen Maß an inter- und intratumoraler Heterogenität (Verseemann et al., 2022). Eine entscheidende Rolle scheinen dabei epigenetische Mechanismen zu spielen (Juiz et al., 2019). Aufgrund der Reversibilität epigenetischer Modifikationen könnten epigenetische Behandlungsmöglichkeiten durch eine Reprogrammierung der Tumorzellen neue Therapiemöglichkeiten eröffnen (Paradise et al., 2018). Ziel dabei ist es, eine Veränderung des Tumorphänotypen zu erreichen und damit das Ansprechen auf vorhandene Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern (Paradise et al., 2018; Verseemann et al., 2022). In dieser Arbeit wurden dafür die epigenetischen Wirkstoffe Vorinostat, GSK126, PRT4165 und LSD1-Inhibitor untersucht.

Einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen zeigte zunächst der epigenetische Inhibitor Vorinostat. Nach epigenetischer Behandlung konnte ein starker Rückgang der Tumorzellen beobachtet werden. Die quasimesenchymalen Zelllinien Pa-Tu-T und Panc-1 wiesen dabei gegenüber den klassischen Tumorzelllinien Pa-Tu-S und Capan-2 bessere Ansprechraten auf. Die Überlebensrate der Tumorzellen korrelierte folglich mit den Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. Der HDAC-Inhibitor bewirkt eine Aktivierung der Genexpression, indem er den Grad der Acetylierung von Histonen erhöht (Verseemann et al., 2022). Übereinstimmend damit konnte nach epigenetischer Behandlung ein Anstieg der Acetylierung von H3K9ac nachgewiesen werden. Dieser

Effekt zeigte sich in allen vier Tumorzelllinien gleichermaßen. Bereits in der Vergangenheit konnten mit Inhibitoren von Histondeacetylasen therapeutische Erfolge erzielt werden. So wurden unter anderem Vorinostat, Romidepsin und Belinostat zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Van Kampen et al., 2014; Ho et al., 2020). Während die Inhibitoren bei hämatoonkologischen Erkrankungen gutes Ansprechen zeigen, sind die klinischen Erfolge in Hinblick auf das Pankreaskarzinom noch begrenzt (Verseemann et al., 2022). Grund dafür könnte die eher geringe Spezifität der HDAC-Inhibitoren sein, welche durch die unterschiedlichen funktionellen Beteiligungen der verschiedenen HDAC-Klassen zu erklären ist. Die Inhibitoren der Histondeacetylasen konnten mit unerwünschten und teils tumorfördernden Nebeneffekten in Verbindung gebracht werden. Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte durch Kombinationstherapien erzielt werden, welche nun im Fokus der weiteren Forschung stehen (Mazur et al., 2015; Hessmann et al., 2017). Auch ein EZH2-Inhibitor hat im Jahr 2020 bereits Einzug in die Klinik gefunden. Das Medikament Tazemetostat wurde zur Behandlung eines lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Epitheloidsarkoms bei Erwachsenen und Jugendlichen ab 16 Jahren zugelassen (Hoy, 2020). Es verringert die Methylierung von H3K27, was auch in Bezug auf den Inhibitor GSK126 dargestellt werden konnte. Nach epigenetischer Behandlung mit dem EZH2-Inhibitor konnte ein Rückgang der Methylierung von H3K27me3 in allen Tumorzelllinien aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, dass EZH2 durch die Methylierung von H3K27 Gene stilllegt und so eine verringerte Differenzierung von Tumorzellen erreicht (Kim et al., 2016; Patil et al., 2020). Hinsichtlich der Überlebensraten bewirkte der epigenetische Inhibitor in der vorliegenden Arbeit lediglich ein geringes Absterben der Tumorzellen bei erst hohen Konzentrationen. Gegenteiliges konnte dabei nach der Behandlung mit dem Inhibitor PRT4165 dargestellt werden. Es zeigte sich nach epigenetischer Behandlung ein gutes Ansprechen der Tumorzellen mit deutlichem Rückgang der Überlebensraten. Die Ansprechrate der Tumorzellen korrelierte zudem mit den Subtypen des duktales Pankreaskarzinoms. Allerdings konnte ein Verlust der Histonmodifikation H2AK119ub in der Immunoblot Analyse nicht nachgewiesen werden. Eine gute Wirksamkeit von PRT4165 mit deutlichem Rückgang der Histonmodifikation H2AK119ub nach epigenetischer Behandlung wurde aber in vorangehenden Publikationen bereits aufgezeigt (Benitz et al., 2019). Grund für die abweichenden Ergebnisse könnte die verwendete Dosierung des Inhibitors oder auch die Behandlungsdauer sein. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die epigenetischen

Inhibitoren Vorinostat und PRT4165 gute Ansprechraten in Hinblick auf das Überleben von Tumorzellen verzeichneten. Auf molekularer Ebene konnte jedoch nur bei den epigenetischen Wirkstoffen Vorinostat und GSK126 eine gute Wirksamkeit und Veränderungen der Histonmodifikationslevel nachgewiesen werden. Für den epigenetischen Wirkstoff LSD1-Inhibitor konnten sowohl bei den Überlebensraten als auch in der Analyse der Histonmodifikation H3K4me3 keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Eine abschließende Untersuchung der Expressionsanalyse subtypendefinierender Gene nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren diente der Frage, ob durch die Behandlung mit epigenetischen Wirkstoffen eine Änderung des Expressionsprofils subtypenbestimmender Gene erreicht werden kann. Dabei muss festgestellt werden, dass eine Reprogrammierung der Tumorzellen zugunsten weniger aggressiver Tumorzellcharakteristika nicht nachgewiesen werden konnte. Vielmehr zeigte sich unter anderem ein gegenteiliger Effekt in den klassischen Tumorzelllinien. Nach epigenetischer Behandlung war dort ein Verlust der epithelialen Differenzierungsgene *AGR2* und *ELF3* darstellbar. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den vielversprechenden Untersuchungen der letzten Jahre. So konnte bereits gezeigt werden, dass der epigenetische Wirkstoff PRT4165 durch die Unterdrückung der Ring1b-katalysierten Ubiquitinierung von H2AK119 einen höheren Differenzierungsgrad der Tumorzellen erreicht (Benitz et al., 2016; Benitz et al., 2019). Auch der EZH2-Inhibitor GSK126 zielt auf einen Schlüsselmechanismus ab, welcher sich als Target für einen Wechsel des Tumorsubtypen erwiesen hat (Kim et al., 2016; Patil et al., 2020). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression des von EZH2 regulierten Transkriptionsfaktors *GATA6* zu einem klassischen Tumorphänotypen führen kann. Wird die Expression von *EZH2* inhibiert, kann die Transkription von *GATA6* reaktiviert und die Genrepression aufgehoben werden (Lomberk et al., 2018; Adams et al., 2019; Patil et al., 2020).

Das zunehmende Verständnis epigenetischer Beteiligung an der Tumorentstehung und -progression bestärkt das große Potential gezielter Therapieansätze durch epigenetische Behandlungsmöglichkeiten. Es bleibt daher zuversichtlich abzuwarten, inwieweit epigenetische Schlüsselmechanismen und daraus entstehende Ansatzpunkte gezielter

Therapien die Behandlungsmöglichkeiten des dukalen Pankreaskarzinoms beeinflussen und erweitern können.

#### 6.4. Fazit und Ausblick

Die Beobachtungen und bereits gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die hohe Komplexität epigenetischer Mechanismen und Therapieansätze. Ziel weiterer Forschung muss es sein, die epigenomischen Strukturen, ihre Zusammenhänge und Wechselwirkungen besser zu verstehen. Eine besondere Herausforderung stellt dabei sicherlich der dynamische Charakter epigenetischer Modifikationen dar. Er birgt jedoch zugleich das große Potential epigenetischer Behandlungsmöglichkeiten. Spezifische Inhibitoren epigenetischer Enzyme sind in der Lage, Tumorphänotypen zu verändern, ein verbessertes Therapieansprechen zu erreichen und damit die Prognose positiv zu beeinflussen (Paradise et al., 2018; Versemann et al., 2022). Klinische Studien werden durch den aggressiven Charakter der Erkrankung sowie die begrenzte Überlebenszeit der Patienten deutlich erschwert. Dennoch muss es das Ziel bleiben, positive in-vitro Ergebnisse in die Klinik zu übertragen. Es ist dafür notwendig, die Wirksamkeit und Spezifität epigenetischer Inhibitoren weiter zu verbessern. Zudem muss das Verständnis der Wirkmechanismen weiter ausgebaut werden. Aktuell eher unwahrscheinlich erscheint ein Therapieerfolg durch epigenetische Monotherapien. Eine bedeutende Rolle könnten Kombinationstherapien spielen, ausgerichtet auf verringerte Therapieresistenzen und ein verbessertes Outcome. Daneben sind jedoch auch personalisierte, auf die individuell molekularen und zellulären Tumoraussetzungen angepasste Behandlungsstrategien denkbar. In den letzten Jahren konnten vielversprechende Fortschritte im Verständnis um die molekulare und zelluläre Heterogenität des Pankreaskarzinoms sowie mögliche Targets für gezielte Therapieansätze durch epigenetische Behandlungsmöglichkeiten erreicht werden. Die Umprogrammierung von Tumorzellen verbunden mit weniger aggressiven Tumorzelleigenschaften und einem verbesserten Therapieansprechen birgt enormes Potenzial (Paradise et al., 2018; Versemann et al., 2022). Es gilt daher auf diesen Erkenntnissen aufzubauen, um betroffenen Patienten den Blick und die Hoffnung auf optimierte Therapiemöglichkeiten und eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit zu ermöglichen.

## 7. Literaturverzeichnis

Adams, C. R., Htwe, H., Marsh, T., Wang, A. L., Montoya, M. L., Subbaraj, L., Tward, A. D., Bardeesy, N., Perera, R. M. (2019). *Transcriptional control of subtype switching ensures adaptation and growth of pancreatic cancer*. eLife 8:e45313.

<https://doi.org/10.7554/eLife.45313>

Adsay, V., Mino-Kenudson, M., Furukawa, T., Basturk, O., Zamboni, G., Marchegiani, G., Tajiri, T., ... Members of Verona Consensus Meeting, 2013 (2016). *Pathologic Evaluation and Reporting of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas and Other Tumoral Intraepithelial Neoplasms of Pancreatobiliary Tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting*. Annals of surgery, 263(1), 162–177. doi: 10.1097/SLA.0000000000001173

Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., ... Esposito, I. (2012). *Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues*. The Journal of Pathology, 226(5), 723–734. doi:10.1002/path.3017

American College of Physicians (1997). *Guidelines for assessing and managing the perioperative risk from coronary artery disease associated with major noncardiac surgery*. Annals of internal medicine, 127(4), 309–312. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-4-199708150-00011>

Andreotti, G., & Silverman, D. T. (2011). *Occupational risk factors and pancreatic cancer: A review of recent findings*. Molecular Carcinogenesis, 51(1), 98–108. doi:10.1002/mc.20779

Andricovich, J., Perkill, S., Kai, Y., Casasanta, N., Peng, W., Tzatsos, A. (2018). *Loss of KDM6A Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to BET Inhibitors*. Cancer Cell, 33(3), 512–526.e8. doi:10.1016/j.ccell.2018.02.003

Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A. et al. (2020). *Duale Reihe Anatomie*. Thieme, Hrsg. 5. Auflage. doi:10.1055/b-007-170976

Aung, K. L., Fischer, S. E., Denroche, R. E., Jang, G. H., Dodd, A., ... & Knox, J. J. (2018). *Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 24(6), 1344–1354. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2994>

Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A.- M., ... Bruxner, T. J. C. (2016). *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer*. Nature, 531(7592), 47–52. doi:10.1038/nature16965

Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Research, 21(3), 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22

Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). *Pancreatic cancer biology and genetics*. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897–909. doi:10.1038/nrc949

Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., ... Furukawa, T. (2015). *A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas*. *The American Journal of Surgical Pathology*, 39(12), 1730–1741. doi:10.1097/pas.0000000000000533

Becker, A. E. (2014). *Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(32), 11182. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11182

Benitz, S., Regel, I., Reinhard, T., Popp, A., Schäffer, I., Raulefs, S., Kong, B., Esposito, I., Michalski, C. W., Kleeff, J. (2016). *Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells*. *Oncotarget*; 7: 11424-11433. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6717>

Benitz, S., Straub, T., Mahajan, U. M., Mutter, J., Czernmel, S., Unruh, T., Wingerath, B., Deubler, S., Fahr, L., Cheng, T., Nahnsen, S., Bruns, P., Kong, B., Raulefs, S., Ceyhan, G. O., Mayerle, J., ... Regel, I. (2019). *Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis*. *Gut*, gutjnl-2018-317208. doi:10.1136/gutjnl-2018-317208

Beyer, G., Habtezion, A., Werner, J., Lerch, M. M., & Mayerle, J. (2020). *Chronic pancreatitis*. *Lancet (London, England)*, 396(10249), 499–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31318-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31318-0)

Bird, A. (2002). *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. doi:10.1101/gad.947102

Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., ... La Vecchia, C. (2011). *Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4)*. *Annals of Oncology*, 23(7), 1880–1888. doi:10.1093/annonc/mdr541

Brueckner, B., Kuck, D., & Lyko, F. (2007). *DNA Methyltransferase Inhibitors for Cancer Therapy*. *The Cancer Journal*, 13(1), 17–22. doi:10.1097/ppo.0b013e31803c7245

Castellano-Megias, V. M., Andres, C. I., Lopez-Alonso, G. and Colina-Ruizdelgado, F. (2014). *Pathological features and diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas*. *World J Gastrointest Oncol* 6 (9): 311-324. doi: 10.4251/wjgo.v6.i9.311

Chakraborty, S., & Singh, S. (2013). *Surgical resection improves survival in pancreatic cancer patients without vascular invasion- a population based study*. *Annals of gastroenterology*, 26(4), 346–352. PMID: 24714323; PMCID: PMC3959484

Chan-Seng-Yue, M., Kim, J. C., Wilson, G. W., Ng, K., Figueroa, E. F., O'Kane, G. M., ... Notta, F. (2020). *Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution*. *Nature genetics*, 52(2), 231–240. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0566-9>

Chandana, S., Babiker, H., & Mahadevan, D. (2018). *Therapeutic Trends in Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. doi:10.1080/13543784.2019.1557145

Cheng, X., & Blumenthal, R. M. (2008). *Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective*. *Structure*, 16(3), 341–350. doi:10.1016/j.str.2008.01.004

Chhoda, A., Lu, L., Clerkin, B. M., Risch, H., & Farrell, J. J. (2019). *Current Approaches to Pancreatic Cancer Screening*. *The American Journal of Pathology*, 189(1), 22–35. doi:10.1016/j.ajpath.2018.09.013

Chikhladze, S., Lederer, A-K., Kousoulas, L., Reinmuth, M., Sick, O., Fichtner-Feigl, S. & Wittel, U. A. (2019). *Adjuvant chemotherapy after surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma: retrospective real-life data*. *World Journal of Surgical Oncology*, 17:185. <https://doi.org/10.1186/s12957-019-1732-3>

Ciernikova, S., Earl, J., García Bermejo, M. L., Stevurkova, V., Carrato, A., & Smolkova, B. (2020). *Epigenetic Landscape in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: On the Way to Overcoming Drug Resistance?* *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4091. doi:10.3390/ijms21114091

Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). *The Biology of Chromatin Remodeling Complexes*. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 273–304. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223

Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., Peterson, C. L. (2017). *Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/nrm.2017.26

Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., ... Gray, J. W. (2011). *Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy*. *Nature Medicine*, 17(4), 500–503. doi:10.1038/nm.2344

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., ... & PRODIGE Intergroup (2011). *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *The New England journal of medicine*, 364(19), 1817–1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>

Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Abdelghani, M. B., Wei, A.C., Raoul, J. L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E. et al. (2018). *FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer*. *N Engl J Med*, 379:2395-2406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775

Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). *Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy*. *Cell*, 150(1), 12–27. doi:10.1016/j.cell.2012.06.013



- Diaferia, G. R., Balestrieri, C., Prosperini, E., Nicoli, P., Spaggiari, P., Zerbi, A., Natoli, G. (2016). *Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer*. *The EMBO Journal*, 35(6), 595–617. doi:10.15252/embj.201592404
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., ... Takasaki, K. (2008). *Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: Final results of a randomized multi-institutional trial*. *Surgery Today*, 38(11), 1021–1028. doi:10.1007/s00595-007-3745-8
- Dong-Jun, F., Jun, L., Bin, Y. (2021). *Annual review of LSD1/KDM1A inhibitors in 2020*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113254
- Dubois, P. M. (1999). *The Exocrine and Endocrine Pancreas: Embryology and Histology*. *Medical Radiology*, 1–8. doi:10.1007/978-3-642-58380-3\_1
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). *Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414. doi:10.3390/ijms18071414
- Eibl, G., Cruz-Monserrate, Z., Korc, M., Petrov, M. S., Goodarzi, M. O., Fisher, W. E., ... Andersen, D. K. (2018). *Diabetes Mellitus and Obesity as Risk Factors for Pancreatic Cancer*. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 118(4), 555–567. doi:10.1016/j.jand.2017.07.005
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., Klöppel, G. (2014). *Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments*. *World J Gastroenterol*; 20(38): 13833-13841. doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13833
- Esposito, I., Schlitter, A. M., Sipos, B., & Klöppel, G. (2014). *Klassifikation und malignes Potenzial der zystischen Pankreastumoren*. *Der Pathologe*, 36(1), 99–114. doi:10.1007/s00292-014-1971-6
- Esteller, M. (2002). *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. *Oncogene*, 21(35), 5427–5440. doi:10.1038/sj.onc.1205600
- Fahy, J., Jeltsch, A., & Arimondo, P. B. (2012). *DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(12), 1427–1442. doi:10.1517/13543776.2012.729579
- Fang, Y., Liao, G., & Yu, B. (2019). *LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects*. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). doi:10.1186/s13045-019-0811-9
- Flowers, B. M., Xu, H., Mulligan, A. S., Hanson, K. J., Seoane, J. A., Vogel, H., Curtis, C., Wood, L. D. & Attardi, L. D. (2021). *Cell of origin influences pancreatic cancer subtype*. *Cancer discovery*, 11(3), 660-677. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0633>

- Fritsche, P., Seidler, B., Schuler, S., Schnieke, A., Gottlicher, M., Schmid, R. M., Saur, D., Schneider, G. (2009). *HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA*. *Gut*, 58(10), 1399–1409. doi:10.1136/gut.2009.180711
- Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., ... Smith-Warner, S. A. (2009). *Alcohol Intake and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis of Fourteen Cohort Studies*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(3), 765–776. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0880
- Giardiello, F. M., Brensinger, J. D., Tersmette, A. C., Goodman, S. N., Petersen, G. M., Booker, S. V., ... Offerhaus, J. A. (2000). *Very high risk of cancer in familial Peutz–Jeghers syndrome*. *Gastroenterology*, 119(6), 1447–1453. doi:10.1053/gast.2000.20228
- Goldstein, D., El-Maraghi, R. H., Hammel, P., Heinemann, V., Kunzmann, V., ... & Von Hoff, D. D. (2015). *nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial*. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(2), dju413. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju413>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). *Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer*. *Molecular and Cellular Changes in the Cancer Cell*, 241–275. doi:10.1016/bs.pmbts.2016.09.008
- Grzenda, A., Ordog, T., & Urrutia, R. (2011). *Polycomb and the emerging epigenetics of pancreatic cancer*. *Journal of gastrointestinal cancer*, 42(2), 100–111. <https://doi.org/10.1007/s12029-011-9262-4>
- Haeberle, L., & Esposito, I. (2019). *Pathology of pancreatic cancer. Translational Gastroenterology and Hepatology*, 4, 50. doi:10.21037/tgh.2019.06.02
- Henry, B. M., Skinningsrud, B., Saganiak, K., Pękala, P. A., Walocha, J. A., & Tomaszewski, K. A. (2018). *Development of the Human Pancreas and its Vasculature – An Integrated Review Covering Anatomical, Embryological, Histological, and Molecular Aspects*. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. doi:10.1016/j.aanat.2018.09.008
- Hessmann, E., Johnsen, S. A., Siveke, J. T., Ellenrieder, V. (2017). *Epigenetic treatment of pancreatic cancer: is there a therapeutic perspective on the horizon?*. *Gut*, 66(1), 168–179. doi:10.1136/gutjnl-2016-312539
- Hezel, A. F. (2006). *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes & Development*, 20(10), 1218–1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Hishinuma, S., Ogata, Y., Tomikawa, M., Ozawa, I., Hirabayashi, K., & Igarashi, S. (2006). *Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings*. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 10(4), 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.gassur.2005.09.016>
- Ho, T., Chan, A., & Ganesan, A. (2020). *Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 hindsight*. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00830

- Holly, E. A., Chaliha, I., Bracci, P. M., & Gautam, M. (2004). *Signs and symptoms of pancreatic cancer: a population-based case-control study in the San Francisco Bay area*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2(6), 510–517. doi:10.1016/s1542-3565(04)00171-5
- Hoy, S. M. (2020). *Tazemetostat: First Approval*. *Drugs*. doi:10.1007/s40265-020-01288-x
- Hruban, R. H., Maitra, A., Goggins, M. (2008). "Update on pancreatic intraepithelial neoplasia." *Int J Clin Exp Pathol* 1 (4): 306-316
- Hwang, W. L., Jagadeesh, K. A., Guo, J. A., Hoffman, H. I., Yadollahpour, P., Mohan, R., ... Regev, A. (2020). *Single-nucleus and spatial transcriptomics of archival pancreatic cancer reveals multi-compartment reprogramming after neoadjuvant treatment*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.267336>
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). *Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis*. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393(4), 535–545. doi:10.1007/s00423-007-0266-2
- Isaji, S., Mizuno, S., Windsor, J. A., Bassi, C., Fernández-del Castillo, C., Hackert, T., Hayasaki, A., Katz, M. H.G., Kim, S., Kishiwada, M., Kitagawa, H., Michalski, C. W., Wolfgang, C. L. (2017). *International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017*. *Pancreatology*, S1424390317308864. doi:10.1016/j.pan.2017.11.011
- Ismail, I. H., McDonald, D., Strickfaden, H., Xu, Z., & Hendzel, M. J. (2013). *A Small Molecule Inhibitor of Polycomb Repressive Complex 1 Inhibits Ubiquitin Signaling at DNA Double-strand Breaks*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26944–26954. doi:10.1074/jbc.m113.461699
- Jenuwein, T. (2001). *Translating the Histone Code*. *Science*, 293(5532), 1074–1080. doi:10.1126/science.1063127
- Johansson, C., Tumber, A., Che, K., Cain, P., Nowak, R., Gileadi, C., & Oppermann, U. (2014). *The roles of Jumonji-type oxygenases in human disease*. *Epigenomics*, 6(1), 89–120. doi:10.2217/epi.13.79
- Jones, P. A., Ohtani, H., Chakravarthy, A., & De Carvalho, D. D. (2019). *Epigenetic therapy in immune-oncology*. *Nature Reviews Cancer*. doi:10.1038/s41568-019-0109-9
- Juiz, N. A., Iovanna, J. & Duseti, N. (2019). *Pancreatic Cancer Heterogeneity can be Explained Beyond the Genome*. *Front. Oncol.* 9:246. doi:10.3389/fonc.2019.00246
- Juliano, C. N., Izetti, P., Pereira, M. P., Dos Santos, A. P., Bravosi, C. P., Abujamra, A. L., Prolla, P. A., Osvaldt, A. B., & Edelweiss, M. I. (2016). *H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer*. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology, AIMM*, 24(5), 337–344. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000194>

Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., Goggins, M. (2012). *Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*. *Gastroenterology* 142 (4): 730-733 e739. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.042

Keim, V., Klar, E., Poll, M., & Schoenberg, M. H. (2009). *Postoperative Care Following Pancreatic Surgery*. *Deutsches Aerzteblatt Online*. doi:10.3238/arztebl.2009.0789

Kim, K. H., & Roberts, C. W. M. (2016). *Targeting EZH2 in cancer*. *Nature Medicine*, 22(2), 128–134. doi:10.1038/nm.4036

Kimura, H. (2013). *Histone modifications for human epigenome analysis*. *Journal of Human Genetics*, 58(7), 439–445. doi:10.1038/jhg.2013.66

Kirsch, J., May, C., Lorke, D., Winkelmann, A., Schwab, W., Herrmann, G., Funk, R. (2017). *Taschenlehrbuch Anatomie*. Thieme, Hrsg. 2., überarbeitete Auflage. doi:10.1055/b-004-135641

Kleeff, J., Whitcomb, D. C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M. M., Gress, T., ... Neoptolemos, J. P. (2017). *Chronic pancreatitis*. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17060. doi:10.1038/nrdp.2017.60

Kouzarides, T. (2007). *Chromatin Modifications and Their Function*. *Cell*, 128(4), 0–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005

Kulis, M., & Esteller, M. (2010). *DNA Methylation and Cancer*. *Advances in Genetics*, 27–56. doi:10.1016/b978-0-12-380866-0.60002-2

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*. Elsevier health sciences.

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., ... Young R. A. (2006). *Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells*, 125(2), 0–313. doi:10.1016/j.cell.2006.02.043

Lefebvre, B., Belaich, S., Longue, J., Vandewalle, B., Oberholzer, J., Gmyr, V., Pattou, F., Kerr-conte, J. (2010). *5'-AZA induces Ngn3 expression and endocrine differentiation in the PANC-1 human ductal cell line*. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 0–309. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.054

Leiendecker, L., Jung, P. S., Krecioch, I., Neumann, T., Schleiffer, A., Mechtler, K., Wiesner, T., & Obenauf, A. C. (2020). *LSD1 inhibition induces differentiation and cell death in Merkel cell carcinoma*. *EMBO molecular medicine*, 12(11), e12525. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012525>

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), (2013). *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0*, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>

- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), (2021). *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0*, AWMF Registernummer: 032-010OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/pankreaskarzinom/>
- Leung, P. S. (2010). *Overview of the Pancreas. The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*, 3–12. doi:10.1007/978-90-481-9060-7\_1
- Lomberk, G., Blum, Y., Nicolle, R., Nair, A., Gaonkar, K. S., Marisa, L., ... Urrutia, R. (2018). *Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes*. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-04383-6
- Lomberk, G., Dusetti, N., Iovanna, J., Urrutia, R. (2019). *Emerging epigenomic landscapes of pancreatic cancer in the era of precision medicine*. *Nat Commun* 10, 3875. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11812-7>
- Luchini, C., Capelli, P., & Scarpa, A. (2016). *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants*. *Surgical Pathology Clinics*, 9(4), 547–560. doi:10.1016/j.path.2016.05.003
- Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Hrsg. 6., vollständig überarbeitete Auflage. doi:10.1055/b-006-163361
- Lund, H., Tønnesen, H., Tønnesen, M. H., & Olsen, O. (2006). *Long-term recurrence and death rates after acute pancreatitis*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(2), 234–238. doi:10.1080/00365520510024133
- Lyko, F., & Brown, R. (2005). *DNA Methyltransferase Inhibitors and the Development of Epigenetic Cancer Therapies*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(20), 1498–1506. doi:10.1093/jnci/dji311
- Lynch, S. M., Vrieling, A., Lubin, J. H., Kraft, P., Mendelsohn, J. B., Hartge, P., ... Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2009). *Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer: A Pooled Analysis From the Pancreatic Cancer Cohort Consortium*. *American Journal of Epidemiology*, 170(4), 403–413. doi:10.1093/aje/kwp134
- Majumder, S., & Chari, S. T. (2016). *Chronic pancreatitis*. *The Lancet*, 387(10031), 1957–1966. doi:10.1016/s0140-6736(16)00097-0
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life*. *Nature*, 469(7330), 343–349. doi:10.1038/nature09784
- Martínez-Romero, C., Rooman, I., Skoudy, A., Guerra, C., Molero, X., González, A., ... Hernández-Muñoz, I. (2009). *The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma*. *The Journal of Pathology*, 219(2), 205–213. doi:10.1002/path.2585
- Mayerle, J., Sandler, M., Hegyi, E., Beyer, G., Lerch, M. M., & Sahin-Tóth, M. (2019). *Genetics and pathophysiology of pancreatitis*. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2018.11.081

- Mazur, P., Herner, A., Mello, S., ... & Siveke, J. T. (2015). *Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Nat Med* 21, 1163–1171.  
<https://doi.org/10.1038/nm.3952>
- Meidhof, S., Brabletz, S., Lehmann, W., Preca, B. T., Mock, K., Ruh, M., Schuler, J., ... Brabletz, T. (2015). *ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat*. *EMBO Molecular Medicine*, 7(6), 831–847.  
doi:10.15252/emmm.201404396
- Milan, M., Diaferia, G. R., & Natoli, G. (2021). *Tumor cell heterogeneity and its transcriptional bases in pancreatic cancer: a tale of two cell types and their many variants*. *The EMBO Journal*, 40(13), e107206.  
<https://doi.org/10.15252/embj.2020107206>
- Miranda Furtado, C. L., dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. da, Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). *Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment*. *Epigenetics*. doi:10.1080/15592294.2019.1640546
- Mishra, N. K., Guda, C. (2017). *Genome-wide DNA methylation analysis reveals molecular subtypes of pancreatic cancer*. *Oncotarget*, 8(17).  
doi:10.18632/oncotarget.15993
- Mitchell, R., Byrne, M., & Baillie, J. (2003). *Pancreatitis*. *The Lancet*, 361(9367), 1447–1455. doi:10.1016/s0140-6736(03)13139-x
- Miyake, K., Yoshizumi, T., Imura, S., Sugimoto, K., Batmunkh, E., Kanemura, H., Morine, Y., Shimada, M. (2008). *Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ , Histone Deacetylase 1, and Metastasis-Associated Protein 1 in Pancreatic Carcinoma*. *Pancreas*, 36(3), e1–e9. doi:10.1097/mpa.0b013e31815f2c2a
- Moffitt, R. A., Marayati, R., Flate, E. L., Volmar, K. E., Loeza, S. G. H., Hoadley, K. A., ... Yeh, J. J. (2015). *Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Nature Genetics*, 47(10), 1168–1178.  
doi:10.1038/ng.3398
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... Parulekar, W. (2007). *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*. *Journal of Clinical Oncology*, 25(15), 1960–1966. doi:10.1200/jco.2006.07.9525
- Morris, J. P., 4th, Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). *Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice*. *The Journal of clinical investigation*, 120(2), 508–520.  
<https://doi.org/10.1172/JCI40045>
- Morrison, A. J., Shen, X. (2009). *Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(6), 373–384.  
doi:10.1038/nrm2693

- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., Palmer, D. H. (2018). *Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. doi:10.1038/s41575-018-0005-x
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., ... Büchler, M. W. (2017). *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*. *The Lancet*, 389(10073), 1011–1024. doi:10.1016/s0140-6736(16)32409-6
- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Bassi, C. et al. (2010). *Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial*. *JAMA*, 304(10):1073–1081. doi:10.1001/jama.2010.1275
- Nicolas, C. T., Al Diffalha, S., Reddy, S. (2019). *Diffuse histology-proven mucinous cystic neoplasm of the pancreas: A case report and review of literature*. *Int J Surg Case Reports* 64: 123–127. doi: 10.1016/j.ijscr.2019.10.015
- Oettle, H., Bauernhofer, T., Borner, M., Faber, G., Fietkau, R., Heinemann, V., Neumann, U.P., Pritzkuleit, R., Sinn, M., Waldschmidt, D.T., Wörmann B, in Kooperation mit der AIO (2018). *Pankreaskarzinom*. Onkopedia. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html>. Zugegriffen am 13.01.2021.
- Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T., & Carbone, P. P. (1982). *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group*. *American journal of clinical oncology*, 5(6), 649–655.
- Pandol, S. J. (2011). *The Exocrine Pancreas. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 3(1), 1–64. doi:10.4199/c00026ed1v01y201102isp014
- Pandol, S. J., & Raraty, M. (2007). *Pathobiology of Alcoholic Pancreatitis*. *Pancreatology*, 7(2-3), 105–114. doi:10.1159/000104235
- Paradise, B., Barham, W., & Fernandez-Zapico, M. (2018). *Targeting Epigenetic Aberrations in Pancreatic Cancer, a New Path to Improve Patient Outcomes?* *Cancers*, 10(5), 128. doi:10.3390/cancers10050128
- Patil, S., Steuber, B., Kopp, W., Kari, V., Urbach, L., Wang, X., Küffer, S., ... Hessmann, E. (2020). *EZH2 regulates pancreatic cancer subtype identity and tumor progression via transcriptional repression of GATA6*. *Cancer Research*, canres.0672.2020–. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-0672
- Perillo, B., Tramontano, A., Pezone, A., Migliaccio, A. (2020). *LSD1: more than demethylation of histone lysine residues*. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(12), 1936–1947. doi:10.1038/s12276-020-00542-2

- Pradeepa, M. M., Grimes, G. R., Kumar, Y., Olley, G., Taylor, G. C. A., Schneider, R., & Bickmore, W. A. (2016). *Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers*. *Nature Genetics*, 48(6), 681–686. doi:10.1038/ng.3550
- Prajapati, H. K., Ocampo, J., Clark, D. J. (2020). *Interplay among ATP-Dependent Chromatin Remodelers Determines Chromatin Organisation in Yeast*. *Biology*, 9(8), 190. doi:10.3390/biology9080190
- Qin, Y., Zhu, W., Xu, W., Zhang, B., Shi, S., Ji, S., ... Yu, X. (2014). *LSD1 sustains pancreatic cancer growth via maintaining HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic process*. *Cancer Letters*, 347(2), 225–232. doi:10.1016/j.canlet.2014.02.013
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., Matrisian, L. M. (2014). *Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States*. *Cancer research*, 74(11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Ramsey, M. L., Conwell, D. L., & Hart, P. A. (2017). *Complications of Chronic Pancreatitis*. *Digestive Diseases and Sciences*, 62(7), 1745–1750. doi:10.1007/s10620-017-4518-x
- Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., Robertson, A. G., ... Mieczkowski, P. A. (2017). *Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Cancer Cell*, 32(2), 185–203.e13. doi:10.1016/j.ccell.2017.07.007
- Regel, I., Hausmann, S., Benitz, S., Esposito, I., & Kleeff, J. (2016). *Pathobiology of pancreatic cancer: implications on therapy*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 16(2), 219–227. doi:10.1586/14737140.2016.1129276
- Regel, I., Mayerle, J., & Mahajan, U. M. (2020). *Current Strategies and Future Perspectives for Precision Medicine in Pancreatic Cancer*. *Cancers*, 12(4), 1024. doi:10.3390/cancers12041024
- Regel, I., Merkl, L., Friedrich, T., Burgermeister, E., Zimmermann, W., Einwächter, H., ... Ebert, M. P. (2012). *Pan-Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Sensitizes Gastric Cancer Cells to Anthracyclines via Induction of CITED2*. *Gastroenterology*, 143(1), 99–109.e10. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.035
- Robert Koch-Institut (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. doi: 10.25646/5977
- Robertson, K. D. (2005). *DNA methylation and human disease*. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597–610. doi:10.1038/nrg1655
- Rodolose, A., Chaux, E., Adell, T., Hagège, H., Skoudy, A., Real, F. (2004). *PTF1 $\alpha$ /p48 and cell proliferation*. *Gastroenterology*, 127(3), 937–949. doi:10.1053/j.gastro.2004.06.058
- Roth, G. S., Casanova, A. G., Lemonnier, N., Reynoird, N. (2017). *Lysine methylation signaling in pancreatic cancer*. *Current Opinion in Oncology*. doi:10.1097/CCO.0000000000000421



- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. et al. (2018). *Prometheus LernAtlas der Anatomie – Innere Organe*. Thieme, Hrsg. 5. Auflage. doi:10.1055/b-006-149645
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K. (2022). *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*. Thieme, Hrsg. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. doi:10.1055/b000000614
- Sereni, E., Luchini, C., Salvia, R., Pea, A. (2019). *Molecular and Clinical Patterns of Local Progression in the Pancreatic Remnant Following Resection of Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN)*. *Chin Clin Oncol* 8(2):21. doi: 10.21037/cco.2019.04.03
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., ... Galle, P. (2013). *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom*. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 51(12), 1395–1440. doi:10.1055/s-0033-1356220
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., ... Shi, Y. (2004). *Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1*. *Cell*, 119(7), 941–953. doi:10.1016/j.cell.2004.12.012
- Shrikhande, S. V., Kleeff, J., Reiser, C., Weitz, J., Hinz, U., Esposito, I., ... Büchler, M. W. (2006). *Pancreatic Resection for M1 Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Annals of Surgical Oncology*, 14(1), 118–127. doi:10.1245/s10434-006-9131-8
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). *Cancer statistics, 2019*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. doi:10.3322/caac.21551
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). *Cancer Statistics, 2021*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Signoretti, M., Bruno, M. J., Zerboni, G., Poley, J.-W., Delle Fave, G., & Capurso, G. (2018). *Results of surveillance in individuals at high-risk of pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis*. *United European Gastroenterology Journal*, 6(4), 489–499. doi:10.1177/2050640617752182
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2009). *Mechanisms of Polycomb gene silencing: knowns and unknowns*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), 697–708. doi:10.1038/nrm2763
- Singhi, A. D., Koay, E. J., Chari, S. T., & Maitra, A. (2019). *Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges*. *Gastroenterology*. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.259
- Sohal, D. P. S., Kennedy, E. B., Khorana, A., Copur, M. S., Crane, C. H., ... & Laheru, D. (2018). *Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(24), 2545–2556. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.9636>

- Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S., & Patel, D. J. (2012). *Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation*. *Science*, 335(6069), 709–712. doi:10.1126/science.1214453
- Sterner, D. E., & Berger, S. L. (2000). *Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), 435–459. doi:10.1128/mnbr.64.2.435-459.2000
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). *The language of covalent histone modifications*. *Nature*, 403(6765), 41–45. doi:10.1038/47412
- Su, J., Wang, F., Cai, Y., & Jin, J. (2016). *The Functional Analysis of Histone Acetyltransferase MOF in Tumorigenesis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 99. doi:10.3390/ijms17010099
- Takaori, K., Bassi, C., Biankin, A., Brunner, T. B., Cataldo, I., ... & IAP/EPC study group on the clinical managements of pancreatic cancer (2016). *International Association of Pancreatology (IAP)/European Pancreatic Club (EPC) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer*. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 16(1), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.10.013>
- Talamini, G., Falconi, M., Bassi, C., Mastromauro, M., Salvia, R., & Pederzoli, P. (2000). *Chronic Pancreatitis: Relationship to Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer*. *JOP. Journal of the Pancreas*, 1(3S), 69–76. Retrieved from <http://www.serena.unina.it/index.php/jop/article/view/400/442>
- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2021). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., ... Zhao, Y. (2011). *Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification*. *Cell*, 146(6), 1016–1028. doi:10.1016/j.cell.2011.08.008
- Tanaka, M., Chari, S., Adsay, V., Fernandez-del Castillo, C., Falconi, M., Shimizu, M., Yamaguchi, K., Yamao, K., Matsuno, S. (2006). *International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas*. *Pancreatology* 6 (1-2): 17-32. doi: 10.1159/000090023
- Torres, C., & Grippo, P. J. (2018). *Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine*. *Annals of Medicine*, 50(4), 277–287. doi:10.1080/07853890.2018.1453168
- Tramacere, I., Scotti, L., Jenab, M., Bagnardi, V., Bellocco, R., Rota, M., ... La Vecchia, C. (2010). *Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation*. *International Journal of Cancer*, NA–NA. doi:10.1002/ijc.24936
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2005). *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. *Nature*, 439(7078), 811–816. doi:10.1038/nature04433

Ulfig, N. (2019). *Kurzlehrbuch Histologie*. Thieme, Hrsg. 5. Auflage. doi:10.1055/b-006-166358

Valle, J. W., Palmer, D., Jackson, R., Cox, T., Neoptolemos, J. P., Ghaneh, P., ... Buechler, M. W. (2014). *Optimal Duration and Timing of Adjuvant Chemotherapy After Definitive Surgery for Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas: Ongoing Lessons From the ESPAC-3 Study*. *Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 504–512. doi:10.1200/jco.2013.50.7657

Van Kampen, J. G. M., Marijnissen-van Zanten, M. A. J., Simmer, F., van der Graaf, W. T. A., Ligtenberg, M. J. L., Nagtegaal, I. D. (2014). *Epigenetic targeting in pancreatic cancer*. *Cancer Treatment Reviews*, 40(5), 656–664. doi:10.1016/j.ctrv.2013.12.002

Van Vlerken, L. E., Kiefer, C. M., Morehouse, C., Li, Y., Groves, C., Wilson, S. D., Yao, Y., Hollingsworth, R. E., Hurt, E. M. (2013). *EZH2 Is Required for Breast and Pancreatic Cancer Stem Cell Maintenance and Can Be Used as a Functional Cancer Stem Cell Reporter*. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(1), 43–52. doi:10.5966/sctm.2012-0036

Verseemann L., Hessmann E., Ulisse M. (2022). *Epigenetic Therapeutic Strategies to Target Molecular and Cellular Heterogeneity in Pancreatic Cancer*. *Visc Med*, 38:11–18. doi:10.1159/000519859

Versteijne, E., Vogel, J. A., Besselink, M. G., Busch, O. R. C., Wilmink, J. W., ... & Dutch Pancreatic Cancer Group (2018). *Meta-analysis comparing upfront surgery with neoadjuvant treatment in patients with resectable or borderline resectable pancreatic cancer*. *The British journal of surgery*, 105(8), 946–958. <https://doi.org/10.1002/bjs.10870>

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., ... & Renschler, M. F. (2013). *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. *The New England journal of medicine*, 369(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>

Wang, G.-J., Gao, C.-F., Wei, D., Wang, C., & Ding, S.-Q. (2009). *Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis*. *World Journal of Gastroenterology*, 15(12), 1427. doi:10.3748/wjg.15.1427

Weake, V. M., & Workman, J. L. (2008). *Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity*. *Molecular Cell*, 29(6), 653–663. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.014

Welsch, U. (2005). *Sobotta Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. Elsevier, Urban & Fischer, 7. Auflage. ISBN 3437431412 , 9783437431418

Willenbrock, F., Wantling, J., O'Neil, E. (2019). *A screen for epigenetic reprogramming reveals LSD1 inhibitor as a potential intervention to promote differentiation in pancreatic cancer*. *Abstract from the NCI Cancer Conference of National Cancer Research Institute*. *Br J Cancer* 121 (Suppl 1), 1–32. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0555-x>

Winter, J., Cameron, J., Campbell, K., Arnold, M., Chang, D., Coleman, J., ... Riall, T. (2006). *1423 Pancreaticoduodenectomies for Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience* ☆. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 10(9), 1199–1211. doi:10.1016/j.gassur.2006.08.018

Wood, L. D. & Hruban, R. H. (2012). *Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms*. *The Cancer Journal*, 18(6), 492–501. doi:10.1097/PPO.0b013e31827459b6  
Worden, E. J., Hoffmann, N. A., Hicks, C. W., & Wolberger, C. (2019). *Mechanism of Cross-talk between H2B Ubiquitination and H3 Methylation by Dot1L*. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2019.02.002

World Cancer Research Fund (2018). *Body fatness and weight gain and the risk of cancer A Global Perspective*. Washington, D.C.: American Institute for Cancer Research; 2018

Wu, H., Li, J., Zhao, J., & Li, S. (2020). *A new scoring system can be applied to predict the organ failure related events in acute pancreatitis accurately and rapidly*. *Pancreatology*. doi:10.1016/j.pan.2020.03.017

Yeo, T. P., & Lowenfels, A. B. (2012). *Demographics and Epidemiology of Pancreatic Cancer*. *The Cancer Journal*, 18(6), 477–484. doi:10.1097/ppo.0b013e3182756803

Yip, D., Karapetis, C., Strickland, A., Steer, C. B., & Goldstein, D. (2006). *Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd002093.pub2

Yurgelun, M. B., Chittenden, A. B., Morales-Oyarvide, V., Rubinson, D. A., Dunne, R. F., Kozak, M. M., ... Wolpin, B. M. (2018). *Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits, and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer*. *Genetics in Medicine*. doi:10.1038/s41436-018-0009-5

Zeng, S., Pöttler, M., Lan, B., Grützmann, R., Pilarsky, C., Yang, H. (2019). *Chemoresistance in Pancreatic Cancer*. *Int J Mol Sci*, 20(18): 4504. doi: 10.3390/ijms20184504

Zhang, S., Wang, C., Huang, H., Jiang, Q., Zhao, D., Tian, Y., ... Chen, Y. (2017). *Effects of alcohol drinking and smoking on pancreatic ductal adenocarcinoma mortality: A retrospective cohort study consisting of 1783 patients*. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-08794-1

Zhang, X., Wen, H., & Shi, X. (2011). *Lysine methylation: beyond histones*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(1), 14–27. doi:10.1093/abbs/gmr100

## 8. Danksagung

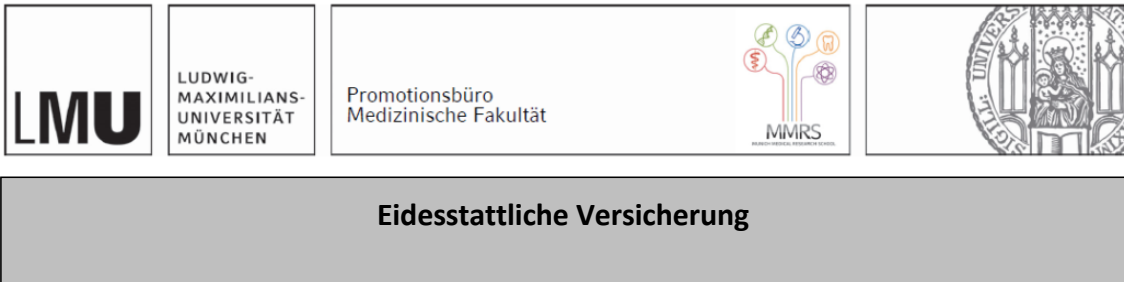
Von Herzen möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Betreuerin **Dr. Ivonne Regel** für die herausragende und liebevolle Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Von Anfang an hast Du mir den Einstieg in die Forschung durch Deine umfassende Hilfe und Dein unermüdliches Engagement erleichtert. Über all die Zeit hinweg hast Du mich mit Deinem Wissen und Deiner langjährigen Erfahrung begleitet. Vielen Dank, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest, mich unterstützt und ermutigt hast.

Mein Dank gilt auch **Prof. Dr. Julia Mayerle** für die Mitbetreuung eines Teiles meiner Arbeit, die konstruktiven Kritiken und Ratschläge.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen im Labor, die meine Forschungszeit zu etwas Besonderem gemacht haben. Mein Dank geht hier besonders an **Simone, Jurik, Ujjwal, Maria, Simon, Svenja, Yonggan und Xi**. Vielen Dank für Eure Hilfe, das liebevolle Anleiten und all die gemeinsamen Gespräche.

Zuletzt möchte ich mich zutiefst bei meiner **Familie** bedanken. Vielen Dank, dass ihr mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt und begleitet habt. Danke, dass ihr immer für mich da wart, ich bin unendlich dankbar Euch in meinem Leben zu haben.

## 9. Affidavit



Denz, Anna Maria

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Epigenetische Reprogrammierung von Pankreaskarzinomzellen zur Aufhebung der molekularen Heterogenität**

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.

Rosenheim, 22.01.2025

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Anna Maria Denz

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin

## **10. Lebenslauf**





## 11. Publikationsliste

Kirmayr, A., Mahajan, U. M., Pichlmeier, S., Benitz, S., D'Haese, J., Mayerle, J., Regel, I. (2018). *Epigenetic reprogramming to overcome heterogeneity of pancreatic tumor cell subtypes*. Poster EPC Berlin.

Zhou, Q., Pichlmeier, S., Denz, A. M., Schreiner, N., Straub, T., Benitz, S., Wolff, J., Fahr, L., Del Socorro Escobar Lopez, M., Kleeff, J., Mayerle, J., Mahajan, U. M., & Regel, I. (2024). *Altered histone acetylation patterns in pancreatic cancer cell lines induce subtype-specific transcriptomic and phenotypical changes*. International journal of oncology, 64(3), 26. <https://doi.org/10.3892/ijo.2024.5614>