

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



Charakterisierung neuer Interaktionspartner der NFAT-vermittelten Transkription im Pankreaskarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Manuela Malsy aus Hofheim am Taunus
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 15.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Volker Ellenrieder

1. Korreferent: Prof. Dr. Peter Langer

2. Korreferent: PD Dr. Wolfgang Meißner

Manches glückt uns nur,
wenn wir daran glauben, dass es uns gelingt,
denn gerade dieser Glaube gibt uns die nötige Kraft
und innere Leichtigkeit, um das zu verwirklichen,
was wir uns erträumen.

Hans Kruppa

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Das Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2. Molekulare Grundlagen des Pankreaskarzinoms	2
1.3. Transkriptionsfaktoren	4
1.3.1. Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren	6
1.3.1.1. Der Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg	8
1.4. Ziel dieser Arbeit.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1. Zellkulturtechniken	13
2.1.1. Zelllinien	13
2.1.2. Zellkultur.....	14
2.1.3. Zellaussaat.....	15
2.2. Transfektion von Zellen.....	16
2.2.1. Dualer Luziferase-Assay	16
2.2.2. siRNA-Transfektion	19
2.2.2.1. siRNA-Transfektion mit Transmessenger.....	19
2.2.2.2. siRNA-Transfektion mit silentFect	20
2.3. Molekularbiologische Methoden	21
2.3.1. Zellstimulation	21
2.3.2. Zelllysat	21
2.3.2.1. Gesamtzelllysat	21
2.3.2.2. Nukleäres Zelllysat	22
2.3.3. Proteinbestimmung	23
2.3.4. Immunpräzipitation.....	23
2.3.5. DNA-Pulldown-Assay	25
2.3.6. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	26
2.3.7. Western Blot.....	27
2.4. GST-Pulldown-Assay.....	31
2.4.1. Präparation des rekombinanten GST-NFAT-Proteins	31

2.4.2. GST-Pulldown	32
2.5. Thymidin-Proliferations-Assay	33
2.6. Genexpressionsprofilanalyse	34
2.6.1. Quantitative Real-Time-PCR	35
2.6.1.1. cDNA-Synthese	35
2.6.1.2. Quantitative Real-Time-PCR-Analyse	36
2.7. Immunfluoreszenz.....	37
3. ERGEBNISSE.....	39
3.1. Vorversuche.....	39
3.1.1. Auswahl einer geeigneten Modellzelllinie.....	39
3.1.2. NFATc2 transloziert bei Vorhandensein von Ionomycin in den Nukleus.....	40
3.1.3. Endogene Expression von in der Literatur bekannten NFATc2-Partnerproteinen	43
3.1.4. Physikalische Interaktion von NFATc2 mit potentiellen Partnerproteinen in der Immunpräzipitation	44
3.2. NFATc2 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 im Pankreaskarzinom	48
3.2.1. NFATc2 kolokalisiert mit Sp1 im selben Immunkomplex.....	48
3.2.2. Koimmunpräzipitation von NFATc2- und Sp1-Komplexen aus Pankreaskarzinomzellen.....	50
3.2.3. NFATc2 und Sp1 interagieren physikalisch an der Targetsequenz von NFAT	52
3.2.4. NFATc2 und Sp1 treten in einem GST-Pulldown-Assay in vitro in direkte Wechselwirkung	56
3.2.5. Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1	57
3.3. NFATc2 interagiert am N-Terminus mit Sp1	60
3.3.1. Physikalische Interaktion zwischen NFATc2 und der Deletionsmutante Sp1-N-Terminus	61
3.3.2. Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und dem Sp1-N-Terminus im dualen Luziferase-Assay	62

3.4. Sp1-artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der NFATc2-vermittelten Genregulation beteiligt	64
3.4.1. Genexpressionsprofilanalyse	64
3.4.2. Quantitative RT-PCR zur Bestätigung des Expressionsprofils	67
3.4.3. Knockdown der Interaktionspartner NFATc2 und Sp1 mittels RNAi resultiert in einer verminderten Zellproliferation..	68
4. DISKUSSION	70
4.1. NFATc2 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 im Pankreaskarzinom	70
4.2. NFATc2 interagiert am N-Terminus mit Sp1	75
4.3. Sp1-artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der NFATc2-vermittelten Genregulation beteiligt	77
4.4. Ausblick	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	81
5.1. Inhaltsangabe	81
5.2. Summary	83
6. LITERATURVERZEICHNIS	85
7. ANHANG	94
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	94
7.2. Abkürzungsverzeichnis	96
7.3. Tabellenverzeichnis.....	100
7.4. Tabellarischer Lebenslauf	101
7.5. Verzeichnis der akademischen Lehrer	103
7.6. Danksagung	105
7.7. Ehrenwörtliche Erklärung	107

1. Einleitung

1.1. Das Adenokarzinom des Pankreas

Das Adenokarzinom des Pankreas ist eine maligne Erkrankung der Bauchspeicheldrüse und stellt die vierthäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen dar (Sakorafas et al. 2000). Auf Grund des Fehlens von Frühsymptomen und seines aggressiven Verhaltens wird es häufig erst in einem unheilbaren Stadium entdeckt (Schleger et al. 2002). Mehr als 90% der humanen Pankreaskarzinome haben ihren Ursprung in den exokrinen Organanteilen und weisen einen duktafen Phänotyp auf. Lymphome und Tumore neuroendokrinen Ursprungs werden dagegen sehr viel seltener beobachtet. In 70% der Fälle liegt die Lokalisation im Pankreaskopfbereich. Von dort breitet sich der Tumor zunächst durch Infiltration in das peripankreatische Gewebe aus. Anschließend metastasiert er rasch in die regionalen Lymphknoten sowie hämatogen in Leber, Lunge, Pleura, Skelettsystem, Nebennieren und Peritoneum (Böhmg und Rosewicz 2004).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung werden die meisten Tumore bereits als nicht kurativ resezierbar eingestuft und haben eine schlechte Prognose. Das mittlere Überleben liegt bei vier Monaten und nur etwa 3% der Patienten überleben fünf Jahre. Jährlich erkranken ca. 12.000 Patienten in Deutschland, wobei die Inzidenz zwischen 2,2 Neuerkrankten pro 100.000 Einwohner in Indien, Singapur und Kuwait sowie 12,5 Neuerkrankten pro 100.000 Einwohner in Schweden schwankt. Das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt bei 3:2, das typische Erkrankungsalter zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (Sakorafas et al. 2000).

Auch wenn die Ätiologie unbekannt bleibt, werden mehrere Risikofaktoren diskutiert. Männliches Geschlecht, dunkle Hautfarbe, Zigarettenkonsum, fettreiche Nahrung, Fleischkonsum, Exposition von Chemikalien und Lösungsmitteln, chronische Pankreatitis, lang bestehender Diabetes mellitus sowie ein niedriger sozioökonomischer Status scheinen die Krankheit zu begünstigen (Ming Chu 1997).

1.2. Molekulare Grundlagen des Pankreaskarzinoms

Charakteristikum der Tumorentstehung ist ein gestörtes Gleichgewicht zwischen wachstumsstimulierenden und -hemmenden Faktoren. Dieses Ungleichgewicht kann spontan entstehen, aber auch durch chemische, physikalische oder biologische Umwelteinflüsse induziert werden. Die Folge sind neoplastische Zellen, die eine unvollkommene Differenzierung und eine autonome Zellproliferation zeigen (Böcker et al. 2004).

Die Pathogenese des Pankreaskarzinoms zeigt charakteristische morphologische Veränderungen, die mit typischen genetischen Alterationen einhergehen. Diesen Erkenntnissen zu Folge wurde ein Tumorprogressionsmodell entwickelt, welches auf der schrittweisen Entwicklung eines malignen Tumors aus primär benignen Vorstufen, die als „PanIN“ (pankreatisch-intraepitheliale Neoplasie) bekannt sind, beruht (Hruban et al. 2000).

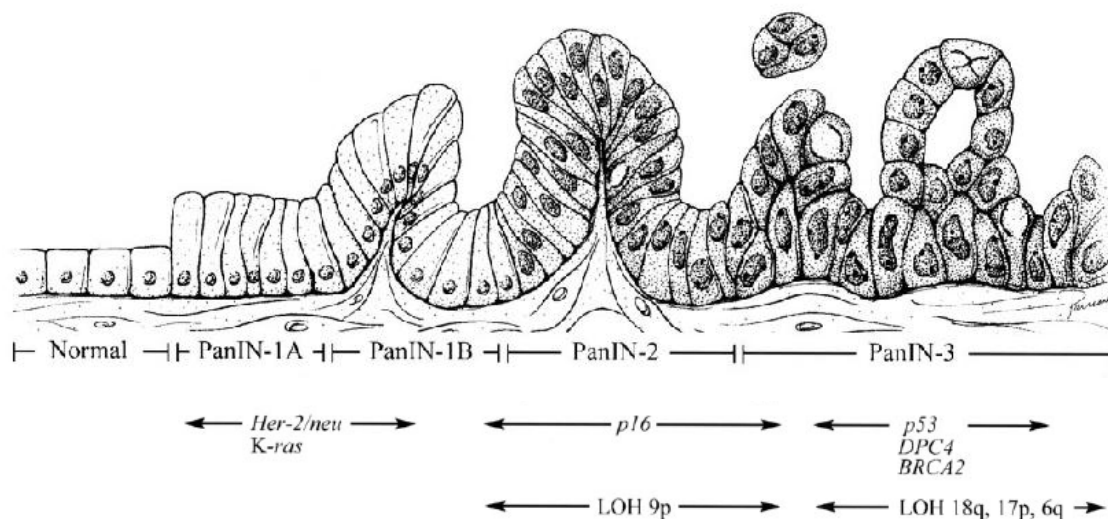


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban et al. 2000):

Zunächst entwickelt sich über mehrere Mutationen eine pankreatisch-intraepitheliale Neoplasie (PanIN 1-3), aus der über weitere Mutationsschritte das invasive Karzinom entstehen kann.

Im Verlauf der Tumorentstehung entwickelt sich aus gesundem Pankreasepithelgewebe im Stadium PanIN 1A eine flache, zylinderepitheliale Hyperplasie, die sich im Stadium PanIN 1B zu einer papillären Hyperplasie mit Auffaltung verändert. Ab PanIN-Stadium 2 werden histologische Struktur-anomalien wie eine Vergrößerung des Zellkerns und ein Verlust der Zellpolarität beobachtet, die sich zu einem Carcinoma in situ (PanIN 3) mit hochgradig veränderten Epithelien und starken zellulären Atypien entwickelt. Ab PanIN-Stadium 3 ist der Übergang zu einem invasiven Pankreaskarzinom möglich (Hruban et al. 2000).

Weiterhin sind genetische Veränderungen auf unterschiedlichem Niveau ermittelt worden. Diese Veränderungen umfassen Onkogenmutationen (im Allgemeinen k-ras Veränderungen, die in 75-95% der Pankreaskarzinom-gewebe beobachtet wurden), Tumorsuppressorgenveränderungen (hauptsäch-lich p53, p16 und DPC4/ SMAD 4), die Überexpression von Wachstumsfaktoren (wie EGF, TGF α , TGF β) sowie deren Rezeptoren (Sakorafas et al. 2000).

Folge dieser Mutationen ist eine Disbalance zwischen tumorsupprimierenden und tumorfördernden Signalwegen.

1.3. Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren lassen sich in generelle und regulatorische Faktoren unterscheiden. Ort der Transkription ist der Zellkern. Im Zellkern wird die Transkription (Genkopie der DNA aus mRNA) durch die RNA-Polymerase II katalysiert. Zur Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor werden generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), die einen Präinitiationskomplex formen, benötigt (Hochheimer und Tjian 2003). Letzterer kann durch kristallographische Röntgenstrukturanalysen charakterisiert werden, wobei verschiedene Untereinheiten identifiziert werden können. Dabei spielt das Protein TBP (TATA-Box bindendes Protein) eine wesentliche Rolle, da es die TATA-Box mittels sequenzspezifischer DNA-Erkennung bindet (Dantonel et al. 2000). Durch diese spezifische Positionierung von TBP auf der DNA wird letztendlich die Lage des Promotors und die exakte Initiationsstelle der Transkription, d.h. die Position +1 der RNA-Synthese, definiert. Als weitere Komponenten können sich an das TBP-Protein die TAFs (TBP-assoziierte Faktoren) anlagern (Bell und Tora 1999). Dabei nehmen diese transkriptionelle Regulationssignale auf und kommunizieren mit dem Präinitiationskomplex. Sie vermitteln ihre Fähigkeit zur Adaption oder Koaktivierung, indem sie direkt mit generellen Transkriptionsfaktoren oder aber mit regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTFs) interagieren (Seyffert 2003).

Regulatorische Transkriptionsfaktoren bilden als tertiäre Messenger das letzte Glied einer Signalkaskade und übertragen ein zelluläres Signal auf die Expression spezifischer Zielgene (Oberholzer 2001). Regulatorische Transkriptionsfaktoren besitzen ein nukleäres Translokationssignal, eine DNA-Bindungsdomäne und ein Transkriptions-regulierendes-Motiv. Sie binden sequenzspezifisch an die DNA proximaler oder distaler Regulationselemente der Transkription und kommen im Gegensatz zu generellen Transkriptionsfaktoren zellspezifisch vor oder werden durch intra- und extrazelluläre Signale kontrolliert (Seyffert 2003). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Weitergabe eines kurzen Signals an den Zellkern, um länger andauernde Mechanismen des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Zellfunktion zu steuern. So können Transkriptionsfaktoren über Rezeptoren auf der Zelloberfläche und

intrazellulären Signalkaskaden oder durch Bindung an intrazytoplasmatischen Liganden aktiviert werden (Oberholzer 2001).

Wie bereits angeführt weisen Transkriptionsfaktoren in ihrem molekularen Aufbau eine vergleichbare Zusammensetzung einzelner Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Funktionsdomänen repräsentieren. Derartige Funktionsdomänen erfüllen die Aufgabe der spezifischen DNA-Erkennung, der Transkriptionsaktivierung oder der spezifischen Interaktion mit anderen Proteinen. Dabei werden Proteine, die das Helix-turn-Helix-Motiv der Homöodomäne tragen, Helix-Loop-Helix-Proteine, Leucine-Zipper-Faktoren sowie Zinkfinger-Proteine unterschieden (Seyffert 2003).

Die zentrale Bedeutung von Transkriptionsfaktoren für die geregelte Expression genetischer Informationen kann jedoch bei mutationsbedingten Störungen der Funktion zu schwerwiegenden Defekten im Organismus führen. Jüngste Untersuchungen lassen eine konstitutive Aktivierung der Signalwege und die veränderte Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms vermuten. So ist beispielsweise eine zentrale Rolle der NFAT-Transkriptionsfaktoren in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms erkennbar.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte 2006, dass sowohl NFATc1 als auch NFATc2 in PanIN-Läsionen vermehrt synthetisiert werden. Dabei wird NFATc2 bereits im Stadium 2 der Läsion beobachtet und die Expression von NFATc1 etwas verzögert in PanIN-Stadium 3 festgestellt (Buchholz et al. 2006).

Darüber hinaus konnten wir bestätigen, dass in 91,7% der histochemisch untersuchten Pankreaskarzinome NFAT-Proteine exprimiert werden, wobei in 30,4% der Fälle NFATc1, in 34,7% NFATc2 und sogar in 26% aller Fälle beide Faktoren identifiziert werden (Ellenrieder et al. 2008, unveröffentlichte Befunde). Mittels genetischer Untersuchungen konnte eine chromosomale Amplifikation auf Chromosom 20q13 von NFATc2 in mehr als 80% der untersuchten Pankreaskarzinomgewebe als Ursache für die Überexpression nachweisen werden (Holzmann et al. 2004).

1.3.1. Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die **nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen** (NFATs) spielen in der Induktion der Genübertragung als regulatorische Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle (Rao et al. 1997). Sie wurden zuerst in T-Lymphozyten gefunden, wo sie am distalen Antigenrezeptor des menschlichen Interleukin-2 Promotors binden (Viola et al. 2004).

NFAT-Proteine gehören zur Rel/ NFκB-Familie aktivierender Transkriptionsfaktoren (Im und Rao 2004). Folgende Mitglieder wurden bislang beschrieben: NFATc1 (NFATc, NFAT 2), NFATc2 (NFATp, NFAT 1), NFATc3 (NFAT 4), NFATc4 (NFATx, NFAT 3) sowie NFAT 5 (TonEBP) (Viola et al. 2004).

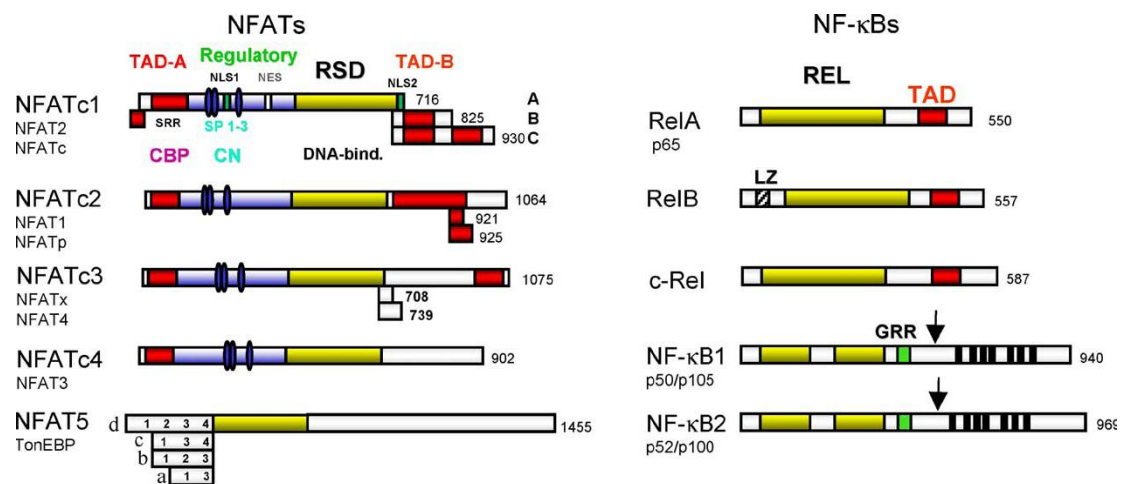


Abbildung 2: Schematische und strukturelle Darstellung der NFAT- und NFκB-Proteinfamilie (Serfling et al. 2004):

Gelb: DNA-Bindungsdomäne (DBD) und Rel-similarity-Domäne (RSD)

Rot: variationsreiche Transkriptions-aktivierende-Domänen (TAD) mit Serinreichen Regionen (SRR) und der Bindungsstelle für den Transkriptions-Kofaktor CBP/p300

Blau: NFAT-Homologie-Region (NHR) mit Serin-Prolin-Phosphorylierungsmotiven (SP), ein Calcineurin-aktivierendes-Gebiet PxlIT (CN), eine Kernlokalisationssequenz NLS sowie ein nukleäres Exportsignal (NES).

Grün: Glycin-reiche Region (GRR)

Gestreift: Leucin-Zipper-Domäne (LZ)

Strukturanalysen ergaben bei allen NFAT-Proteinen den Nachweis einer konservierten homologen DNA-Bindungsregion. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) liegt zwischen den Aminosäuren 400 bis 700. Sie wird auch als „Rel-similarity-Domäne“ (RSD) bezeichnet, da dieses Gebiet Ähnlichkeiten zu der DNA-Bindungsdomäne der Rel-Protein-Familie aufweist (Jain et al. 1995). Die RSD zeigt eine 70%ige Homologie zwischen den vier typischen NFAT-Mitgliedern (c1-4) sowie eine 40%ige Homologie zu NFAT 5 (Serfling et al. 2004).

Neben variantenreichen Transkriptions-aktivierenden-Domänen (TAD) am Amino- und Carboxylende und der DNA-Bindungsdomäne in der Mitte, wird ein weiteres 300 Aminosäuren großes, regelndes Gebiet in NFATc1, c2 und c3 gefunden: die NFAT-Homologie-Region (NHR), welche für die NFAT-Proteinfunktion relevante Motive enthält. Zu diesen gehören neben Serin-reichen Regionen (SRR), Serin-Prolin-Phosphorylierungsmotive, das Calcineurin-aktivierende-Gebiet PxlIT, eine Kernlokalisationssequenz NLS sowie ein nukleäres Exportsignal NES.

Die Proteine NFATc1, c2 und c3 werden vor allem in Zellen des Immunsystems, nämlich den T- und B-Lymphozyten, exprimiert, aber auch in Mastzellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen (Crabtree und Olson 2002) und im olfaktorischen Epithel (Rao et al. 1997). NFATc3 ist außerdem im Thymus und im lymphoiden Gewebe zu beobachten (Viola et al. 2004).

NFATc4 hat eine zu NFATc1, c2, c3 ähnliche Primärstruktur, wird jedoch hauptsächlich außerhalb des Immunsystems exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Funktion der quergestreiften Muskulatur (Lee und Park 2006).

Das ca. 1.500 Aminosäuren umfassende und damit längste Mitglied der NFAT-Familie, NFAT 5, weist einige Strukturabweichungen im Vergleich zu seinen Familienmitgliedern auf. Neben einer ca. 900 Aminosäuren enthaltenden transaktivierenden Domäne und einer DNA-bindenden Domäne (Aramburu et al. 2006) wird hier keine regulatorische Domäne, an die Calcineurin binden kann, gefunden. Dadurch kann es weder zu einer Dephosphorylierung noch eine nukleäre Translokation erfolgen (Serfling et al. 2004). Die Funktion von

NFAT 5 wird über die Änderung des osmotischen Druckes reguliert. Kommt es zur Aktivierung bindet NFAT 5 an die DNA, indem es eine homodimere Struktur formt und die DNA umkreist (Lopez-Rodriguez et al. 2001). Es erfolgt die Synthese einiger, entzündlicher Zytokine (Aramburu et al. 2006).

NFAT-Proteine werden nicht nur in T-Zellen, sondern auch in anderen Zellen außerhalb des Immunsystems beobachtet, wo sie die Expression zentraler Gene der Differenzierung und des Wachstums kontrollieren (Viola et al. 2004). So werden NFAT-Proteine auch in neuronalen Geweben, endothelial, im Herzmuskel, in den Blutgefäßen sowie in Chondrozyten, Keratinozyten, Adipozyten (Horsley und Pavlath 2002) und Pankreaskarzinomzellen (Buchholz et al. 2006) exprimiert.

1.3.1.1. Der Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg

Während die Wirkung von NFAT 5, identifiziert als „tonicity-response enhancer-binding protein“ (TonEBP), über die Änderung des osmotischen Druckes reguliert wird (Lee und Park 2006), wirken NFATc1-4 über einen Calcium-Calcineurin-Signalweg in der Zelle (Loh et al. 1996b, Im und Rao 2004).

Dabei spielt Calcineurin, eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase, eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion. Calcineurin, ursprünglich als Calmodulin-bindendes Protein bezeichnet, ist ein heterodimerer Komplex, der aus einer 60 kDa schweren katalytischen Untereinheit (CN-A) und einer 19 kDa regulierenden Calcium-bindenden Untereinheit (CN-B) besteht. Die katalytische Untereinheit (CN-A) enthält eine katalytische, eine B-Untereinheit bindende, eine Calmodulin-bindende und eine autoinhibierende Domäne, die bei niedrigen Calcium-Konzentrationen in der Zelle die katalytische Domäne blockiert und Calcineurin inhibiert (Tokoyoda et al. 2000).

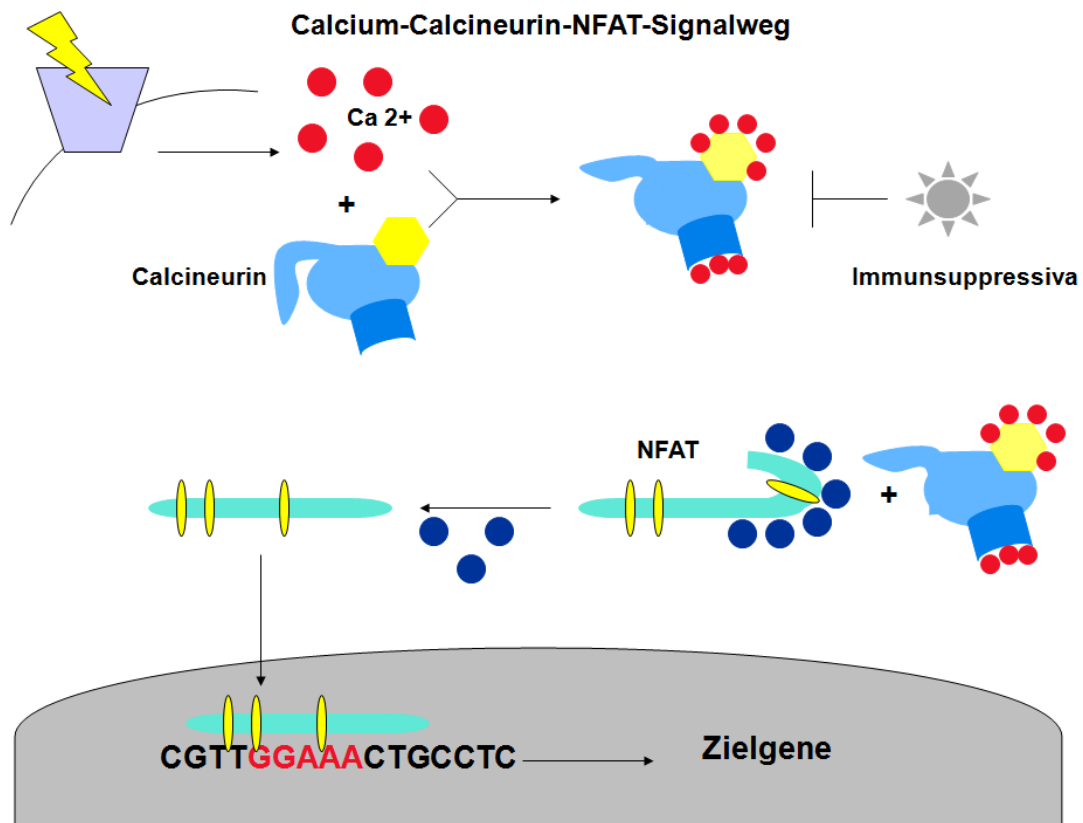


Abbildung 3: Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg:

Ein intrazellulärer Calciumanstieg bewirkt die Aktivierung der Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin. Diese beginnt mit der Dephosphorylierung von NFAT, sodass es zu einer Konformationsänderung und dem Eintritt von NFAT in den Zellkern kommt (Viola et al. 2004).

Calcineurin kann durch viele Oberflächenrezeptoren aktiviert werden, wobei es zur Calciummobilisierung über die „Second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) kommt. Die Stimulation führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C_γ, die ihrerseits mit der Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu IP₃ und DAG beginnt (Hogan et al. 2003, Feske et al. 2003). Das hydrophile IP₃ öffnet sowohl im endoplasmatischen Retikulum, als auch in der Plasmamembran „CRAC“ (Calcium freigebende, aktivierende Calcium)-Poren und ruft einen intrazellulären Calciumanstieg hervor (Berridge et al. 2000). Dieses Calcium wird von der regulierenden Calcium-bindenden Untereinheit sowie von

Calmodulin, das sich an die Calmodulin-bindende Domäne der A-Untereinheit von Calcineurin anlagert, gebunden. Es kommt zu einer Konformationsänderung, bei der die autoinhibierende Domäne die katalytische Domäne freigibt (Tokoyoda et al. 2000).

In ruhenden Zellen liegen NFAT-Proteine im phosphorylierten Zustand im Zytoplasma vor und zeigen nur eine geringe Affinität zur DNA (Viola et al. 2004). Calcineurin bindet am N-Terminus gelegenen PxlIT-Motiv der NFAT-Proteine (Im und Rao 2004) und dephosphoryliert sie an 13 Serinresten (Viola et al. 2004). Es folgt eine Konformationsänderung, woraufhin NFAT-Proteine in den Kern translozieren und an spezifischen DNA-Bindungssequenzen (GGAAA) binden (Tokoyoda et al. 2000).

Die vor allem in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus (FK 506) hemmen die katalytische Tätigkeit von Calcineurin (Ho et al. 1996; Kiani et al. 2000), indem sie mit intrazellulär bindenden Proteinen, den Immunophilinen, assoziieren und Komplexe bilden. Die Komplexe FK 506-FKBP 12 und Cyclosporin A-Cyclophilin lagern sich an dem Berührungspunkt von CN-A und CN-B an und verhindern die Dephosphorylierung (Sagoo et al. 1996). Auf Grund ihrer vielfältigen Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Hypertension, Neurotoxizität, Diabetes mellitus und gastrointestinale Störungen (Lee und Park 2006) werden FK 506 und Cyclosporin A jedoch nur begrenzt bei Allergien, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Rao et al. 1997).

Export von NFAT aus dem Zellkern

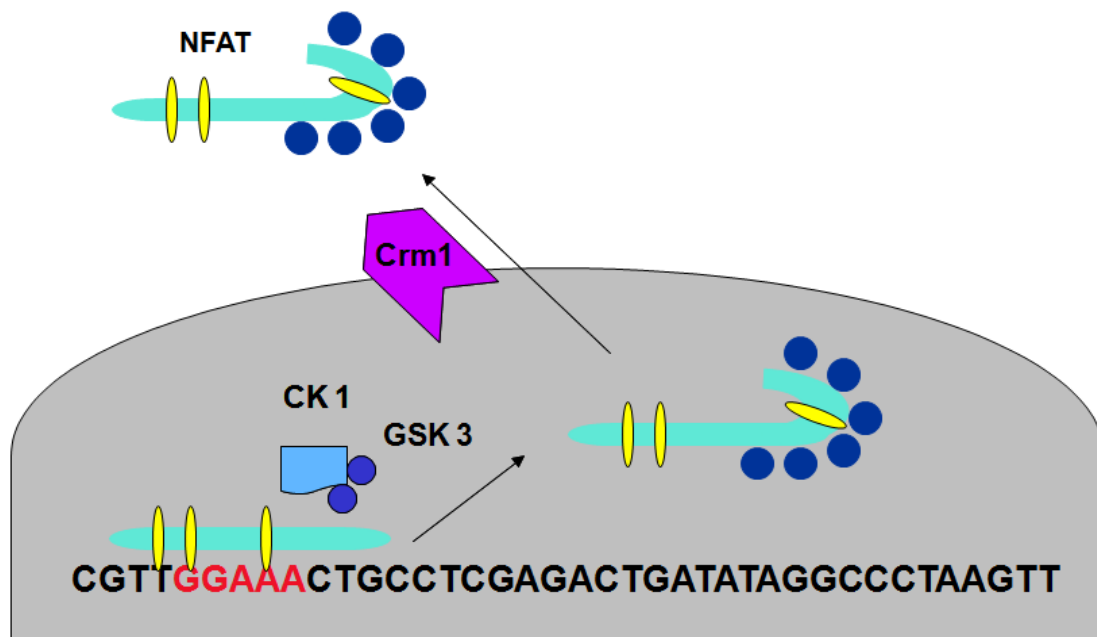


Abbildung 4: Export von NFAT aus dem Zellkern:

Durch die Rephosphorylierung und den nukleären Export-Rezeptor werden NFAT-Proteine wieder in einen deaktivierten, ruhenden Zustand im Zytoplasma gebracht (Lee und Park 2006).

Dieser Vorgang wird zeitlich durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) (Neal und Clipstone 2001) oder durch die Casein-Kinase 1 (CK1) begrenzt, wobei NFAT-Proteine rephosphoryliert werden. Dabei verliert das Protein seine DNA-Affinität und wird mit Hilfe des nukleären Export-Rezeptor Crm1 (Chromosome region maintenance 1) aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert (Lee und Park 2006).

Die gesamte Wirkung vom NFAT-Protein hängt somit von der Balance zwischen Dephosphorylierung durch Calcineurin und Rephosphorylierung durch NFAT-Kinasen ab (Feske et al. 2003).

1.4. Ziel dieser Arbeit

Promotoren zahlreicher Gene mit zentraler Bedeutung in der Regulation vitaler Zellfunktionen, wie z.B. der Zellproliferation, Differenzierung, Survival oder des programmierten Zelltodes besitzen Bindungsstellen für NFAT-Proteine und werden zumindest potentiell von diesen auf Expressionsebene kontrolliert (Viola et al. 2004). Tatsächlich können NFAT-Proteine sowohl das Wachstum von Zellen stimulieren als auch hemmen. Diese pluripotenten Effekte sind abhängig vom Typ und Aktivierungszustand der Zelle. Von besonderer Bedeutung scheinen dabei Partnerproteine zu sein. Es handelt sich hierbei um Transkriptionsfaktoren, die mit NFAT-Proteinen kooperieren und so die Selektion und Regulation NFAT-kontrollierter Gene maßgeblich beeinflussen. Die vorliegende Arbeit fokussiert auf NFATc2, welches zwar eine hohe Expressionsintensität im Pankreaskarzinom aufweist, dessen Funktion und DNA-regulierenden Eigenschaften hier jedoch unbekannt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen zu identifizieren und zu kennzeichnen.

Im Speziellen wird auf folgende Fragen eingegangen:

1. Mit welchen Transkriptionsfaktoren interagiert NFATc2 im Pankreaskarzinom?
2. Auf welchem molekularen Mechanismus beruht die Interaktion der Transkriptionsfaktoren miteinander?
3. An welche Targetpromotoren binden die Interaktionspartner?
4. Welche Funktion hat diese Interaktion für die Pankreaskarzinomzelle?

2. Material und Methoden

2.1. Zellkulturtechniken

2.1.1. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie deren Abstammung, Herkunft und Kultivierungsmedien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Name	Abstammung	Herkunft	Medium
8988s	Humane Pankreaskarzinom- zelllinie	H. P. Elsässer, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland	DMEM
8988t	Humane Pankreaskarzinom- zelllinie	H. P. Elsässer, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland	DMEM
AsPC 1	Humanes Adenokarzinom	F. X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien	RPMI 1640
Imim-PC 1	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	F. X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien	DMEM
Imim-PC 2	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	F. X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien	DMEM
Panc-1	Humane Pankreaskarzinom- zelllinie	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien	DMEM

Suit-007	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	T. Iwamura Department of Surgery I, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan	DMEM
Suit-028	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	T. Iwamura Department of Surgery I, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan	DMEM

2.1.2. Zellkultur

Zur Kultivierung der verschiedenen Zellreihen werden die Zellen der Vorkultur in eine mit 13 ml Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche (Fa. Greiner bio-one) überführt und in einem 37°C warmen Brutschrank (Fa. Heraeus Instruments) bei 5% CO₂-Gehalt gezüchtet.

Nährmedium DMEM:

- 500 ml DMEM (Fa. PAA Laboratories GmbH)
- 50 ml fötales Kälberserum (Fa. PAN Biotech GmbH)
- 1 ml Normocyn (Fa. Amaxa biosystems)

Nährmedium RPMI 1640:

- 500 ml RPMI 1640 (Fa. PAA Laboratories GmbH)
- 50 ml fötales Kälberserum
- 5 ml HEPES (Fa. Gibco)
- 5 ml Natrium-Pyruvat (Fa. Cambrex)
- 2,5 ml Gentamycin (Fa. PAA Laboratories GmbH)
- 500 µl β-Mercaptoethanol (Fa. Gibco)

Zunächst wird das verbrauchte Nährmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS (Fa. PAA Laboratories GmbH) gewaschen. Nach dem Absaugen des DPBS erfolgt die Zugabe von ca. 4 ml Trypsin-Lösung (Fa. PAA Laboratories GmbH) zur Ablösung des Zellrasens. Das Zellen-Trypsin-Gemisch wird in ein mit 5 ml Nährmedium gefülltes Falconröhrchen (Fa. Greiner bio-one) überführt und bei Raumtemperatur mit 1.200 rpm 3 min lang zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet in Nährmedium resuspendiert und es je nach gewünschter Verdünnung in eine mit Nährmedium gefüllte Kulturflasche transferiert.

2.1.3. Zellaussaat

Für die Zellaussaat wird ein Tropfen des in Nährmedium resuspendierten Pellets auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht und die Zellanzahl pro Milliliter bestimmt. Bei 6-Well-Platten (Fa. Nalge Nunc International) werden pro Well ca. 180.000 Zellen in 2 ml Nährmedium, bei 12-Well-Platten (Fa. Nalge Nunc International) pro Well ca. 79.000 Zellen in 2 ml Nährmedium und bei 24-Well-Platten (Fa. Nalge Nunc International) pro Well ca. 50.000 Zellen in 1 ml Nährmedium suspendiert und ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank können sich alle Zellen setzen und bei einer Konfluenz von ca. 70-90% weiter verarbeitet werden.

2.2. Transfektion von Zellen

2.2.1. Dualer Luziferase-Assay

Die Methode des dualen Luziferase-Assays dient der Analyse der funktionellen Relevanz von Promotorbindungsstellen und der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. In Reporter-Promotor-Analysen werden zunächst Effektorplasmide sowie Promotorplasmide, die an das Luziferase-Gen kloniert wurden, in die Zelle transfiziert. Hierbei wird die Luziferase aus *Photinus pyralis* („Firefly“) verwendet. Der zu untersuchende Transkriptionsfaktor bindet an die entsprechende, subklonierte Zielsequenz und induziert die Transkription. Bei der Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin (Abbildung 5) kommt es zur Freisetzung von Licht, welches im Luminometer detektiert werden kann. Dabei ist die gemessene Lichtemission ein Maß für die Expression der Luziferase und damit für die Aktivität des Transkriptionsfaktors (Mühlhardt 2004).

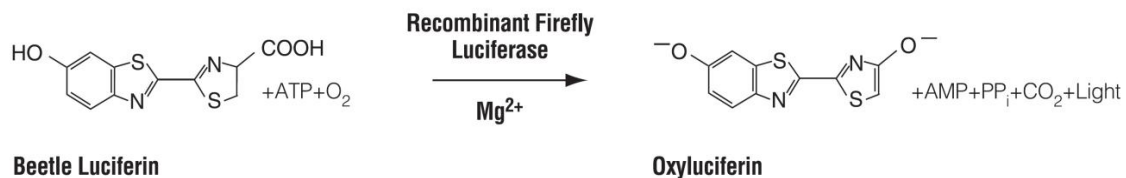


Abbildung 5:

Chemische Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin (www.promega.com)

Die Zellen werden am Vortag in 12-Well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von etwa 70-90% wird mit der Transkription begonnen.

Für die Transfektion wird zunächst ein „Master-Mix“ hergestellt. Dieser enthält die in serumfreiem Medium gelösten Promotor- und Effektorplasmide im gewünschten Verhältnis.

Die verwendeten Promotor- und Effektorplasmide sind in Tabelle 2 und 3 aufgeführt:

Tabelle 2: Promotorkonstrukte:

DNA-Konstrukte	Vektor	Insert	Herkunft/ Referenz
cisNFAT-Luc	cisNFAT-Plasmid	drei hintereinander geschaltete NFAT-Bindungsstellen	Fa. Stratagene (Garden Grove, USA)

Tabelle 3: Effektorplasmide:

DNA-Konstrukte	Vektor	Insert	Herkunft/ Referenz
Sp1-f.l.-Flag	TAF2C	Sp1 full length	J. S. Zhang (Mayo Clinic, Minnesota, USA)
Sp1-ZF-Flag	TAF2C	Sp1-C-Term	J. S. Zhang (Mayo Clinic, Minnesota, USA)
SP1-N-Term-Flag	TAF2C	Sp1-N-Term	J. S. Zhang (Mayo Clinic, Minnesota, USA)
mNFATc2-HA	pEGFP	NFATc2 1-460	A. Rao (Harvard Medical School, Boston, USA)

Pro μg DNA werden 3 μl des Transfektionsreagenz Transfast (Fa. Promega Cooperation) zu dem „Master-Mix“ gegeben, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgt für 24 h im Brutschrank.

Für das Zelllysat wird 200 μl Passiv-Lysepuffer (Fa. Promega Cooperation) auf die Zellen gegeben und inkubiert sie 15 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach dem Lösen der Zellen mit einem Zellscraper wird die

Lysepuffer-Zell-Emulsion in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 1 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert.

30 µl des Überstandes werden in eine 96-Well-Platte pipettiert und 30 µl des Luziferasepuffers (Fa. Promega Cooperation) hinzugefügt. Es erfolgt die erste Messung der Lichtemission im Luminometer Centro LB 960 (Fa. Berthold Laboratories).

Um die experimentelle Variabilität durch äußere Einflüsse wie z.B. Zellkulturbedingungen und Transkriptionseffizienz zu minimieren wird ein Kontrollreporter gemessen. Dieser Kontrollreporter beinhaltet die Renilla-Luziferase (*Renilla reniformis*), die Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert. Bei dieser Reaktion wird ebenfalls Licht emittiert, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann (Mühlhardt 2004).

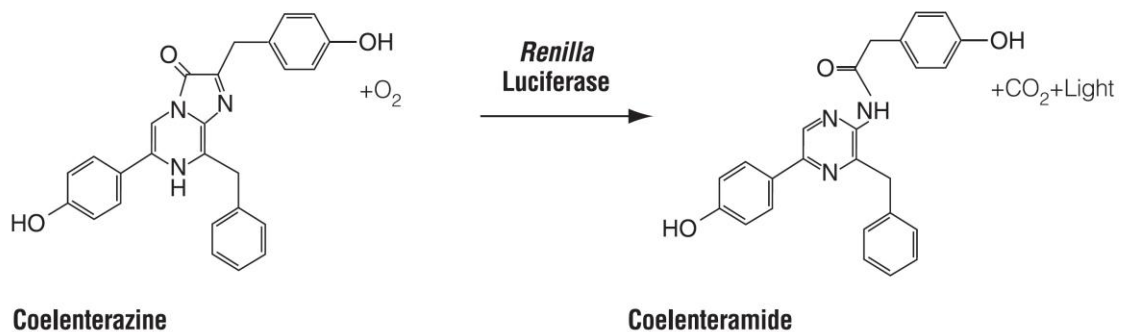


Abbildung 6:

Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid (www.promega.com)

30 µl „Stop-and-Glo“-Puffer (Fa. Promega Cooperation) werden nach Herstellerangaben mit 1% „Stop-and-Glo“-Substrat gemischt und zur Luziferase-Zellüberstand-Lösung auf der 96-Well-Platte pipettiert.

Es erfolgt die zweite Messung im Luminometer. Der Quotient aus beiden Messungen ergibt die tatsächliche Transkriptionseffizienz des Transkriptionsfaktors.

2.2.2. siRNA-Transfektion

Die Inhibierung der Genexpression durch RNA-Moleküle, die in zahlreichen Organismen stattfindet, wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Die ursprüngliche zelluläre Antwort ist ein Abwehrmechanismus gegen Viren. Die durch replizierte Viren produzierte, doppelsträngige RNA wird zunächst im Organismus durch Dicer (RNase III-ähnliche Moleküle) in kurze RNA-Fragmente zerlegt. Die Aufnahme dieser siRNA-Fragmente in den RNA-Inducing-Silencing-Complex (RISC) induziert die Aktivierung des Komplexes, der die Expression entsprechender Genprodukte durch Abbau komplementärer RNA auf posttranskriptioneller Ebene inhibiert (gene silencing) (Mühlhardt 2004). Diesen Effekt wird bei der siRNA-Transfektion genutzt.

2.2.2.1. siRNA-Transfektion mit Transmessenger

Die Reaktionsmischung der im Folgenden aufgeführten Zusammensetzung wird in ein Falconröhrchen pipettiert, gerührt und ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

178	µl	ECR-Puffer
8	µl	Enhancer
14	µl	zu transfizierende siRNA bzw.
7	µl	control-siRNA

Nun werden 16 µl des Transfektionsreagenzes Transmessenger (Fa. Quiagen) hinzugefügt, gemäß der Angaben des Herstellers 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 1,8 ml serumfreies Nährmedium zupipettiert.

Jeweils 1 ml des Reaktionsgemisches wird pro Well zu den ausgesäten Zellen gegeben und im Brutschrank für 3 h inkubiert. Nach anschließendem Absaugen des Mediums werden ca. 2 ml serumhaltiges Medium zu den Zellen hinzugefügt.

Zur Verbesserung der Transkriptionseffizienz wird die Transfektion nach 24 h wiederholt.

2.2.2.2. siRNA-Transfektion mit silentFect

In Falcon A werden pro Ansatz 150 µl serumfreies Medium zu 7 µl zu transfizierender siRNA, in Falcon B 100 µl serumfreies Medium zu 7 µl silentFect (Fa. Biorad) pipettiert. Beide Ansätze werden gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die am Vortag in 6-Well-Platten ausgesäten Zellen wird das Transfektionsgemisch pipettiert und 24 h lang im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 4: Eingesetzte siRNA-Konstrukte:

Kontrolle	Silencer Negative Control #2 siRNA	Ambion, Austin, TX, USA
NFATc2 #3	5`-CCAUUAAACAGGAGCAGAAAtt-3`	Ambion, Austin, TX, USA
Sp1 #1	5`-GGUAGCUCUAAGUUUUGAUtt-3`	Ambion, Austin, TX, USA

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Zellstimulation

Je nach Versuch werden die Zellen für 3 h mit serumfreien Medium behandelt und in definierten Zeitabständen mit 0,5 µM Ionomycin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH) stimuliert.

2.3.2. Zellysat

2.3.2.1. Gesamtzellysat

Für die Zellyse wird bei den ausgesäten Zellen das Zellmedium entfernt und die Zellen mit 3 ml gekühltem DPBS gewaschen. Je nach Zellzahl wird 50 µl bis 150 µl Lysepuffer auf die Well-Platten gegeben, die Zellen mit einem Zellscraper (Fa. Greiner bio-one) vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellmembran zu zerstören, erfolgt die Sonifizierung der Substratlösung, die im Anschluss 5 min lang bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wird. Das Pellet mit den verbliebenen Zellresten wird verworfen, die überstehende Lösung mit den Proteinen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben.

Lysepufferlösung:

12,50 ml	1 M HEPES (pH 7,5)
7,50 ml	5 M NaCl
1,25 ml	200 mM EGTA
25,00 ml	100% Glycerin
2,50 ml	Tritron X-100 (Fa. Roth)
1,05 g	NaF
1,11 g	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O

Lysepuffer:

10	ml	Lysepufferlösung
200	µl	Orthovandat (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)
10	µl	Leupeptin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)
200	µl	Benzamidin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)
100	µl	PMSF (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)
10	µl	Aprotinin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)

2.3.2.2. Nukleäres Zelllysat

Das Zellmedium wird bei den ausgesäten Zellen abgesaugt und diese mit 3 ml gekühlten, 4°C kalten DPBS überschichtet. Nach erneutem Absaugen und Hinzugabe von 1 ml DPBS werden die Zellen mit einem Zellscraper vom Boden gelöst und die Substratlösung in Eppendorf-Cups überführt. Diese werden 3 min lang bei 4°C und 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird je nach Größe in 30-100 µl Puffer A-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert.

Puffer A-Lösung:

200	µl	1 M Hapes KOH-Lösung, pH 7,5
100	µl	1 M KCl
100	µl	1 mM EGTA
10	µl	1 mM DTT
100	µl	0,5 mM Protease Arrest (Fa. G-Biosciences)
9,5	ml	destilliertes Wasser

Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation mit 3.600 rpm für 12 min bei 4°C. Es schließt sich die Überführung des Überstandes (zytoplasmatischer Anteil) in weitere Eppendorf-Cups an, bevor das verbleibende Pellet (nukleärer Anteil)

erneut je nach Pelletgröße in 50-100 µl Puffer A resuspendiert wird. Die Suspension wird für 10 min auf Eis inkubiert, kurz sonifiziert und erneut für 6 min auf Eis inkubiert. Zum Abschluss werden die Zellreste durch 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und Raumtemperatur entfernt.

2.3.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird mit Hilfe des Bradford-Tests durchgeführt. Durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Proteine nach 595 nm mit Proteinen, was mittels eines Photometers detektiert werden kann (Rehm 2002). Hierzu werden in eine 96-Well-Platte je Einkerbung 100 µl Protein-Assay-Lösung (Fa. Biorad) pipettiert. Die Analyse erfolgt in Doppelbestimmung. Im Rahmen der durchgeführten Analyse dient BSA-Lösung (Fa. New England Biolabs) als Vergleichsprobe, die pro Well in unterschiedlichen Konzentrationen (0 µl, 1 µl, 2 µl, 4 µl und 8 µl) aufgetragen wird. Es werden 2 µl der zu bestimmenden Probe in ein Well pipettiert, bevor der Inhalt aller Wells mit jeweils 100 µl Protein-Assay-Lösung überschichtet und die Proteinbestimmung mit Hilfe eines Photometers (Dynatech MRX Laboratorius) durchgeführt wird.

2.3.4. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist ein Verfahren, bei dem es zur Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen kommt. Sie ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und dient dem Nachweis bekannter Partnerproteine.

Nachdem die Zelle durch ein Zellysat aufgebrochen wurde, erfolgt die Zugabe eines Antikörpers, welcher spezifisch an sein Zielprotein bindet. Über diesen Antikörper und Protein A/G-Beads wird das Zielprotein samt Interaktionspartner extrahiert. Die Isolierung der Komplexe erfolgt anschließend über Zentrifugation sowie mehreren Waschschritten, um unspezifische Proteine zu entfernen (Luttmann et al. 2004).

Im ersten Schritt werden je Probe 20 µl der Beads-Lösung (Fa. Upstate cell signaling solutions) durch Hinzugabe von Lysepuffer und anschließender Zentrifugation gereinigt. Dann werden 500 µg der Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 20 µl der Beads sowie 1 µl der „normal mouse IgG“ Negativkontrolle (Fa. Upstate cell signaling solutions) zugegeben und die Mischung für 20 min im Überkopfrator bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand dekantiert, 4 µg des gewünschten Antikörpers zur Probe gegeben und alles für 12 h bis 15 h im Überkopfrator bei 4°C inkubiert.

Verwendete Antikörper:

NFATc2 (Fa. Santa cruz)

Sp1 (Fa. Novus Biologicals)

Als nächstes werden je Probe erneut 50 µl der Beads-Lösung durch Zugabe von Lysepuffer und Zentrifugation gereinigt, in die Proben überführt und bei 4°C im Überkopfrator für 1-2 h inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen des Probegemisches mit Lysepuffer wird 30 µl 2x Lämmli-Puffer hinzugegeben und das Gemisch für 5-10 min bei 95°C auf einem Heizblock erhitzt.

Lämmli-Puffer:

2,25 ml	1M Tris Base/HCl (pH 6,8)
5 ml	100% Glycerin
2,5 ml	20% SDS
1 ml	1M DTT
0,02 %	Bromphenolblau

2.3.5. DNA-Pulldown-Assay

Die Methode des DNA-Pulldown-Assays ist ein ähnliches Verfahren wie die Immunpräzipitation, wobei physikalische Protein-DNA-Interaktionen mit Hilfe von Streptavidin isoliert werden. Der Nachweis erfolgt im Western Blot.

Hierzu werden 100 µg nukleäres oder 200 µg Gesamtzelllysat mit 10 µl Biotin-markierten Oligonukleotidsequenzen versetzt und 3 h lang bei 4°C im Überkopffrotor inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl Streptavidin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH) und einer erneuten Inkubation für 1 h bei 4°C im Überkopffrotor erfolgt die Reinigung durch Lysepuffer und Zentrifugation. Zum Schluss werden die Proben mit 50 µl Lämmli-Puffer versetzt und die Mischung bei 95°C auf einem Heizblock für 10 min erhitzt.

Verwendete Oligonukleotidsequenzen:

NFAT-cons-DP-for: 5`-TCTAAGGAGGAAAACTGTTTCATG-3`

NFAT-cons-DP-rev: 5`-CATGAAACAGTTTTTCATCCTTAGA-3`

(Fa. Biomers.net GmbH)

2.3.6. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wird in der Analyse von Proteinen verwendet, wobei diese nach Molekülgröße aufgetrennt werden. Als Trennmedium dient ein Gel auf 10%-Polyacrylamidbasis, welches eine definierte Porengröße aufweist. Zusätzlich kommt SDS (Sodiumdodecylsulfat), ein anionisches Detergenz, zum Einsatz. Diese Substanz überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass eine konstante Ladungsverteilung erhalten wird. Ebenso denaturiert SDS die Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (Rehm 2002).

Zum Gießen des Gels werden folgende Lösungen verwendet:

Sammelgelpuffer:

12,1 g/200	ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)
4	ml	0,4%ige SDS-Lösung

Sammelgel:

25	ml	Sammelgelpuffer
59	ml	destilliertes Wasser
16	ml	30%ige/ 0,8%ige Acrylamidlösung (Fa. Roth)
10	µl	10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)
5	µl	TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) (Fa. Roth)

Trenngelpuffer:

36,3 g/200	ml	1,5 M Tris-Base (pH 8,8)
4	ml	0,4%ige SDS-Lösung

Trenngellösung:

2,5	ml	Trenngelpuffer
3,67	ml	destilliertes Wasser
3,33	ml	30%ige/ 0,8%ige Acrylamidlösung
0,5	ml	Glycerol (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)

Stopgel:

200	µl	Trenngellösung
1	µl	10%ige APS-Lösung
1	µl	TEMED

Zur Trenngellösung werden 20 µl 10%ige APS-Lösung und 20 µl TEMED gegeben und 202 µl Stopgel, 4 ml Trenngel und 4 ml Sammelgel zwischen die mit Ethanol gereinigten Platten gefüllt. Der Kamm, der die Taschen für den Auftrag der Proben formt, wird in das Sammelgel eingesteckt und das Gel zur Polymerisation 20 min ruhen gelassen. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden können, werden sie für 5-10 min bei 90°C in einem Heizblock erwärmt und auf Eis wieder abgekühlt. Zur Auftrennung werden 20 µg des Substratgemisches in die Probentaschen aufgetragen und eine elektrische Spannung angelegt. Kleine Proteine durchlaufen dabei relativ ungehindert das Gel zur Anode, während große Proteine von den Maschen zurückgehalten werden und sich dadurch langsamer bewegen. Neben den Proben werden 5 µl des Größenmarkers Page Ruler (Fa. Fermentas) auf das Gel aufgetragen, der auf Grund seiner bekannten Referenz als Maßstab dient. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 34 mA gestartet und nach Durchlaufen des Sammelgels werden die Werte auf 160 V und 44 mA erhöht.

2.3.7. Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, die die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen bindet. Der eigentliche Nachweis von Proteinen aus Elektrophorese-Gelen erfolgt mittels einer Immunreaktion. Dabei bindet der antigenspezifische Primär-Antikörper an die Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der

durch die chemische Reaktion von Luminol in seine oxidierte Form eine Lumineszenz detektiert (Rehm 2002).

Verwendete Puffer:

10x Transblotpuffer:

151,4 g/5l	0,25 M Tris Base
720,6 g/5l	Glycerin

Blottingpuffer:

100 ml	10x Transblotpuffer
200 ml	Methanol (Fa. Fluka)
700 ml	destilliertes Wasser

10x TBST-Puffer:

121,4 g/5l	0,2 M Tris Base
400,3 g/5l	1,37 M NaCl

TBST:

100 ml	10x TBST-Puffer
900 ml	destilliertes Wasser
1 ml	Tween 20 (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)

Blocking-Puffer:

1	x	TBST
5	%	Milchpulver (Fa. Roth)

Nach Abschluss der SDS-Gelelektrophorese wird nach Trennung des Sammelgels vom Trenngel der experimentelle Aufbau des Western Blots vorbereitet.

Der Aufbau erfolgt in einer mit Blottingpuffer gefüllten Schale im Blottingrahmen:

Anode
Schwamm
Filterpapier
Nitrocellulosemembran
Gel
Filterpapier
Schwamm
Kathode

Dabei ist sicherzustellen, dass die Nitrocellulosemembran luftblasenfrei auf dem Gel aufliegt (Rehm 2002). Auf Grund hydrophober Wechselwirkungen wird der Transfer der Proteine auf die Membranoberfläche mittels Nasstransfer in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (Fa. Biorad) für 1,4 h bei 400 mA und stetiger Eiskühlung durchgeführt. Nach Abbau des Blots wird die Nitrocellulosemembran ca. 5 min mit dem Farbstoff Ponceau S (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH) behandelt und danach durch einmaliges Waschen mit destilliertem Wasser und viermaliges Waschen mit TBST entfärbt. Nach Zugabe von 10 ml Blocking-Puffer folgt eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler, wodurch freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden. Nach Zufügen des ersten Antikörpers und einer Inkubation für 12-15 h bei 4°C erfolgt das Entfernen der ungebundenen Antikörper mit TBST-Lösung und das Zufügen von 2 µl des zweiten Antikörpers. Nach erneutem Waschen mit TBST-Lösung wird jeweils 750 µl ECL-Lösung gemischt (Fa. GE Healthcare), sie auf der Nitrocellulosemembran verteilt und die Membran 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wird in einer Dunkelkammer der Röntgenfilm (Fa. GE Healthcare) aufgelegt. Dabei variiert die Expositionszeit je nach Intensität des Signals.

Eingesetzte Antikörper:

Primäre Antikörper:

Anti-FLAG (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)

β-Aktin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH)

Lamin B (Fa. Santa cruz)

MEF 2A (Fa. Upstate cell signaling solutions)

NFATc2 (Fa. Santa cruz)

Sp1 (Fa. Santa cruz)

Sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt):

Anti-mouse-Antikörper IgG (Fa. Cell signaling technology)

Anti-rabbit-Antikörper IgG (Fa. Cell signaling technology)

2.4. GST-Pulldown-Assay

2.4.1. Präparation des rekombinanten GST-NFAT-Proteins

Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine werden durch pGEX-Plasmide kodiert. Die Amplifikation des pGEX GST-NFAT-Plasmids sowie die Proteingewinnung erfolgt in *Escherichia coli* des Stammes BL21. Dazu werden 5 ml LB-Medium (Fa. Roth) und 5 µl Ampicillin (Fa. Sigma aldrich Chemie GmbH) mit den transformierten Kolonien angeimpft und die Kultur für 12-15 h bei 37°C in einem Kippschüttler bis zu einer OD₆₆₀ von 0,2-2 inkubiert. Durch Hinzugabe von 0,75 mM IPTG-Lösung (Fa. AppliChem) wird die Expression des NFAT-Fusionsproteins induziert. Dabei wird jeweils nur eine der zwei Kulturen jedes rekombinanten Klons mit IPTG induziert, sodass die zweite Kultur nur GST exprimiert und als Versuchskontrolle dient. Die Mischung wird erneut für ca. 6 h bei 37°C auf einem Kippschüttler inkubiert.

Nach Abzentrifugation des Überstandes (4.500 rpm, 25 min, 4°C) wird das Pellet in 5 ml eiskalter, mit Protease-Inhibitoren (100 µl PMSF) versetzter, PBS-Lösung resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch kurze 10-malige Sonifizierung. Im Anschluss wird das Lysat durch Zentrifugation (14.000 rpm, 20 min, 4°C) gereinigt und der Überstand in neue Eppendorf-Cups überführt.

PBS:

8,00	g/l	NaCl
0,20	g/l	KCl
1,15	g/l	Na ₂ HPO ₄
0,20	g/l	KH ₂ PO ₄

Zur Identifizierung der hergestellten Proteine werden 20 µl der Proben auf ein 10%-Acrylamidgel aufgetragen und eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt.

Zur Färbung der Proteine wird das Gel mit einer Lösung von „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Fa. AppliChem) für ca. 12-15 h auf einem Kippschüttler inkubiert. Im Anschluss wird überschüssiger Farbstoff bis zum Erscheinen sichtbarer Proteinbanden mit einer Methanol-Essigsäure-Lösung (2:1) ausgewaschen.

Coomassie Brilliant Blue-Lösung:

0,1	%	Coomassie Brilliant Blue R-250
20	%	Methanol
10	%	Essigsäure (Fa. Merck KGaA)

2.4.2. GST-Pulldown

GST-Pulldown-Versuche dienen dazu, *in vitro* zu überprüfen, ob zwei Interaktionspartner in physikalische Wechselwirkung treten.

100 µl aufgereinigte Glutathion-Agarose-Beads (Fa. GE Healthcare) werden mit 3 µg bakteriell exprimiertem GST oder GST-NFAT in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit 400 µl DPBS aufgefüllt. Die Proben werden bei 4°C im Überkopffrotor für 3-4 h inkubiert, abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Zu den Glutathion-Agarose-Beads werden 3 µg Gesamtprotein hinzugegeben und die Proben für weitere 12-15 h bei 4°C im Überkopffrotor inkubieren gelassen. Über diese Glutathion-Agarose-Beads, die spezifisch an den GST-Fusionsproteinen binden, können nun Interaktionspartner von NFAT extrahiert werden. Die Isolierung der Komplexe erfolgt über Zentrifugation sowie über mehrere Waschschrte, um unspezifische Proteine zu entfernen. Zum Schluss werden die Proben mit 30 µl Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt, bevor sich die Analyse im Western Blot anschließt.

2.5. Thymidin-Proliferations-Assay

Die Methode des Thymidin-Proliferations-Assays dient der Analyse der Zellproliferation. Die Quantifizierung neu synthetisierter DNA erfolgt über den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide. Da genomische DNA vor der Zellteilung repliziert werden muss, werden diese markierten DNA-Bausteine in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Bei der Zellteilung erhalten dann Mutter- und Tochterzelle auf Grund der semikonservativen Replikation je einen markierten DNA-Strang (Luttmann et al. 2004).

Hierzu werden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und nach Protokoll transfiziert. Für die Markierung der Zellen wird 1 ml serumhaltiges Medium mit 0,5 μ l Thymidin versetzt, die Mischung auf die Zellen pipettiert und für 5 h im Brutschrank bei etwa 37°C inkubiert. Tritiiertes Thymidin ist ein schwacher β -Strahler, dessen β -Partikel in der Luft nur ca. 0,5 cm weit strahlen. Um die Radioaktivität quantifizieren zu können, werden die Zellen nach Inkubation und Extraktion der DNA in Scintillationsröhrchen, die mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit gefüllt sind, überführt, die Proben gemischt und schließlich im β -Counter gemessen (Luttmann et al. 2004).

2.6. Genexpressionsprofilanalyse

Die Genexpressionsprofilanalyse erlaubt die zeitgleiche Identifizierung und Quantifizierung einer Vielzahl von Genen.

Als Ausgangsmaterial wird RNA aus Pankreaskarzinomzellen, die bereits am Vortag in 6-Well-Platten ausgesät und behandelt wurden, nach dem Protokoll des Herstellers mittels „RNeasy Mini Kits“ (Fa. Quiagen) isoliert. Wegen der größeren Instabilität von RNA im Vergleich zu DNA muss diese für die quantitative Real-Time-PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wird die enzymatische reverse Transkription nach dem Protokoll des Herstellers (Fa. SuperArray Bioscience Corporation) mittels „First Strand cDNA Synthesis Kit“ durchgeführt. Anschließend wird die synthetisierte cDNA mit dem „SuperArray SYBR Green Mastermix“ und den darin enthaltenen Oligonukleotidprimern gemischt und eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt.

Die quantitative Real-Time-PCR dient der *in vitro* Vervielfältigung von Nukleinsäure, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion beruht, aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotidprimer, Nukleotide sowie die zu vervielfältigende DNA vermischt. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die DNA auf 94°C erhitzt, wodurch sich die beiden Stränge trennen. Durch Senkung der Temperatur auf 55°C binden die Oligonukleotidprimer einzelstrangspezifisch (Annealing), d.h. sie hybridisieren komplementär zu einem Strang im Randbereich des zu amplifizierenden Abschnitts. Während der nun folgenden Polymerasereaktion erfolgt die Zweistrangsynthese (Elongation). Hierzu wird die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, die in heißen Quellen wächst und deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus, indem sich die Fluoreszenzfarbstoffe (SYPR Green) an die DNA anlagern bzw. an die doppelsträngige DNA binden und die Fluoreszenzintensität dieser Farbstoffe pro Zyklus zunimmt (Mühlhardt 2004). Die Messung wird mittels 7500 Fast-Real-Time-PCR-System (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Auswertung der Genexpressionsprofile erfolgt nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Bei dieser Methode werden die Differenzen der CT-Werte von Ziel- und Referenzgen berechnet (ΔCT) und diese auf den Wert der mit unbehandelten Zellen bezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$). Anschließend erfolgt die Delogarithmierung der Daten.

2.6.1. Quantitative Real-Time-PCR

2.6.1.1. cDNA-Synthese

Ca. 2 μg der isolierten RNA werden mit 0,5 μl OligoPrimer versetzt, mit 11 μl H_2O aufgefüllt und für 5 min bei 70°C auf einem Thermoblock erhitzt. Im Anschluss erfolgt eine kurze Abkühlung auf Eis.

Je Probe wird folgende Lösung zu der RNA gegeben:

2	μl	5mM dNTPs (Fa. Stratagene)
2	μl	10x Puffer RT (Fa. Quiagen)
0,5	μl	RNAse Inhibitor (Fa. Ambion)
1	μl	Polymerase (Fa. Fermentas)
3,5	μl	H_2O

Abschließend werden die Proben bei 37°C auf einem Thermoblock für 1 h inkubiert.

2.6.1.2. Quantitative Real-Time-PCR-Analyse

Je Probe wird folgende Mischung vorbereitet:

10	µl	2x Sybr Green (Fa. Applied Biosystems)
0,1	µl	10 pmol Primer rev
0,1	µl	10 pmol Primer for
8,8	µl	H ₂ O

Die Proben werden mit 1 µl 1:10 verdünnter cDNA gemischt und auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgt mit Hilfe des 7500 Fast-Real-Time-PCR-Systems (Fa. Applied Biosystems).

Verwendete Oligonukleotidsequenzen:

cFos-for: 5`-AGTCCTTACCTCTTCCGGAGATG-3`

cFos-rev: 5`-GCCTGGCTCAACATGCTACTAA-3`

(Fa. Biomers.net GmbH)

2.7. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen und dessen intrazellulärer Lokalisation mittels einer Immunreaktion. Im ersten Inkubationsschritt bindet der antigenspezifische Primär-Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit einem Fluoreszein-markierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Dabei können GFP-Fusionsproteine, die in die Zellen transfiziert wurden, direkt durch ihre eigene Fluoreszenz nach Bestrahlung mit UV-Licht nachgewiesen werden.

Dazu werden 40.000-50.000 Zellen auf Deckgläschen oder „Chamberslides“ (Fa. Nalge Nunc International) ausgesät und je nach Protokoll transfiziert und/oder behandelt. Etwa 24 h später werden die Zellen mit PBS++ gewaschen und 20 min lang bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd in PBS++ fixiert. Nach zwei Waschschritten erfolgt die Permeabilisierung der Zellen für 25 min bei Raumtemperatur, indem die Zellen mit einer Lösung aus 0,2% Triton X 100 (Fa. Roth) in PBS++ überschichtet und schließlich mit 10% FCS in PBS++ (Blocking Solution) für 10 min bei Raumtemperatur gesättigt werden. Der primäre Antikörper wird mit der Blocking Solution (1:100) verdünnt und 1 h auf den Zellen inkubiert. Den speziesspezifischen Antikörper Alexarot (Fa. Invitrogene) (1:500 in 10% FCS in PBS++) wird für 30 min unter Lichtausschluss auf den Zellen belassen.

Zum Schluss erfolgt die DAPI-Zellkernfärbung, indem 1 µl DAPI-Lösung (4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid) (Fa. Merck KGaA) gelöst in 10 ml PBS++ 30 min lang auf die Zellen pipettiert werden. Nach dem „Eindeckeln“ und einer 30-minütigen Trockenzeit werden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

PBS++-Lösung:

1000	ml	PBS
100	ml	MgCl ₂

Eingesetzte Primärantikörper:

NFATc2 (Fa. Santa cruz)

Sp1 (Fa. Santa cruz)

Die Färbung und die Mikroskopie wurde in Kooperation mit Herrn Dr. med. German Horn Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

Die *nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen* (NFATs) wurden vor allem in der Regulierung der Immunantwort charakterisiert, wo sie in der Induktion der Genübertragung als Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen (Rao et al. 1997). In den letzten Jahren wurden NFAT-Proteine nicht nur in T-Zellen, sondern auch in anderen Zellen außerhalb des Immunsystems beobachtet, wo sie die Expression zentraler Gene der Differenzierung und des Wachstums kontrollieren (Viola et al. 2004). So werden sie u.a. auch in Pankreaskarzinomzellen (Buchholz et al. 2006) exprimiert.

NFAT-Proteine sind primär zytoplasmatisch lokalisiert und translozieren erst nach Aktivierung in den Zellkern. Dort interagieren sie mit anderen Bindungspartnern an der DNA (Hogan et al. 2003). Es handelt sich hierbei um Transkriptionsfaktoren, die mit NFAT-Proteinen kooperieren und so die Selektion und Regulierung NFAT-kontrollierter Gene beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung möglicher Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen.

3.1.1. Auswahl einer geeigneten Modellzelllinie

Im ersten Schritt wird nach einer geeigneten Pankreaskarzinomzelllinie, die NFATc2 im ausreichenden Maße bildet, gesucht. Hierfür stehen folgende Pankreaskarzinomzelllinien zur Verfügung: 8988t, 8988s, Suit-007, Suit-028, Imim-PC 1, Imim-PC 2, Panc-1 und AsPC 1. Die Proteinexpression wird mittels Western Blot untersucht.

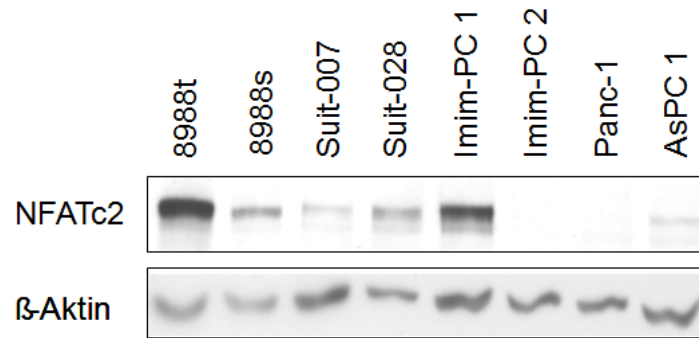


Abbildung 7:

Endogener Nachweis von NFATc2 in Pankreaskarzinomzelllinien:

Aus den acht in der Abbildung gezeigten Zelllinien werden die Proteine durch ein Gesamtzelllysat isoliert und in einen Western Blot eingesetzt. Der Blot wird anschließend mit Antikörpern gegen NFATc2 und der Ladungskontrolle β-Aktin inkubiert.

Es zeigen sich starke Expressionen von NFATc2 in den Zelllinien 8988t und Imim-PC 1, während schwache Expressionen bei den Zelllinien 8988s, Suit-007, Suit-028 und AsPC 1 zu beobachten sind. Des Weiteren können keine Banden im Falle von Imim-PC 2 und Panc-1 detektiert werden. Im unteren Blot ist die endogene Expression von β-Aktin, welches als Ladungskontrolle dient, zu sehen.

3.1.2. NFATc2 transloziert bei Vorhandensein von Ionomycin in den Nukleus

Eine Voraussetzung für die gemeinsame Interaktion von NFATc2 mit potentiellen Partnerproteinen bei der Regulierung der Transkription ist die zuverlässige Translokation von NFATc2 in den Zellkern mittels eines Stimulus. Als Reiz wird das Stimulans Ionomycin gewählt, das einen Calciueinstrom in

die Zelle bewirkt, woraufhin der Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg aktiviert, NFAT dephosphoryliert, kernversetzt und die DNA-Affinität erhöht wird (Macian et al. 2002). Nachteil dieses Stimulus ist seine Zelltoxizität, die eine Verwendung für Langzeitexperimente ausschließt.

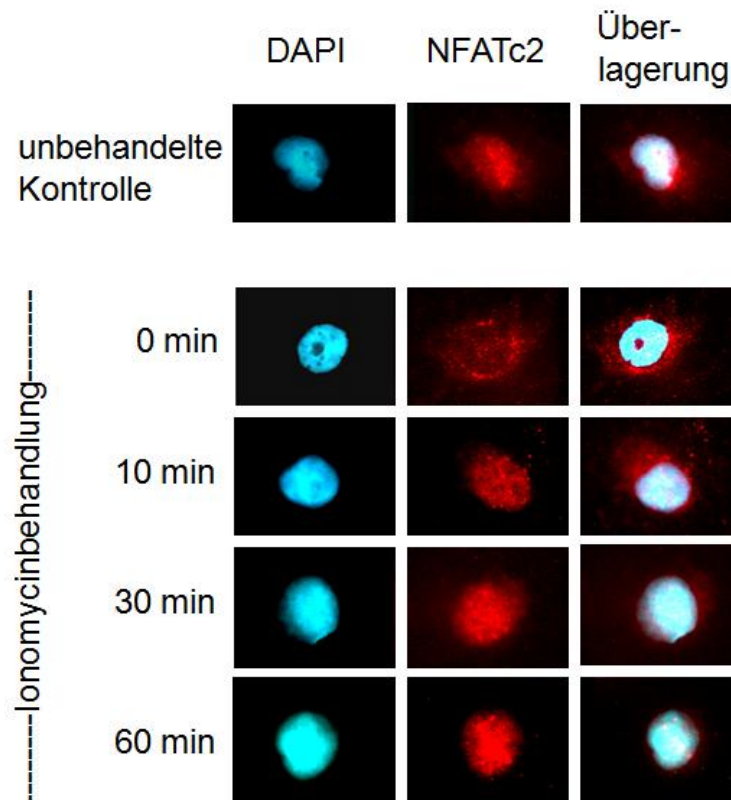


Abbildung 8: Immunfluoreszenzmikroskopie:

NFATc2 transloziert nach Zugabe von Ionomycin in den Nucleus:

8988t-Zellen bleiben unbehandelt oder werden 3 h lang mit serumfreiem Medium versetzt und für 0 min, 10 min, 30 min oder 60 min mit 0,5 µM Ionomycin behandelt, in Paraformaldehyd fixiert und mit dem NFATc2-Antikörper inkubiert. Die Zellkerne (blau) sind mit DAPI angefärbt, endogenes NFATc2 (rot) mit Alexarot.

In der Immunfluoreszenzstudie ist in unbehandelten Zellen die Lokalisation von NFATc2 in der gesamten Zelle zu erkennen, während bei Zusatz

serumfreien Mediums die Lage von NFATc2 im Zytoplasma feststellbar ist. Nach 10 min Stimulation mit Ionomycin findet eine Bewegung in den Zellkern statt. Diese Translokation hat ihr Maximum bei 30 min und hält nach 60 min Stimulation immer noch an. Die Überlagerung der DAPI-Zellkern-Färbung mit NFATc2 bestätigt die Position von NFATc2 nach Stimulation von Ionomycin im Zellkern.

Darüber hinaus kann diese Translokation durch Ionomycin auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden.

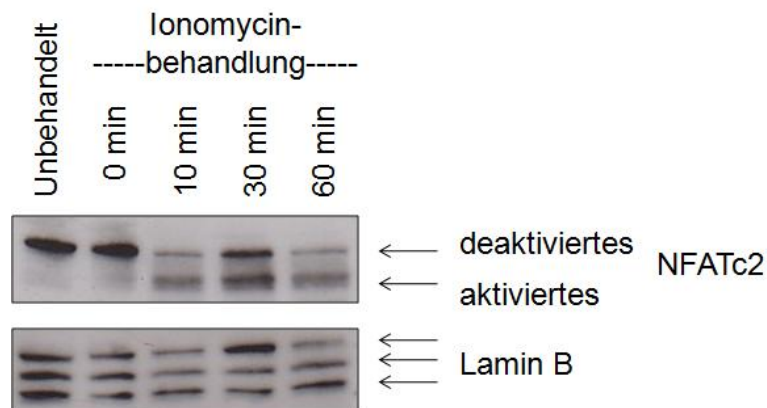


Abbildung 9: Western Blot:

NFATc2 transloziert nach Zugabe von Ionomycin in den Nucleus:

Für 3 h ausgehungerte Pankreaskarzinomzellen werden für weitere 0 min, 10 min, 30 min und 60 min mit 0,5 μ M Ionomycin stimuliert. Es erfolgt ein nukleäres Zellysate sowie das Einsetzen der Proteine in ein 10%iges Acrylamidgel. Der Nachweis wird mittels NFATc2-Antikörper sowie der Ladungskontrolle Lamin B durchgeführt.

In der Kontrolle (Spur 1) und bei den unstimulierten, aber mit serumfreiem Medium versetzten Zellen (Spur 2) ist mit dem verwendeten Antikörper nur eine Bande des phosphorylierten, deaktivierten NFATc2 detektierbar. Werden nun die Zellen für 10 min stimuliert (Spur 3), findet sich eine zweite Bande. Diese spiegelt die aktive, dephosphorylierte Form von NFATc2 wieder. Die

Signalstärke durchläuft ihr Maximum nach 30 min Ionomycinbehandlung und nimmt nach 60 min wieder etwas ab.

3.1.3. Endogene Expression von in der Literatur bekannten NFATc2-Partnerproteinen

Im nächsten Schritt erfolgt der Nachweis bekannter NFAT-Partnerproteine in Pankreaskarzinomzellen, die in der Literatur bereits in anderen Organ-systemen beschrieben worden sind und zusätzlich folgende Kriterien erfüllen:

1. eine Calcium-abhängige Regulierung und
2. eine nachgewiesene onkogene Wirkung im Organismus.

Der Nachweis wird in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien (8988t, 8988s, Suit-007, Suit-028, Imim-PC 1, Imim-PC 2, Panc-1 und AsPC 1) auf Proteinebene mittels Western Blot durchgeführt.

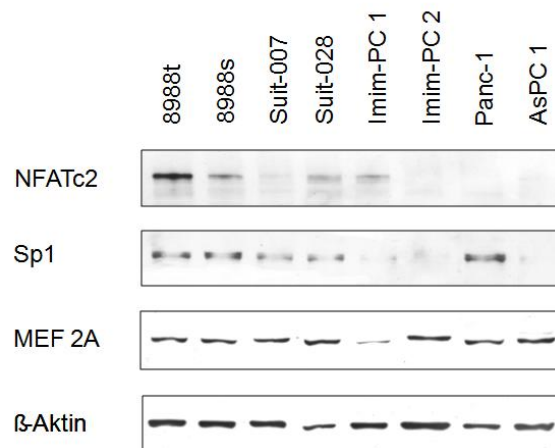


Abbildung 10:

Endogener Nachweis potentieller NFATc2-Partnerproteine:

Hierzu wird Gesamtzelllysat aus den einzelnen Zelllinien gewonnen, auf ein 10%-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Hilfe der Antikörper NFATc2, Sp1 und MEF 2A sowie der Ladungskontrolle β -Aktin im Western Blot nachgewiesen.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus Abbildung 7, kann die Bildung von NFATc2 in den Zelllinien 8988t, 8988s, Suit-028 und Imim-PC 1 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigt sich im Falle des Transkriptionsfaktors Sp1 eine starke Expression in den Zelllinien 8988t, 8988s, Suit-007, Suit-028 und Panc-1. Die Expressionslevel von MEF 2A sind in allen untersuchten Zelllinien sehr ähnlich. Lediglich eine etwas weniger intensive Bande findet sich bei Imim-PC 1.

Zusammenfassend wird eine starke Expression von NFATc2 sowie seiner potentiellen Partnerproteine Sp1 und MEF 2A in der Pankreaskarzinomzelllinie 8988t beobachtet, sodass diese Zelllinie für die nächsten Interaktionsversuche als Modellzelllinie verwendet wird.

3.1.4. Physikalische Interaktion von NFATc2 mit potentiellen Partnerproteinen in der Immunpräzipitation

Nachdem die endogene Expression von Sp1 und MEF 2A in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt wurde, werden Immunpräzipitationsversuche durchgeführt. Sie ermöglichen die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und können eine erste Aussage über die Interaktion von Partnerproteinen liefern.

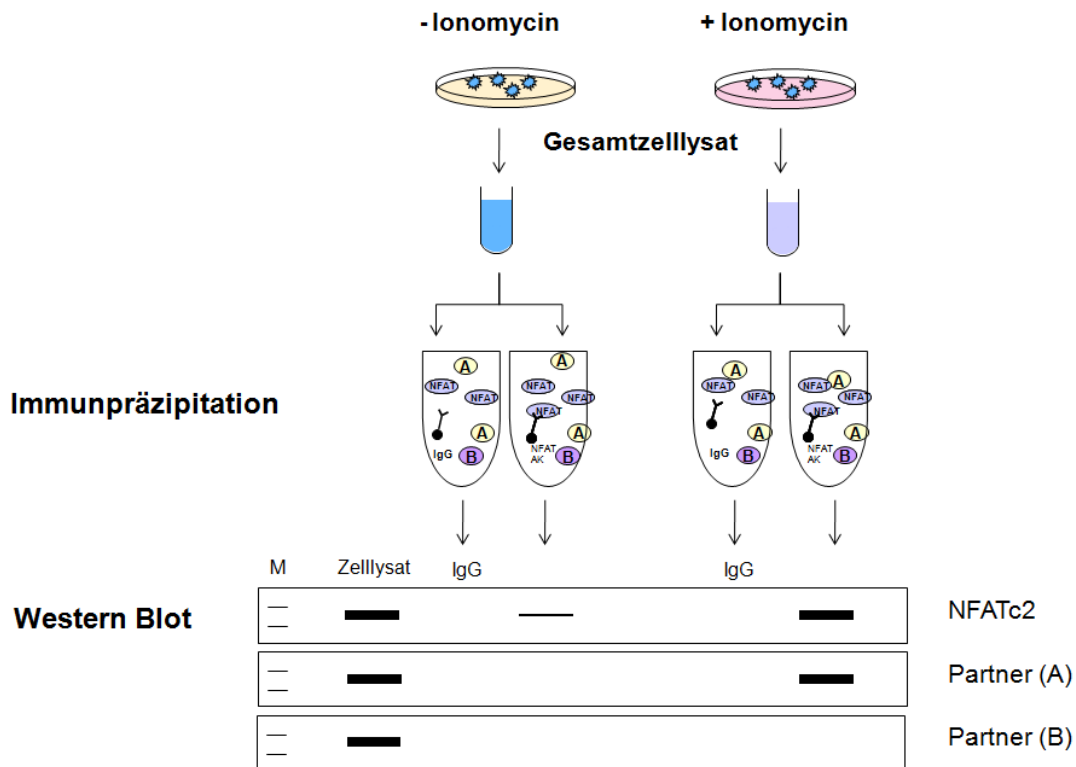


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus:

Pankreaskarzinomzellen werden nach Versetzen mit serumfreiem, ionomycinfreiem bzw. -haltigem Medium behandelt. Nachdem die Zellen durch ein Zelllysat aufgebrochen und in jeweils zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt wurden, erfolgt die Zugabe des unspezifischen Antikörpers IgG bzw. des spezifischen Antikörpers NFATc2. Über diesen Antikörper und Protein A/G-Beads wird das Zielprotein samt Interaktionspartner extrahiert und mittels Western Blot nachgewiesen.

Abbildung 11 zeigt illustrativ den Aufbau der Immunpräzipitation nach Isolation von NFATc2 und den Nachweis gebundener Partnerproteine. Reihe 1 zeigt die Präzipitation von NFATc2 in Abhängigkeit von der Stimulation. In Abwesenheit von Ionomycin sollte nur eine geringe Intensität von NFATc2 detektierbar sein, deren Deutlichkeit und Intensität durch die Behandlung zunimmt. In den beiden unteren Reihen ist schematisch die Koimmunpräzipitation der potentiellen Interaktionspartner A und B dargestellt. Kommt es zu einer

Interaktion mit NFAT, können die Partnerproteine kopräzipitiert und ebenfalls im Western Blot nachgewiesen werden.

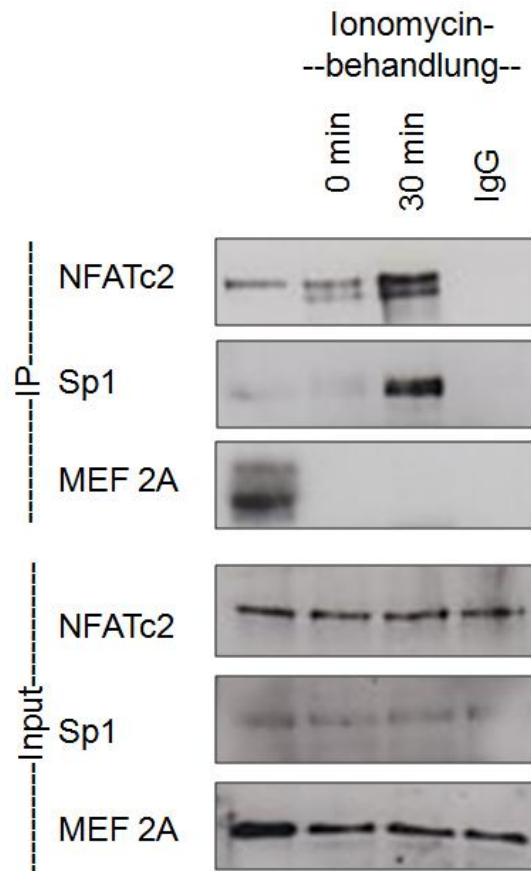


Abbildung 12: Physikalische Interaktion von NFATc2 mit seinen potentiellen Partnerproteinen:

Die Modellzelllinie 8988t wird nach dreistündiger Zugabe serumfreiem Mediums für 0 min oder 30 min lang mit 0,5 μ M Ionomycin behandelt. Danach wird geerntet und lysiert. Nach Zugabe des NFATc2-Antikörpers und Protein A-Beads wird NFATc2 samt Interaktionspartner extrahiert. Der Nachweis erfolgt mittels Western Blot.

In Reihe 1 von Abbildung 12 ist die Immunpräzipitation von NFATc2 in Abhängigkeit von der Dauer der Ionomycinstimulation zu sehen. Während in ausgehungerten Zellen nur wenig NFATc2 präzipitiert wird, wird ein deutlich intensiveres Signal unter Ionomycinstimulation detektiert.

Im Nachweis der in Pankreaskarzinomzellen exprimierten, potentiellen Partnerproteine Sp1 und MEF 2A (Reihe 2+3) kann Sp1 als Bindungspartner von NFATc2 kopräzipitiert werden. Dessen Signalstärke nimmt unter Ionomycinbehandlung ebenfalls signifikant zu.

MEF 2A als potentieller Bindungspartner konnte nicht nachgewiesen werden und scheint daher kein Interaktionspartner von NFATc2 im Pankreaskarzinom zu sein. Reihe 4-6 zeigen die Input-Kontrollen.

Zur Verifizierung und Charakterisierung der hier beschriebenen Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 werden im Folgenden zusätzlich weitere Methoden angewandt.

3.2. NFATc2 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 im Pankreaskarzinom

Bereits 2001 publizierte Maria Paola Santini die Interaktion zwischen NFAT und Sp1 in Keratinozyten (Santini et al. 2001). Eine solche Interaktion erfolgt entsprechend unserer Ergebnisse ebenfalls in Pankreaskarzinomzellen, wobei wir zusätzlich zeigen können, dass die Transkriptionsfaktoren im selben Immunkomplex an der NFAT-DNA-Targetsequenz GGAAA in direkte Wechselwirkung treten und eine gemeinsame Funktion ausüben.

3.2.1. NFATc2 kolokalisiert mit Sp1 im selben Immunkomplex

Zunächst wird mittels Immunfluoreszenz eine mögliche Kolokalisation von NFATc2 und Sp1 im Nukleus untersucht. Hierzu werden Pankreaskarzinomzellen mit NFATc2-GFP transient transfiziert und in serumhaltigem Medium belassen oder für 3 h serumfrei gesetzt und mit Ionomycin über unterschiedliche Zeitpunkte stimuliert. Endogenes Sp1 wird mittels Antikörperreaktion nachgewiesen.

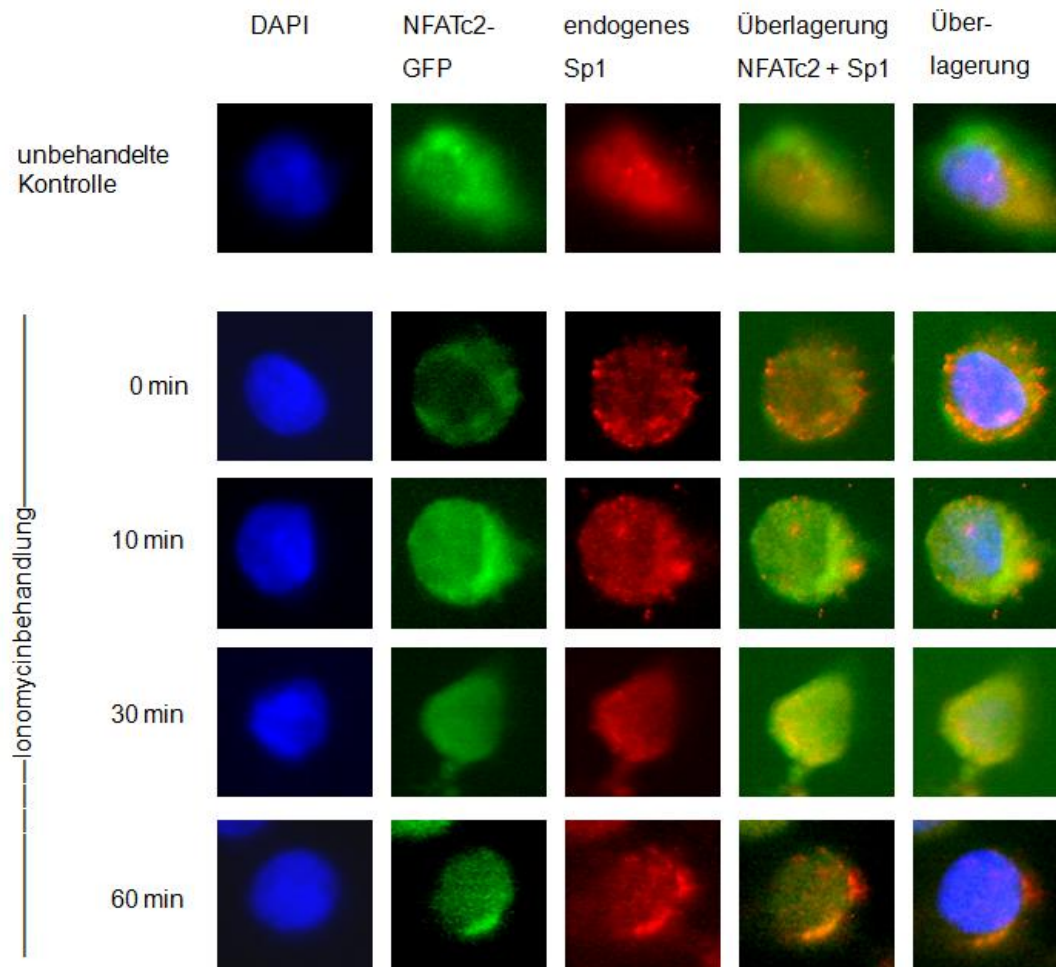


Abbildung 13:

Kolokalisation von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1:

8988t-Zellen werden mit NFATc2-GFP transient transfiziert und verbleiben in serumhaltigem Medium oder werden nach 24 h für 3 h serumfrei gesetzt und 0 min, 10 min, 30 min oder 60 min mit 0,5 µM Ionomycin stimuliert. Es erfolgt die Fixierung in Paraformaldehyd und die Inkubation mit dem Sp1-Antikörper. Die Zellkerne (blau) sind mit DAPI angefärbt, endogenes Sp1 (rot) mit Alexarot und NFATc2-GFP grün.

In der Immunfluoreszenzstudie zeigt sich analog zu Abbildung 8 in unbehandelten Zellen die Lokalisation von NFATc2-GFP in der gesamten Zelle, während unter Versetzung mit serumfreiem Medium ausschließlich eine Lokalisation von NFATc2-GFP im Zytoplasma feststellbar ist. Nach 10 min und

30 min Stimulation mit Ionomycin findet eine Translokation von NFATc2 in den Zellkern statt, deren Maximum nach 60 min erreicht wird. Sp1 scheint keiner Regulation durch Ionomycin zu unterliegen und wird v.a. im Zellkern beobachtet.

Die Überlagerung von NFATc2-GFP mit Sp1 deutet auf eine Ionomycin-induzierte Kolo-kalisation der beiden Partnerproteine im Zellkern hin, die durch die zusätzliche Überlagerung durch DAPI (Zellkernfärbung) bestätigt werden kann.

3.2.2. Koimmunpräzipitation von NFATc2- und Sp1-Komplexen aus Pankreaskarzinomzellen

Um die physikalische Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 durch die Ionomycinbehandlung bezüglich des Zeitintervalls zu untersuchen, werden erneut Immunpräzipitationsversuche durchgeführt.

Die Pankreaskarzinomzellen werden nach 3 h Aushungern mit der Stimulans Ionomycin zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt, geerntet, das Gesamtzelllysat aufgebrochen und die Proteine mit Hilfe von Agarosebeads und Antikörper gegen NFATc2 präzipitiert. Das Präzipitat wird dem Western Blot zugeführt und schließlich nach gebundenem Sp1 gesucht.

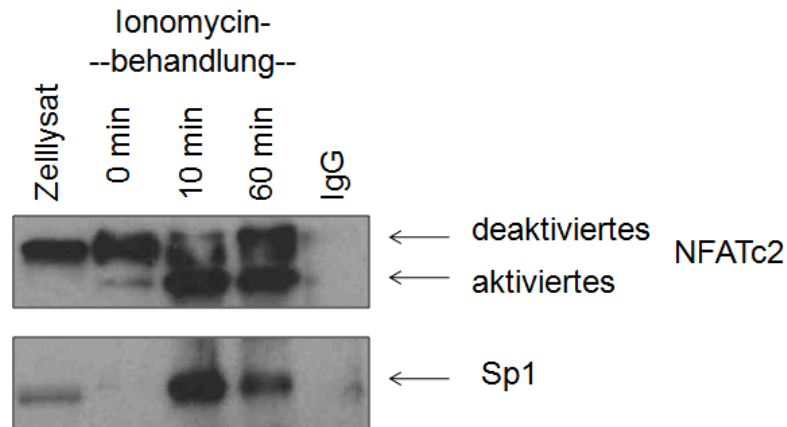


Abbildung 14: Physikalische Interaktion von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1:

Nach dreistündigen Versetzen von 8988t-Pankreaskarzinomzellen mit serumfreiem Medium werden diese mit 0,5 μ M Ionomycin im definierten Zeitintervallen (0 min, 10 min und 60 min) stimuliert, geerntet, lysiert und die NFATc2-Proteine über einen an Agarosebeads gekoppelten Antikörper immunpräzipitiert. Im Western Blot wird an NFATc2 gebundenes Sp1 analysiert.

Mit dem verwendeten Antikörper gegen NFATc2 können zwei Banden detektiert werden, die die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien des Proteins widerspiegeln.

Durch 10-minütige Ionomycinbehandlung kommt es zu einer deutlichen Signalverstärkung des aktivierten, dephosphorylierten NFATc2, die auch nach 60-minütiger Stimulation anhält.

Die untere Bande in Abbildung 14 reflektiert gebundenes Sp1. Es wird nach 10-minütiger Ionomycinzugabe, analog zu NFATc2, deutlich mehr Sp1 detektiert. Nach 1 h kommt es wieder zu einer leichten Signalabnahme.

Zusammenfassend besteht die Annahme, dass Ionomycin die Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 in der frühen Phase der Stimulation begünstigt.

Analog wird Sp1 immunpräzipitiert und im Western Blot koimmunpräzipitiertes NFATc2 nachgewiesen.

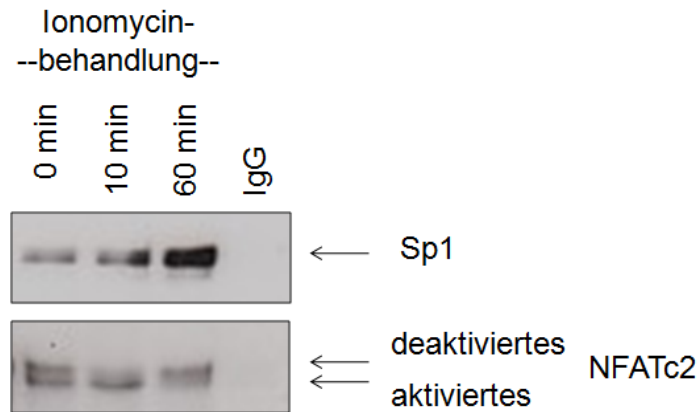


Abbildung 15: Physikalische Interaktion von Sp1 mit dem Transkriptionsfaktor NFATc2:

Im Gesamtzelllysat aus Zellen, die zuvor 3 h ausgehungert mit 0,5 μ M Ionomycin in definierten Zeitintervallen (0 min, 10 min und 60 min) stimuliert wurden, werden Sp1-Proteine über einen an Agarosebeads gekoppelten Antikörper immunpräzipitiert und die Expression von Sp1 und NFATc2 mit Hilfe spezifischer Antikörper kontrolliert.

Hierbei zeigt sich eine durch Ionomycinbehandlung signifikant zunehmende Präzipitation von Sp1. Koimmunpräzipitiertes NFATc2 konnte ebenfalls bei allen drei Stimulationszeiten nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einem Shift von inaktivem NFATc2 (Zeitpunkt 0 min) zur Bindung von aktiviertem NFATc2 nach 10 min. Nach 60 min scheint nur noch wenig aktives NFATc2 an Sp1 gebunden zu sein.

3.2.3. NFATc2 und Sp1 interagieren physikalisch an der Targetsequenz von NFAT

Basierend auf diesen Ergebnissen werden DNA-Bindungsstudien (DNA-Pulldown-Assays) durchgeführt. Sie helfen, die physikalische Interaktion

zwischen NFATc2 und Sp1 in der Zelle zu verifizieren und deren Aktivität an der DNA zu untersuchen.

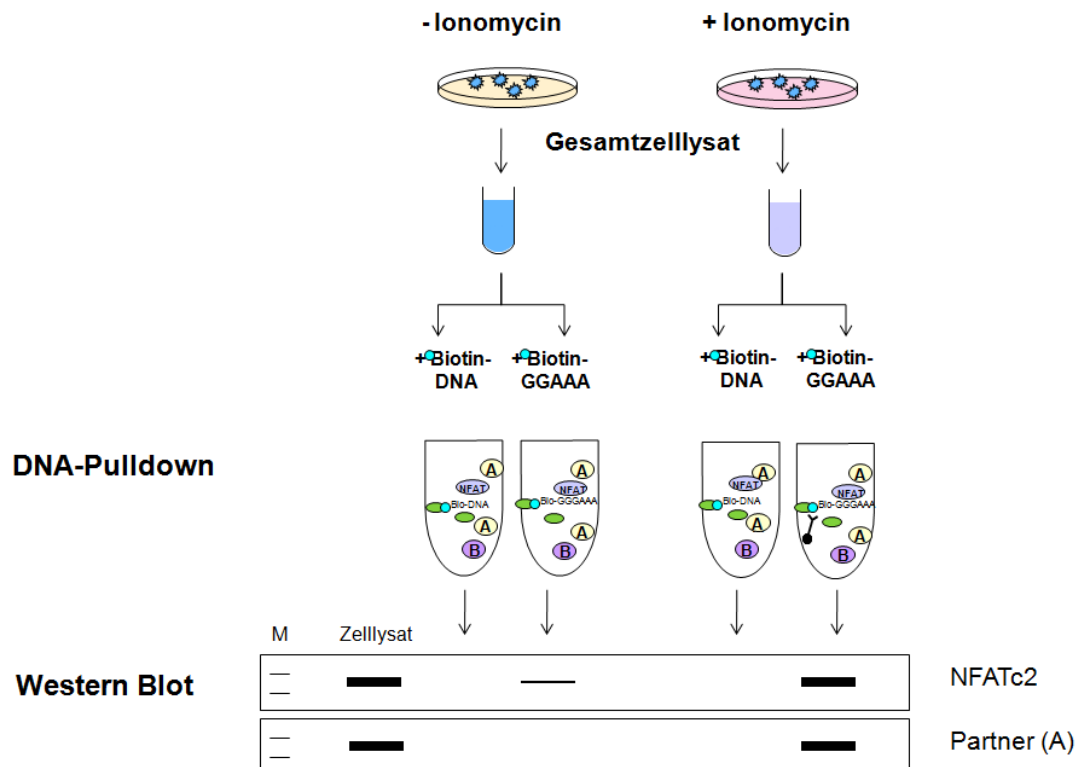


Abbildung 16: Schematische Darstellung des DNA-Pulldown-Versuchs:

Hierzu werden erneut Pankreaskarzinomzellen mit ionomycinfreiem oder -haltigem Medium versetzt. Das Lysat der Zellen wird mit Biotin-markierter unspezifischer DNA bzw. Biotin-markierter NFAT-Targetsequenz GGAAA inkubiert. Die erhaltenen Protein-DNA-Komplexe können mit Streptavidin isoliert, präzipitiert und im Western Blot detektiert werden.

Im Western Blot ist durch Ionomycinbehandlung -im Vergleich zur un- behandelten Probe- eine intensivere Bande für NFATc2 detektierbar, da die DNA-Affinität von NFAT durch die Aktivierung des Calcium-Calcineurin-Weges erhöht wird. Kopräzipitierte Partnerproteine können ebenfalls im Western Blot mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen werden.

Für den Versuch wird die Pankreaskarzinomzelllinie 8988t mit Ionomycin über eine definierte Zeitdauer stimuliert und die Bindung von NFATc2 und Sp1 an die Oligonukleotidsequenz, die die NFAT-Konsensusbindungssequenz GGAAA beinhaltet, überprüft.

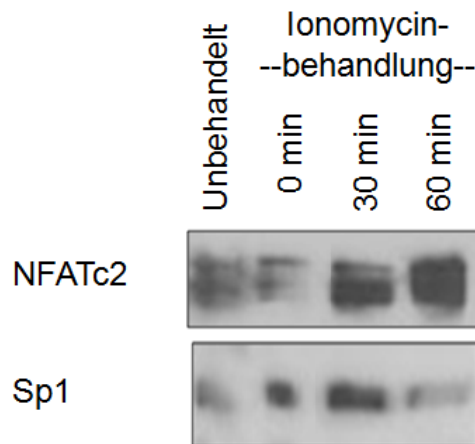


Abbildung 17: Physikalische Interaktion an der NFAT-Targetsequenz:

Das DNA-Oligonukleotid, welches die NFAT-Konsensusbindungssequenz GGAAA beinhaltet, wird mit Zelllysat von mit Ionomycin behandelten bzw. unbehandelten 8988t-Zellen inkubiert. Anschließend werden die an die Biotin-markierte Oligonukleotidsequenz gebundenen Proteine mit Streptavidin präzipitiert und im Western Blot mittels der entsprechenden Antikörper auf NFATc2 und Sp1 hin untersucht.

Durch die Ionomycinbehandlung kommt es zu einer erhöhten DNA-Affinität von NFATc2, die zu einer stärkeren Bindung an die NFAT-Targetsequenz nach Ionomycinstimulation führt. Nachweislich kann auch Sp1 als physikalischer Interaktionspartner von NFATc2 kopräzipitiert werden, was auf eine gemeinsame Bindung beider Proteine an der NFAT-Konsensussequenz hinweist.

Im nächsten Schritt wird neben einer 30-minütigen Ionomycinstimulation die endogene Expression von NFATc2 mittels siRNA-Technologie gehemmt und

untersucht, in wie weit sich die DNA-Interaktion der Partnerproteine unterbinden lässt.

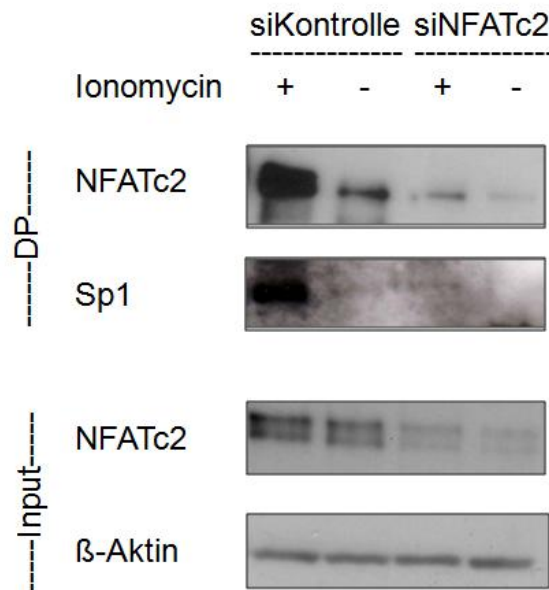


Abbildung 18: DNA-Pulldown-Assay:

8988t-Zellen werden mit einer „Silencer Negative Control“-siRNA bzw. einem NFATc2-spezifischen siRNA-Oligonukleotid transient transfiziert. Anschließend werden die Proteine lysiert und direkt (Reihe 3) bzw. nach Durchführung eines DNA-Pulldown-Assays (Reihe 1+2) nach 30-minütiger Ionomycinbehandlung auf das Gel aufgetragen. Die Proteine werden im Western Blot mit den Antikörpern NFATc2 und Sp1 angefärbt. Die vierte Reihe dient als Ladungskontrolle über β-Aktin.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass in Analogie zu Abbildung 17 und den Immunpräzipitationsstudien die Stimulation mit Ionomycin eine gesteigerte Promotorbindung von NFATc2 und Sp1 zur Folge hat. Werden die Zellen zusätzlich mit siRNA gegen NFATc2 behandelt, kommt es -im Vergleich zur siKontrolle- zu einer abgeschwächten NFATc2-Sp1-DNA-Bindung (Reihe 1+2). Gesamtzelllysat der behandelten Zellen wird direkt in Reihe 3 im Western Blot aufgetragen, um die Funktionalität der siRNA zu bestätigen. Reihe 4 zeigt die endogene Expression von β-Aktin als Ladungskontrolle.

3.2.4. NFATc2 und Sp1 treten in einem GST-Pulldown-Assay in vitro in direkte Wechselwirkung

GST-Pulldown-Assays dienen zur Beantwortung der Frage, ob die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen in physikalische Wechselwirkung treten. Dazu wird die Bindung von bakteriell exprimiertem GST-NFATc2 an Sp1, welches zuvor in die Pankreaskarzinomzelllinie 8988t durch Transfektion überexprimiert wurde, untersucht.

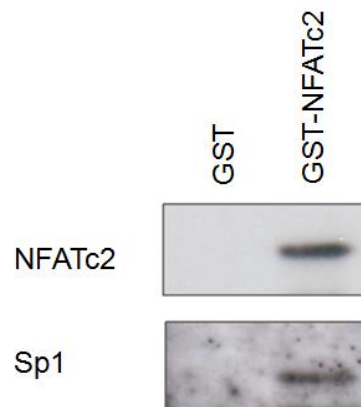


Abbildung 19:

Direkte Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 im GST-Pulldown-Assay:

Bakteriell exprimiertes GST und GST-NFATc2 sowie das zuvor in die Pankreaskarzinomzelle überexprimierte Sp1 werden einem GST-Pulldown-Assay zugeführt und die Präzipitate mittels Western Blot nachgewiesen.

Hierbei werden bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine, die zu keiner physikalischen Interaktion mit Transkriptionspartnern führen, als Kontrolle verwendet. Im Nachweis durch einen Western Blot kann als direkter, physikalischer Interaktionspartner Sp1 an GST-NFATc2-Fusionsproteine präzipitiert werden.

3.2.5. Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1

Mit Hilfe von Reporter-Promotor-Analysen wird im nächsten Schritt die funktionelle Relevanz von NFATc2 und Sp1 am Promotor untersucht.

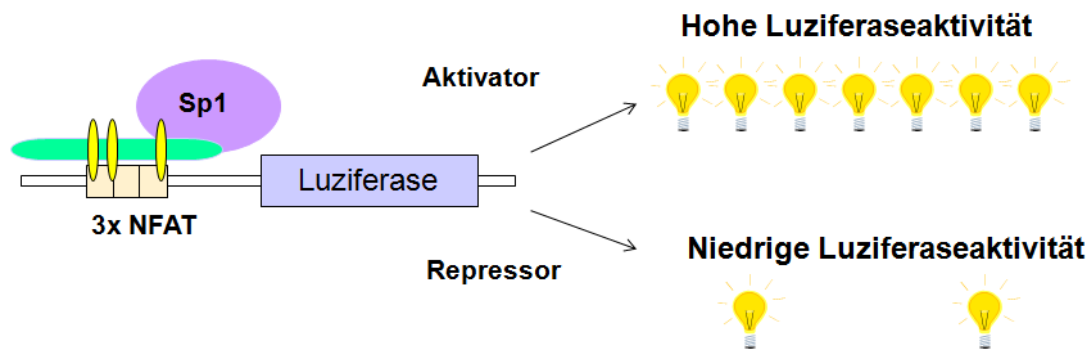


Abbildung 20:

Schematische Darstellung des dualen Luciferase-Assays:

In Reporter-Promotor-Analysen werden Effektor-Plasmide (NFATc2 und Sp1) sowie das artifizielle NFAT-responsive Reporter-Promotorkonstrukt cisNFAT-Luc, welches an das Luciferase-Gen kloniert wurde, in die Zelle transient transfiziert. Der zu untersuchende Transkriptionsfaktor bindet an die entsprechende, subklonierte Zielsequenz und induziert die Transkription. Durch Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin kommt es zur Freisetzung von Licht, welches mittels Luminometer detektiert wird.

Das cisNFAT-Luc Reporterplasmid beinhaltet drei hintereinander geschaltete GC-Boxen als Promotoren.

Nach Kotransfektion von NFAT zum cisNFAT-Luc-Promotor kommt es zu einer Zunahme der zuvor gemessenen basalen Aktivität (nicht gezeigt).

Werden die beiden Interaktionspartner Sp1 und NFATc2 gemeinsam transfiziert, kann es in Abhängigkeit davon, ob Sp1 als Aktivator oder Repressor wirkt, zu einer Aktivitätssteigerung oder -minderung des Promotors

kommen. Zudem erfolgt eine Zu- oder Abnahme der Lichtemission, bezogen auf die basale Aktivität bei Kotransfektion des Reporterplasmids mit seinem Effektor NFATc2.

Für den Versuch wird also das artifizielle NFAT-responsive Reporter-Promotorkonstrukt cisNFAT-Luc, welches ausschließlich drei hintereinander geschaltete NFAT-Bindungsstellen aufweist, mit den Effektorplasmiden NFATc2 oder Sp1 in die Pankreaskarzinomzelle transient transfiziert. In der Auswertung wird die basale Aktivität des Promotorkonstruktes cisNFAT-Luc auf den Wert 100 normiert und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle angegeben.

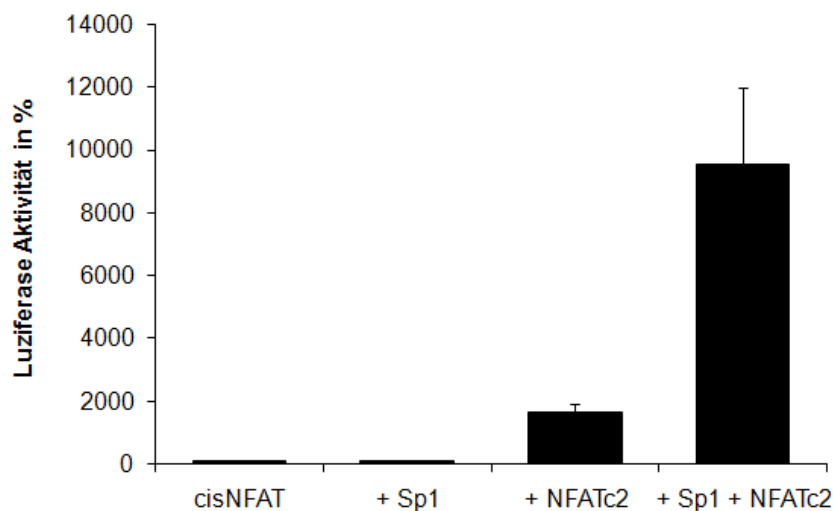


Abbildung 21: Dualer Luziferase-Assay:

Das artifizielle NFAT-responsive Reporter-Promotorkonstrukt cisNFAT-Luc wird mit den Effektorplasmiden NFATc2 und/ oder Sp1 in die Pankreaskarzinomzelllinie 8988t transient transfiziert und in den 24 h später geernteten Zelllysaten die relative Luziferaseaktivität bestimmt.

Die Transfektion des cisNFAT-Luc-Promotors zeigt die basale Aktivität der Zelle an (Säule 1). Ähnlich schwach sind die gemessenen Luziferase-Werte

nach Kotransfektion von Sp1 (Säule 2). Unter Transfektion von NFATc2 wird eine 16-fache Steigerung der Luziferase-Aktivität im Vergleich zur basalen Expression des Promotors beobachtet (Säule 3). Werden nun die Transkriptionsfaktoren NFATc2 und Sp1 in die Zelle kotransfiziert (Säule 4), wird eine weitere 6-fache Aktivierung des Reporterkonstruktes im Vergleich zur alleinigen NFATc2-Aktivität erzielt, sodass Sp1 die funktionelle Aktivität von NFATc2 am Promotor erheblich zu steigern vermag.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in diesem Kapitel mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden die Interaktion der onkogenen Transkriptionsfaktoren Sp1 und NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen unter Ionomycinstimulation verifiziert werden konnte. Des weitern wurde gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren im selben Immunkomplex an der NFAT-Targetsequenz GGAAA in direkte Wechselwirkung treten und Sp1 die funktionelle Aktivität seines Bindungspartners an dem NFAT-responsiven Promotorkonstrukt steigert. Diese Interaktion wird durch Ionomycin in der frühen Phase der Stimulation (bis 60 min) begünstigt.

3.3. **NFATc2 interagiert am N-Terminus mit Sp1**

NFATc2 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 und bildet Protein-komplexe.

Um diese onkogene Interaktion im Pankreaskarzinom hemmen zu können, ohne die physiologischen Funktionen von NFATc2 und Sp1 im Organismus zu stören, ist es wichtig zu klären, über welche Domäne im Sp1-Protein die Interaktion mit NFATc2 vermittelt wird.

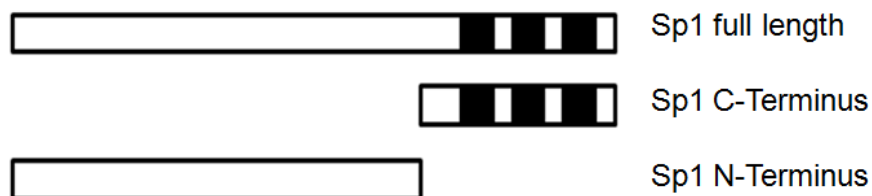


Abbildung 22:

Schematische Darstellung der eingesetzten Sp1-Deletionsmutanten:

Schwarz gefärbte Bereiche = Zinkfingerdomäne

Sp1 zählt zu den Zinkfingerproteinen und setzt sich aus einem ca. 70 kDa schweren N-Terminus aus aktivierenden Domänen und drei ca. 15 kDa großen C-Terminal lokalisierten Zinkfingeranteilen, die zugleich die DNA-Bindungsdomäne repräsentieren, zusammen.

3.3.1. Physikalische Interaktion zwischen NFATc2 und der Deletionsmutante Sp1-N-Terminus

Um die Fragestellung, über welche Domäne im Sp1-Protein die Interaktion mit NFATc2 vermittelt wird, zu klären, werden Immunpräzipitationsversuche durchgeführt.

Hierzu wird die Pankreaskarzinomzelllinie 8988t mit den Effektorplasmiden der Sp1-Deletionsmutanten FLAG-Sp1-C-Terminus (Zinkfingerdomäne) und FLAG-Sp1-N-Terminus in die Zelle transient transfiziert.

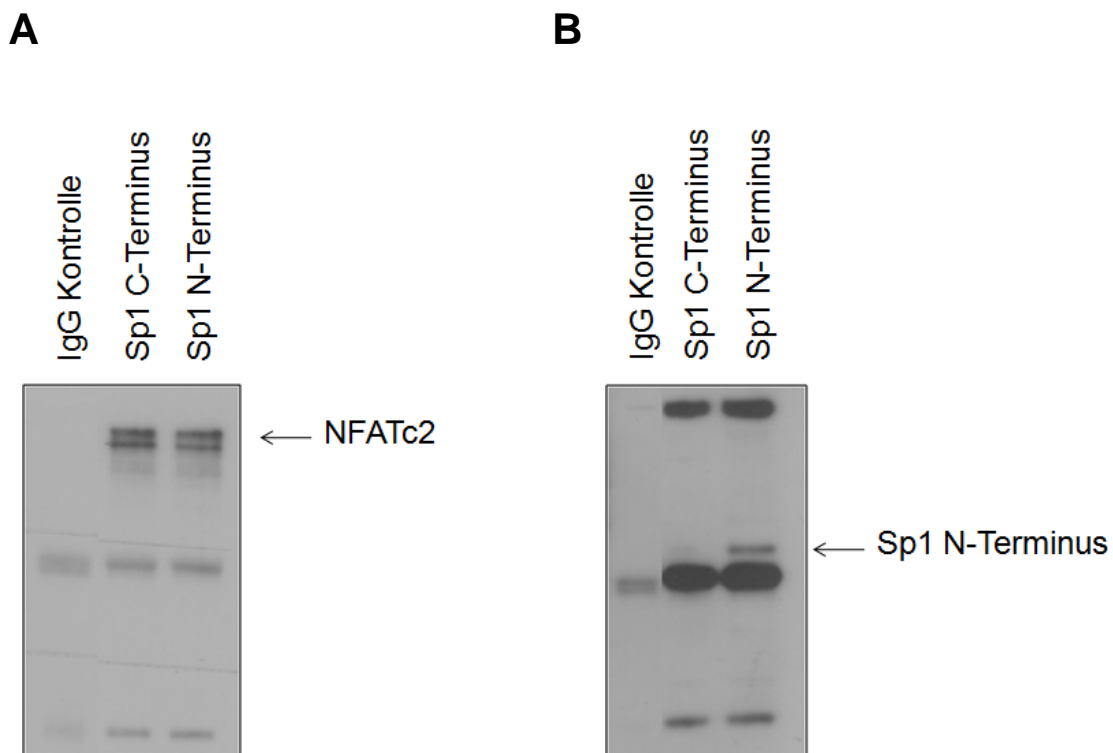


Abbildung 23: NFATc2 interagiert mit dem N-Terminus von Sp1:

Die Deletionsmutanten FLAG-Sp1-C-Terminus sowie FLAG-Sp1-N-Terminus werden in die Zelle überexprimiert, lysiert und die NFATc2-Proteine über einen an Agarosebeads gekoppelten Antikörper immunpräzipitiert. Im Western Blot wird an NFATc2 gebundenes Sp1 durch einen Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Mit Hilfe von Agarose und dem NFATc2-Antikörper wird NFATc2 präzipitiert und dem Western Blot zugeführt (Abbildung 23A). Erneut werden mit dem verwendeten Antikörper gegen NFATc2 zwei Banden detektiert, die die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien des Proteins zeigen.

Ebenfalls werden koimmunpräzipitierte Sp1-Deletionsmutanten mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 23B). Es lässt sich ein starkes Signal für den Sp1-N-Terminus erkennen, kein Signal für den Sp1-C-Terminus, sodass angenommen wird, dass NFATc2 am N-Terminus von Sp1 physikalisch interagiert.

3.3.2. Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und dem Sp1-N-Terminus im dualen Luziferase-Assay

Nachdem die physikalische Interaktion zwischen NFATc2 und dem Sp1-N-Terminus in der Immunpräzipitation gezeigt werden konnte, wird nun die funktionelle Interaktion durch das duale Luziferase-Assay untersucht. Hierzu werden das artifizielle NFAT-responsive Reporter-Promotorkonstrukt cisNFAT-Luc sowie die Effektorplasmide NFATc2, Sp1-C-Terminus und Sp1-N-Terminus in die Zelle transient transfiziert und das emittierte Licht mittels Luminometer quantifiziert. Dabei wird in der Auswertung die basale Aktivität des Promotorkonstruktes cisNFAT-Luc auf den Wert 100 normiert und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle dargestellt.

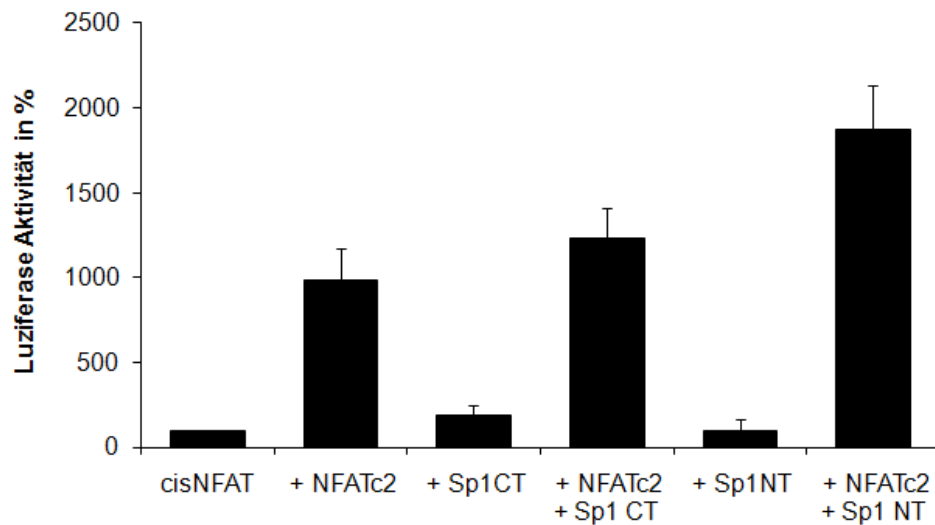


Abbildung 24: Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 im dualen Luziferase-Assay:

8988t-Zellen werden mit dem artifiziellen NFAT-responsiven Reporter-Promotorkonstrukt cisNFAT-Luc sowie den Effektorplasmiden NFATc2, Sp1-CT und Sp1-NT transient transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen geerntet und die Aktivierung des Promotors durch die Messung der Lichtemission bestimmt.

Bande 1 zeigt die basale Grundaktivität des Promotors, dessen Effektivität sich durch den Transkriptionsfaktor NFATc2 um das Zehnfache steigern lässt (Bande 2). Wird anstatt NFATc2 nur der Sp1-C-Terminus oder Sp1-N-Terminus in die Zelle transfiziert, kann keine bzw. nur eine sehr geringe Steigerung beobachtet werden (Bande 3 und 5). Kommt es zu einer Kofunktionspartner, kann in Bande 4 nur eine geringe, aber in Bande 6 eine Verdopplung der Lichtemission und damit der Aktivität des Promotors verglichen mit der alleinigen Transfektion von NFATc2 gemessen werden.

Zusammenfassend kann die physikalische Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1-N-Terminus aus der Immunpräzipitation somit auf funktionaler Ebene am Promotor bestätigt werden.

3.4. Sp1-artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der NFATc2-vermittelten Genregulation beteiligt

3.4.1. Genexpressionsprofilanalyse

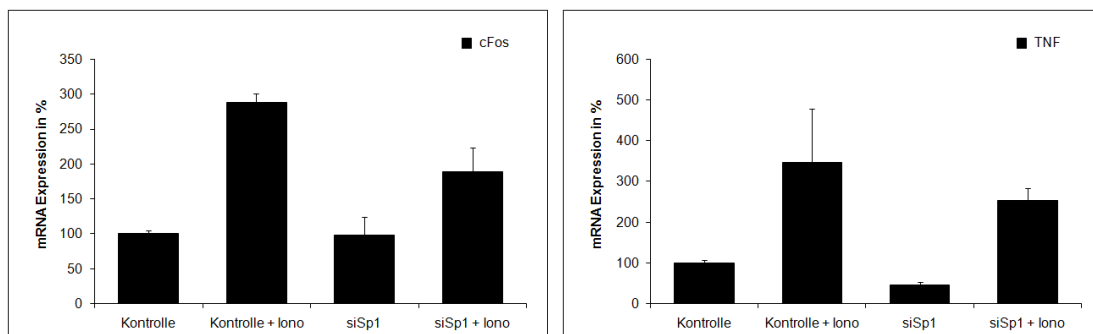
Um die Beteiligung der Sp1-Proteine an der Expression von NFATc2-Zielgenen in Abhängigkeit mit Ionomycin zu quantifizieren und um neue Zielgene zu identifizieren, wird ein Expressionsprofil von 8988t-Zellen erstellt.

Hierzu werden vier verschiedene Gruppen von mRNA aus 8988t-Lysaten hergestellt:

- 1) unbehandelte Kontrolllysate,
- 2) Lysate aus Zellen, die zuvor 1 h mit Ionomycin behandelt werden,
- 3) Zelllysate, bei denen Sp1 durch RNAi reprimiert wird und
- 4) Lysate, welche mit siRNA für Sp1 und zusätzlich einstündig mit Ionomycin stimuliert werden.

Diese werden der Expressionsprofilanalyse, welche 89 unterschiedliche an der Kanzerogenese beteiligten Gene beinhaltet, zugeführt und dessen Expression im 7500 Fast-Real-Time-PCR-System gemessen. Dabei wird in der Auswertung die basale Aktivität der Gene im Kontrolllysate auf den Wert 100 normiert und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle dargestellt.

Die verwendeten Gene stammen dabei hauptsächlich aus den vier Bereichen: Zellzyklus, Transkription, Signaltransduktion und extrazelluläre Matrix.



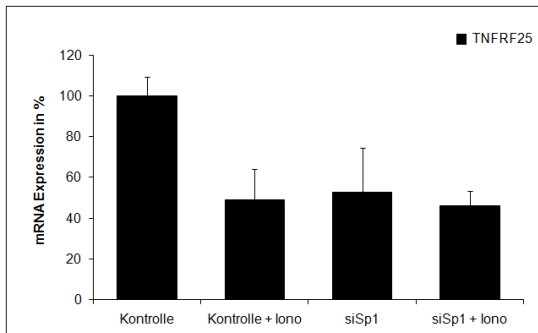
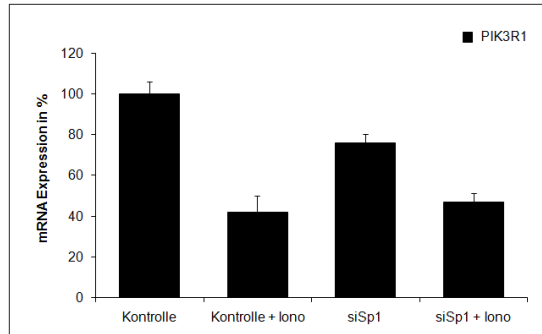
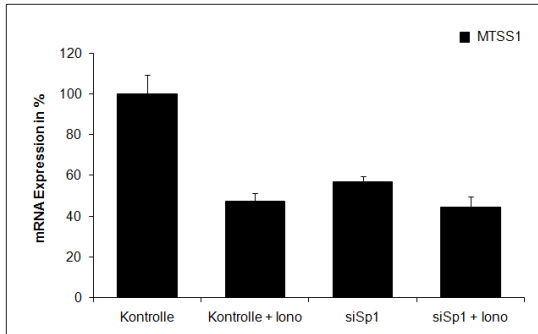
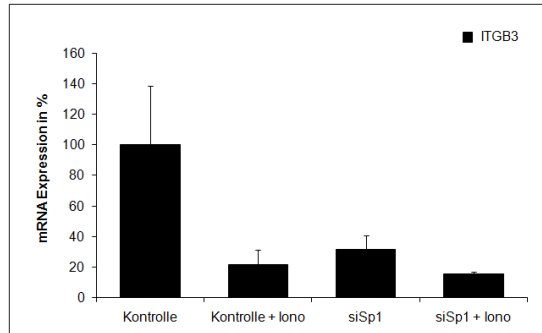
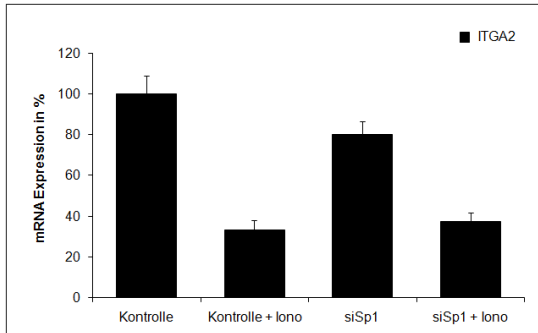
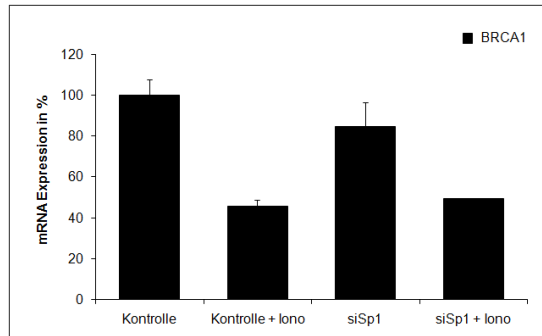
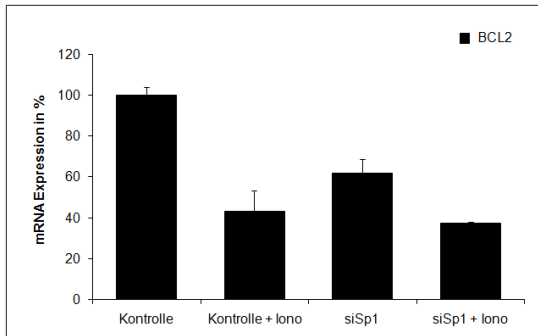
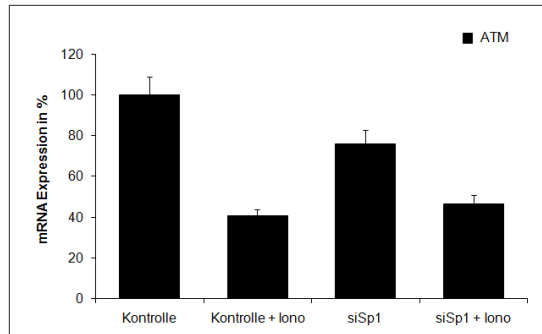
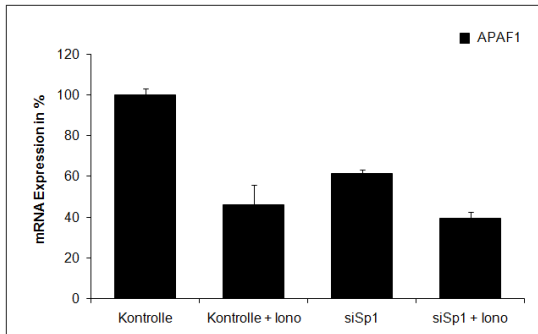


Abbildung 25 (vorherige Seite):

Expressionsprofilanalyse in Abhängigkeit der Ionomycinbehandlung:

8988t-Zellen werden jeweils wie oben beschrieben behandelt und lysiert. Die extrahierte mRNA wird in cDNA umgeschrieben, mit dem „SuperArray SYBR Green Mastermix“ und den darin enthaltenen Oligonukleotidprimern gemischt und eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode.

Insgesamt werden 11 Gene nach Ionomycinbehandlung differentiell exprimiert. Darunter befinden sich das Proto-Onkogen c-Fos und der Tumornekrosefaktor TNF-alpha, welche beide hochreguliert werden. Die an der Apoptose beteiligten Moleküle APAF1, ATM, BCL2, BRCA1, TNFRSF25, die Adhäsionsmoleküle Integrin- α -2 und Integrin- β -3, das Metastasen-Suppressorgen MTSS1 sowie die Phosphoinositide-3-Kinase werden vermindert synthetisiert.

Auffallend ist, dass für c-Fos und TNF-alpha der Ionomycineffekt durch Sp1-Hemmung minimiert wird. So wird in der Kontrollgruppe unter Ionomycinbehandlung ein Expressionsanstieg beobachtet (jeweils Bande 2). Wird Sp1 durch RNAi reprimiert, ist eine signifikante Beeinflussung des Ionomycineffektes durch Sp1-Hemmung erkennbar (jeweils Bande 4), sodass Sp1 bei der transkriptionellen Regulation dieser Gene beteiligt sein könnte. Ebenso kann bei ITGB3 ein antagonisierender Effekt von NFATc2 und Sp1 beobachtet werden. Werden die Kontrollzellen mit Ionomycin stimuliert, erfolgt eine mRNA Expressionsabnahme. Selbiges ist bei der Hemmung von Sp1 durch RNAi-Technologie festzustellen. Werden die Zellen jedoch aus einer Kombination von siSp1 und Ionomycin behandelt, nimmt die mRNA Expression um weitere 25% ab. Bei den restlichen 8 Genen, spielt Sp1 in der Regulation mit NFATc2 vermutlich nur eine untergeordnete Rolle.

3.4.2. Quantitative RT-PCR zur Bestätigung des Expressionsprofils

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Expressionsprofilanalyse wird stellvertretend das mRNA Level von c-Fos in einem unabhängigen Ansatz, mittels quantitativer RT-PCR, analysiert. In der Auswertung wird die Aktivität von c-Fos in der unbehandelten Kontrolle auf den Wert 100 normiert und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle dargestellt.

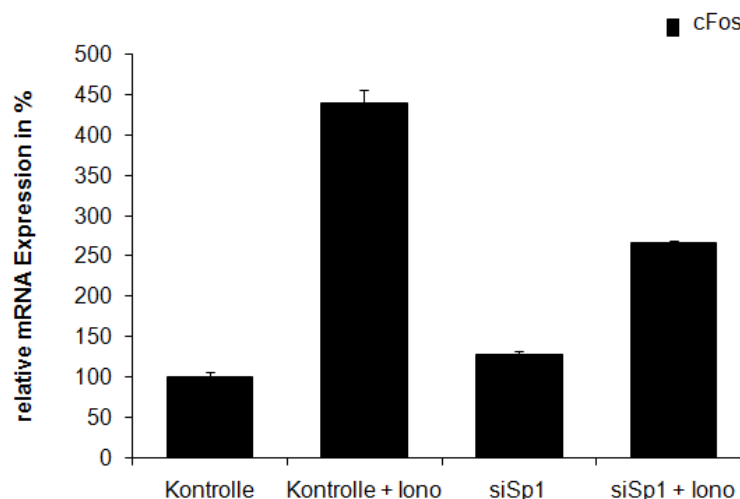


Abbildung 26: Quantitative RT-PCR von 8988t-Zellen gegen c-Fos:
8988t-Zellen werden in vier Gruppen eingeteilt und deren mRNA isoliert.

- 1) unbehandelte Kontrolle,
- 2) Zellen, die zuvor 1 h lang mit Ionomycin behandelt wurden,
- 3) Zellen, bei denen Sp1 durch RNAi reprimiert wurden und
- 4) Zellen, welche mit siRNA für Sp1 und zusätzlich einstündig mit Ionomycin stimuliert wurden.

Anschließend wird die mRNA in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR durchgeführt, worin die relative mRNA Expression von c-Fos ermittelt wird.

In der unbehandelten Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikanter (4,5-facher) Expressionsanstieg von c-Fos unter Ionomycinbehandlung (Bande 2). Mittels Repression von Sp1 durch RNAi, ist eine deutliche Beeinflussung des Ionomycineffektes durch Sp1-Hemmung zu beobachten (Bande 4).

3.4.3. Knockdown der Interaktionspartner NFATc2 und Sp1 mittels RNAi resultiert in einer verminderten Zellproliferation

c-Fos gehört zur bHLH-Zip-Proteinfamilie und wurde erstmals in den 70er Jahren von Finkel und Mitarbeiter publiziert. Ihnen gelang es aus Knochentumoren Retroviren zu isolieren, dessen eigentliches transformierendes Insert als fos-Onkogen bekannt wurde (Finkel et al. 1976). Die zelluläre Äquivalente c-Fos konnte in den nächsten Jahren schließlich in verschiedenen Tumoren beschrieben werden, worin das Protein zur neoplastischen Transformation führt (Milde-Langosch 2005). Transgene Mäuse, die dieses Molekül überexprimieren, entwickeln Osteo- und Chondrosarkome. c-Fos bewirkt dabei eine starke Cyclin D1-Überexpression in Osteoblasten und Chondrozyten, wodurch die vermehrte Cyclin D1-Bildung zu einer unkontrollierten Vermehrung der Zellen führt (Sunters et al. 1998).

Aufgrund diesen Vorkenntnissen werden die Auswirkungen der Interaktion von NFATc2 und Sp1 auf die Zellproliferation mittels Thymidin-Proliferations-Assay quantifiziert. Hierzu werden Pankreaskarzinomzellen mit „Silencer Negative Control“-siRNA oder einer silencer-RNA Sequenz für NFATc2 und/ oder Sp1 transient transfiziert und dessen Proliferationsverhalten durch radioaktiven Thymidineinbau in die Zelle im β -Counter gemessen. In der Auswertung wird die Aktivität der unbehandelten Kontrolle auf den Wert 100 normiert und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle angegeben.

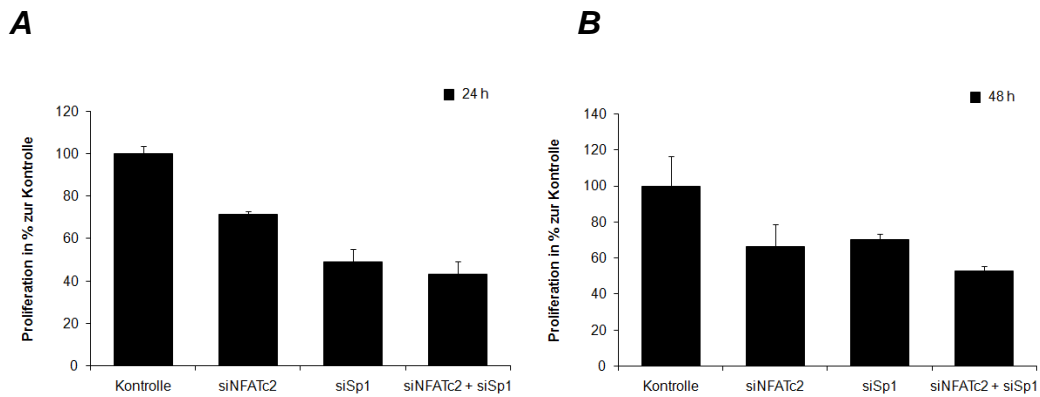


Abbildung 27:

Einfluss von NFATc2 und Sp1 auf die Zellproliferation:

8988t-Zellen werden mit Kontroll-siRNA, siNFATc2 und/ oder siSp1 transient transfiziert und mit Serum für 24 h (Abbildung 27A) oder 48 h (Abbildung 27B) stimuliert. Es erfolgt die Hinzugabe von 0,5 μ Ci/ ml tritiiertem Thymidin auf die Zellen und die Radioaktivitätsmessung im β -Counter.

In Bande 1 ist die basale Proliferationsaktivität der Zelle zu erkennen. Unter Transfektion von siNFATc2 (Bande 2) kann eine Repression der Proliferation auf 71% nach 24 h und sogar auf 67% nach 48 h -im Vergleich zur basalen Expression- beobachtet werden. Ebenfalls ist eine Abnahme des Proliferationsverhaltens durch Transfektion von siSp1 auf 49% (Abbildung 27A) und auf 70% (Abbildung 27B) zu erkennen. Werden nun beide Transkriptionsfaktoren durch siRNA-Knockdown gehemmt (Bande 4), wird nur eine unwesentliche, weitere Minderung des Proliferationsverhaltens der Zelle auf 43% bzw. auf 53% quantifiziert.

4. Diskussion

4.1. NFATc2 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 im Pankreaskarzinom

Bindungspartner sind für die Spezifität von Transkriptionsfaktoren in der Zelle entscheidend.

In zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre wurden die *nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen* (NFATs) nicht nur in T-Zellen, sondern auch in Zellen außerhalb des Immunsystems beobachtet, wo sie in der Induktion der Genübertragung als Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen (Rao et al. 1997). Dabei regulieren und kontrollieren sie viele Gene, die für die Zellproliferation, die Differenzierung, das Überleben und die Apoptose zuständig sind (Viola et al. 2004). Auffallend ist, dass die pluripotenten Effekte alle vom Zelltyp und vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig sind. Von besonderer Bedeutung für die NFAT-vermittelte Genexpression scheinen Partnerproteine zu sein. Es handelt sich um Transkriptionsfaktoren, die mit NFAT-Proteinen kooperieren und so die Selektion und Regulation NFAT-kontrollierter Gene beeinflussen. Über diese Bindungspartner ist in der Literatur bis heute jedoch nur wenig bekannt.

Der wohl bekannteste Bindungspartner von NFAT ist der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein 1) (Chen et al. 1998). AP-1 ist ein Komplex aus Proteinen der c-Jun- und c-Fos-Familie und liegt als Jun/Jun-Homo- oder als Jun/Fos-Heterodimer vor. AP-1-Komplexe binden an spezielle, palindromische DNA-Sequenzen der Form 5'-TGAG/CTCA-3' (Sitlani und Crothers 1996) und induzieren dort die Transkription ihrer Zielgene. Monomeres NFAT und dimeres AP-1 besitzen unabhängig voneinander nur eine geringe Affinität für ihre DNA-Motive. Kommt es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen NFAT und AP-1 im Zellkern, erhöht dies die Stabilität des NFAT-AP-1-DNA-Komplexes. Dieser ist erforderlich, um Promotoren wie IL-2 zu aktivieren (Macian et al. 2001).

Weitere, gut gekennzeichnete Bindungspartner von NFAT in Lymphozyten sind FOXP3, MEF 2A, IRF4 und GATA. Diese Transkriptionsfaktoren

aktivieren bzw. reprimieren gemeinsam mit NFAT wichtige Zielgene, welche für die T-Zellaktivierung nötig sind (Im et al. 2004). Aber auch in anderen Zellsystemen werden bis heute Bindungspartner von NFAT beschrieben. So können beispielsweise die Transkriptionsfaktoren EGR in Neuronen, CREB in der Osteoclastendifferenzierung (Sato et al. 2006), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in Hepatozyten und Sp1 in Keratinozyten (Santini et al. 2001) gekennzeichnet werden.

Welchen Einfluss Partnerproteine von NFATc2 für das onkogene Verhalten von Pankreaskarzinomzellen haben, ist bislang nur unzureichend erforscht. Auf Grund dessen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung von NFATc2-Bindungspartner in Pankreaskarzinomzellen und versucht diese durch verschiedene molekularbiologische Methoden zu verifizieren.

Zunächst wird in Vorarbeiten die Expression von NFATc2 und potentieller Partnerproteine, die bereits in der Literatur in anderen Zellarten und Geweben beschrieben werden, in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien (8988t, 8988s, Suit-007, Suit-028, Imim-PC 1, Imim-PC 2, Panc-1 und AsPC 1) untersucht und bestätigt. Dabei konzentriert sich die Arbeit auf die Calcium-abhängig regulierten und onkogen wirkenden Transkriptionsfaktoren Sp1 und MEF 2A (Kumar und Butler 1999; Youn et al. 1999; Bai et al. 2008; Li et al. 2008). Für die Versuche wird Ionomycin, ein Stimulans, gewählt, um die zuverlässige Translokation von NFATc2 in den Zellkern zu garantieren. Ionomycin bewirkt dabei einen Calciumeinstrom in die Zelle, woraufhin der Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg aktiviert, NFAT dephosphoryliert, kernversetzt und seine DNA-Affinität erhöht wird (Macian et al. 2002). Nachteil dieses Stimulus ist seine Zelltoxizität, die eine Verwendung für Langzeitexperimente ausschließt. Die Wirkungsweise von Ionomycin wird durch die Immunfluoreszenzstudie, sowie durch Western Blot auf Proteinebene, belegt.

In ersten Interaktionsversuchen mittels Immunpräzipitation zeigt sich eine Bindung von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1.

Die Familie der Sp (Specificity protein)-Transkriptionsfaktoren gehört zu den Zinkfingerproteinen und besteht aus zwei Untergruppen: die Sp-artigen

Faktoren Sp1 bis Sp8 und die KLF-artigen Faktoren KLF1 bis KLF16 (Bouwmann und Philipson 2002; Safe und Abdelrahim 2005).

Die Sp-artigen Transkriptionsfaktoren sind von großer Bedeutung für die eukaryotische Transkriptionsmaschinerie. Durch die Regulierung der Expression einer Vielzahl von Genen, beteiligen sie sich an nahezu allen Facetten der zellulären Funktion, einschließlich der Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und der neoplastischen Transformation (Black et al. 2001). Dabei unterscheidet sich jedes Mitglied in seiner Fähigkeit die Transkription zu steuern und als Konsequenz, zelluläre Prozesse zu regulieren (Lomberk und Urrutia 2005). So können sie, abhängig vom Promotor und mit welchem Bindungspartner sie interagieren, entweder aktivierend oder reprimierend wirken. Beispielsweise aktiviert KLF13 die Promotoren des Simian Virus (SV 40) und des γ -Globin, reprimiert aber ebenso andere, wie das Cytochrom P450 CYP1A1 (Kaczynski et al. 2003).

Auch wenn die spezifische, physiologische Funktion der Sp-Proteine noch nicht vollständig erforscht wurde, haben „Knockout“-Studien an Mäusen zeigen können, dass diese Familie der Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung von Geweben und Organen beteiligt ist. Ebenso besteht die Vermutung, dass die Sp-Proteinexpression ein kritischer Faktor in der Tumorentwicklung, dem Tumorwachstum und der Metastasierung sein kann. So beobachteten Kumar und Mitarbeiter 1999 eine vermehrte Expression und Aktivität von Sp1 in epithelialen Karzinomen im Vergleich zu benignen Tumoren (Kumar und Butler 1999). Shi und Mitarbeiter stellten 2001 eine Überexpression von Sp1 in Pankreaskarzinomzellen verglichen mit normalem Gewebe fest (Shi et al. 2001). Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe Sp1 als Mediator der TGF β -vermittelten Tumorprogression im Pankreaskarzinom identifizieren (Jungert et al. 2007).

Immunpräzipitationsversuche ermöglichen die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und können eine erste Aussage über die Interaktion von Partnerproteinen liefern. Sie weisen aber auch einige Nachteile auf. Fälschlicherweise als negativ interpretierte Ergebnisse können z. B. durch mangelhafte Bindung des Antikörpers am Protein entstehen, falsch positive

Ergebnisse durch direkte Bindung von Proteinen an den Beads oder an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes. Ebenso ist es möglich, dass zwei Proteine in der Immunpräzipitation interagieren, diese im Zellzyklus, im Zellorganell oder im Zelltyp aber nicht gleichzeitig auftreten und deshalb nicht tatsächliche Partnerproteine sein können. So geben diese Versuche zwar Auskunft über die mögliche Interaktion zweier Proteine, jedoch keine Information darüber, auf welche Weise diese Bindung stattfindet, sodass positive Ergebnisse stets durch weitere Methoden verifiziert werden müssen. Mittels diesen weiteren Techniken kann gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren im selben Immunkomplex an der NFAT-Targetsequenz GGAAA in direkte Wechselwirkung treten und Sp1 die funktionelle Aktivität von NFATc2 an dem NFAT-responsiven Promotorkonstrukt steigert. Unsere Immunfluoreszenzstudien belegen zunächst, dass NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen unter Ionomycinstimulation in den Zellkern transloziert und mit dem onkogenen Transkriptionsfaktor Sp1 kolokalisiert. Die Ionomycinbehandlung der Pankreaskarzinomzellen scheint darüber hinaus auch die Bindung der beiden Partner zu begünstigen. In Immunpräzipitationsstudien wird unter Stimulation vermehrt der jeweilige Partner präzipitiert. Auffallend sind die unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien von NFATc2. Während aktiviertes, dephosphoryliertes NFATc2 vermehrt Sp1 zu binden vermag, kann im Umkehrschluss bei der Immunpräzipitation von Sp1 aktiviertes sowie auch deaktiviertes, phosphoryliertes NFATc2 kopräzipitiert werden.

Eine mögliche Interpretation wäre, dass die Bindungspartner NFATc2 und Sp1 an der DNA interagieren, komplexieren und gemeinsam Zielgene regulieren. Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) oder die Casein-Kinase 1 (CK1) begrenzen diesen Vorgang zeitlich, indem sie NFAT wieder rephosphorylieren (Neal und Clipstone 2001). Dabei verliert der NFATc2-Sp1-Komplex seine DNA-Affinität.

Ungeklärt ist jedoch, in wie weit Sp1 als Bindungspartner von NFATc2 im Pankreaskarzinom direkt die transkriptionelle und funktionelle Aktivität an der DNA beeinflusst. Für diese Fragestellungen wurden DNA-Pulldown- und Luziferase-Assays durchgeführt. Sie belegen, dass die Stimulation durch Ionomycin mit einer gesteigerten DNA-Bindung von NFATc2 und

koprizipitiertem Sp1 einhergeht und Sp1 zu einer erhöhten Transaktivierung des NFAT-responsiven Promotorkonstruktes führt.

Der onkogene Transkriptionsfaktor Sp1 spielt vermutlich eine entscheidende Rolle in der transkriptionellen und funktionellen Aktivität von NFATc2 im Pankreaskarzinom, wo die Bindungspartner in der Zelle interagieren und ihre karzinogene Wirkung ausüben.

4.2. NFATc2 interagiert am N-Terminus mit Sp1

Grundlage moderner Therapieansätze basieren meistens auf umfassenden Kenntnissen der zugrunde liegenden molekulargenetischen und zellbiologischen Veränderungen einer Tumorerkrankung. Mit dem Therapieziel in weiteren Projekten, die onkogene Interaktion von NFATc2 und Sp1 im Pankreaskarzinom hemmen zu können, ohne die ansonsten physiologische Funktion im Organismus zu stören, ist es wichtig zu klären, über welche Domäne im Sp1-Protein die Interaktion mit NFATc2 vermittelt wird.

Alle Proteine der Sp-artigen Transkriptionsfaktoren weisen ähnliche Strukturdomänen auf: Sie enthalten C-Terminal drei Zinkfinger, DNA-bindende Domänen, eine Kernlokalisationssequenz (NLS) sowie eine transkriptionell-regulatorische Domäne (Kaczynski et al. 2003). Die Zinkfingerdomänen bestehen dabei aus 81 Aminosäuren des Cys₂/ His₂-Typs (Narayan et al. 1997), wobei vier Cysteine oder Histidine als Liganden eines Zinkions agieren, sodass die beteiligten Aminosäureketten durch diese Wechselwirkung zueinander koordiniert werden (Lomberk und Urrutia 2005). N-Terminal enthalten die Untergruppen Sp1-Sp4 aktivierende Domänen aus Glutaminreichen Regionen, deren Serin-Threonin-reiche Domänen vorgeschaltet sind. Diese Serin-Threonin-reichen Abschnitte werden durch Glykosylierung an mehreren Serinen und Threoninen (Jackson und Tijan 1988) und Phosphorylierung an Serinresten (Jackson et al. 1990) posttranslational modifiziert. Diese Abschnitte spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Sp1. Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt durch die Glutamin-reichen Teilabschnitte sowie der D-Domäne (C-Terminal), welche ein Synergismus zur Formung von Multimeren aus zwei an der DNA gebundene Sp1 Molekülen sowie die Protein-Protein Wechselwirkung von Sp1 Molekülen erlaubt (Lee et al. 2005). Sp1 und Sp3 enthalten weiter eine inhibitorische Domäne am N- bzw. C-Terminus (Suske 1999).

Sp1 und seine familienzugehörigen Transkriptionsfaktoren zeichnen sich vor allem durch ihr bipolares Verhalten aus. Die Funktion als Transkriptionsaktivator oder Repressor ist vermutlich vom jeweiligen Promotor, an dem Sp1 bindet oder vom jeweiligen Transkriptionspartner abhängig (Lee et al. 2005).

Dabei ist noch ungeklärt, welche Domäne für diese Eigenschaft verantwortlich ist. In der Literatur wird sowohl eine Interaktion mit Bindungspartnern durch den Zinkfingeranteil sowie über die aktivierenden Domänen N-Terminal von Sp1 beschrieben.

Lee und Mitarbeiter vertreten die Hypothese, dass die Zinkfingerdomäne von Sp1, aufgrund ihrer hoch konservativen Aminosäuresequenz, für die Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen verantwortlich ist und dass diese Proteine in der Interaktion und Funktion als ein positiver und negativer Regulator bei der Kontrolle der DNA-Bindung von Sp1 involviert sind.

In der Strukturanalyse zeigt die DNA-Bindungsdomäne eine größere Homologie bei Sp1, Sp3 und Sp4 als zu Sp2. So ist es nicht erstaunlich, dass Sp1, Sp3 und Sp4 an die klassische Sp1-Bindungsstelle der GC-Box mit gleicher Affinität binden können, währenddessen Sp2, aufgrund eines Aminosäureaustausch von Histidin zu Leucin am ersten Zinkfinger, an ein GT-reiches Element innerhalb des T-Zell-Antigen-Rezeptor anlagert (Suske 1999). Trotz dieser großen Homologie zwischen Sp1, Sp3 und Sp4 wurde im Rahmen der Forschung jedoch belegt, dass Sp1 das größte Aktivierungspotenzial aufweist, während Sp4 eher schwächer aktivierend und Sp3 sogar meistens unterdrückend auf die Transkription wirkt (Kwon et al. 1999). Andererseits werden die reprimierenden Funktionen von Sp1 und Sp3 der inhibierenden Domäne am N-Terminus und nicht der Zinkfingerregion zugeschrieben (Lee et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Interaktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 mit der N-Terminalen Domäne von Sp1 in Pankreaskarzinomzellen aufzuzeigen und dessen funktionelle Relevanz durch Luziferase-Assays darzulegen. Sp1 führt zu einer Aktivitätssteigerung von NFATc2 am NFAT-responsiven Promotor. Eine mögliche Interpretation könnten die aktivierenden Serin-Threonin-reichen und Glutamin-reichen-Domänen von Sp1 sein. Sie führen zu einer transkriptionellen und funktionellen Steigerung von NFATc2 im Pankreaskarzinom.

4.3. Sp1-artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der NFATc2-vermittelten Genregulation beteiligt

Mittels der Expressionsprofilanalyse können einige interessante Zielgene von NFATc2 identifiziert werden. Darunter finden sich das Proto-Onkogen c-Fos und der Tumornekrosefaktor TNF, die an der Apoptose beteiligten Moleküle APAF1, ATM, BCL2, BRCA1, TNFRSF25, die Adhäsionsmoleküle Integrin- α -2 und Integrin- β -3, das Metastasen Suppressorgen MTSS1 sowie die Phosphoinositide-3-Kinase.

Der Tumornekrosefaktor TNF-alpha nimmt eine zentrale Stellung unter den Zytokinen ein. TNF-alpha ist ein pleiotropes Zytokin mit einem breitem Spektrum an vorwiegend proinflammatorischen Wirkungen auf normale und transformierte Zellen. Einen Antitumoreffekt wurde bei Karzinomkranken im Zusammenhang mit dem Ausbruch von Infektionskrankheiten, die zur Remissionen führten, beobachtet. Darüber hinaus scheint jedoch eine deregulierte TNF-alpha-Expression in der Tumormikroumgebung die Invasion, Migration und letztlich die Metastasenbildung in malignen Zellen zu begünstigen (Mocellin und Nitti 2008). So führt die Behandlung von dukalen Adenokarzinomen mit TNF-alpha in tierexperimentellen Studien zu einer erheblichen Verstärkung des Tumorwachstums und der Metastasierung. Ebenfalls mündet die Behandlung mit Infliximab und Etanercept in einer über 30%igen Reduktion des Tumorwachstums und einer Halbierung von Lebermetastasen (Egberts et al. 2008). In der Literatur wird bereits eine NFAT-abhängige TNF-alpha Expression in Lymphozyten beschrieben (Kaminuma et al. 2008). Die vorliegende Arbeit kann diese Regulation ebenfalls in Pankreaskarzinomzellen aufzeigen. Dabei ist auffallend, dass durch Sp1-Hemmung ein abgeschwächter Ionomycineffekt zu beobachten ist, sodass wohl die DNA-Bindungsaktivität von Sp1-artigen Transkriptionsfaktoren für die NFATc2 vermittelte Regulation von Bedeutung sein muss. Diese Sp1-Abhängigkeit kann ebenfalls bei c-Fos beobachtet werden.

In vorherigen Studien wird eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression von c-Fos in der Mehrzahl der Pankreaskarzinome festgestellt (Wakita et al. 1992; Lee und Charalambous 1994). Aber auch in anderen Tumoren wird eine Induktion beschrieben, wo c-Fos zur neoplastischen Transformation führt (Milde-Langosch 2005). Saez und Mitarbeiter zeigen z. B., dass c-Fos für die maligne Progression von Hauttumoren notwendig ist (Saez et al. 1995). Immunhistochemische Untersuchungen und in-situ-Hybridisierungsstudien belegen eine c-Fos Überexpression in Ösophaguskarzinomgewebeproben, wo dieser Transkriptionsfaktor in 66% der Dysplasien und in 53% der Plattenepithelkarzinome nachgewiesen wurde. Im direkten Vergleich kann nur in weniger als 5% des normalen Ösophaguszellgewebes c-Fos nachgewiesen werden (Wu et al. 2004).

Im Gegensatz zu c-Fos und TNF-alpha, welche einen addierenden Effekt von Ionomycin und Sp1 zeigen, kann bei ITGB3 ein antagonisierendes Ergebnis in der mRNA Expression beobachtet werden.

Das Adhäsionsmolekül ITGB3 wird durch NFATc2 unter Ionomycinbehandlung supprimiert. Integrine sind transmembranöse, heterodimere Glykoproteine, bestehend aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit, welche an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix binden und eine bidirektionale Signaltransduktion vermitteln. Man unterscheidet 18 verschiedene alpha- und acht verschiedene beta- Untereinheiten, deren Gesamtsumme 25 Integrine bilden (Langsenlehner et al. 2006). Integrine treten typischerweise nur zeitlich begrenzt auf der Zellmembranoberfläche auf. Das Vorhandensein oder Fehlen kann die Fähigkeit maligner Tumore, unkontrolliert zu wachsen, lokal zu invadieren und zu destruieren oder zu metastasieren in ganz entscheidendem Ausmaße beeinflussen (Oberholzer 2001). Die NFAT-abhängige Regulation von Integrinen wurde bereits von Jauliac und Mitarbeiter 2002 beschrieben (Jauliac et al. 2002). Aufgrund des mehrfach in der Literatur dargelegten, bipolaren Verhaltens von Sp1 ist denkbar, dass NFATc2 und Sp1 gemeinsam die Expression von ITGB3 regulieren. Dabei agiert Sp1 als transkriptioneller Repressor von NFATc2 an der jeweiligen GC-Box des Promotors.

Zusammenfassend belegen die Daten der Expressionsprofilanalyse, sowie die Untersuchungen durch qRT-PCR eine Sp1-abhängige Regulation der Promotoren von c-Fos, TNF-alpha und ITGB3. Welchen Effekt diese Regulation für die Pankreaskarzinomzelle hat, wird in der vorliegenden Arbeit anhand Thymidin-Proliferations-Assays erforscht. Dabei wird die endogene Expression von NFATc2 und/ oder Sp1 durch RNAi-Technologie gehemmt und der Thymidineinbau in der Zelle analysiert. Die alleinige Repression der Transkriptionsfaktoren lässt eine jeweilige Minderung um circa 40-50% feststellen, die durch die gemeinsame Hemmung nur unwesentlich gemindert werden kann. Eine mögliche Interpretation wäre, dass die Bindungspartner NFATc2 und Sp1 interagieren und gemeinsam zellwachstumsabhängige Zielgene regulieren. Der Verlust bereits eines Transkriptionsfaktors verhindert die onkogene Komplexbildung und die Expression möglicher Zellzyklus-regulierender Gene.

4.4. Ausblick

Die Steuerung des Promotors ist komplex.

Beteiligt sind viele Proteine, die als Transkriptionsfaktoren und/ oder Ko-faktoren wirken können. Die Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen in diesem „Netzwerk“ ist wahrscheinlich von großer Bedeutung für die Regulation von Zielgenen. Neben den Transkriptionsfaktoren NFATc2 und Sp1 gibt es viele weitere, zum Teil noch unbekannte Proteine, die zusammen die „Transkriptionsmaschinerie“ bilden, die Aktivität von Promotoren bedarfsabhängig regulieren und die Zellfunktion steuern. Dabei scheint NFATc2 ein zentrales Modul in der Progression des Pankreaskarzinoms darzustellen. Seine Eigenschaften als Transkriptionsfaktor werden maßgeblich durch die Auswahl DNA-bindender Partnerproteine beeinflusst. Die Identifikation und Charakterisierung zentraler Partnerproteine in der Karzinogenese des Pankreas wird helfen neue Therapieoptionen in der Behandlung dieses aggressiven Tumors zu etablieren.

5. Zusammenfassung

5.1. Inhaltsangabe

Die *nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen* (NFATs) wurden vor allem in der Regulierung der Immunantwort charakterisiert, wo sie in der Induktion der Genübertragung als Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen (Rao et al. 1997). In den letzten Jahren wurden NFAT-Proteine nicht nur in T-Zellen, sondern auch in anderen Zellen außerhalb des Immunsystems beobachtet, wo sie die Expression zentraler Gene der Differenzierung und des Wachstums kontrollieren (Viola et al. 2004). So werden sie u.a. auch in Pankreaskarzinomzellen (Buchholz et al. 2006) exprimiert. NFAT-Proteine sind primär zytoplasmatisch lokalisiert und translozieren erst nach Aktivierung in den Zellkern. Dort interagieren sie mit anderen Bindungspartnern an der DNA (Hogan et al. 2003). Es handelt sich hierbei um Transkriptionsfaktoren, die mit NFAT-Proteinen kooperieren und so die Selektion und Regulierung NFAT-kontrollierter Gene beeinflussen. Die vorliegende Arbeit fokussiert auf NFATc2, welches zwar eine hohe Expressionsintensität im Pankreaskarzinom aufweist, dessen Funktion und DNA-regulierenden Eigenschaften hier jedoch unbekannt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen zu identifizieren und zu kennzeichnen.

Zunächst wird in Vorarbeiten die Expression von NFATc2 und potentieller Partnerproteine, die bereits in der Literatur in anderen Zellarten und Geweben beschrieben werden und zusätzlich die Kriterien einer Calcium-abhängigen Regulierung und einer nachgewiesenen onkogenen Wirkung im Organismus erfüllen, in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien untersucht und bestätigt. Ebenso wird Ionomycin, ein Stimulans, gewählt, um eine zuverlässige Translokation von NFATc2 in den Zellkern durch Aktivierung des Calcium-Calcineurin-Signalwegs zu garantieren. Nachteil dieses Stimulus ist seine Zelltoxizität, die eine Verwendung für Langzeitexperimente ausschließt. Die Wirkungsweise von Ionomycin wird durch die Immunfluoreszenzstudie, sowie auf Proteinebene durch Western Blot dargelegt.

In ersten Interaktionsversuchen mittels Immunpräzipitation zeigt sich eine Bindung von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1. Zur Verifizierung und

Charakterisierung der hier beschriebenen Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 bezüglich des Zeitintervalls werden weitere Methoden angewandt. In der Immunfluoreszenzstudie ist eine Kolokalisation der onkogenen Transkriptionsfaktoren Sp1 und NFATc2 in Pankreaskarzinomzellen unter Ionomycinstimulation zu erkennen. Weiterführend wird gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren im selben Immunkomplex an der NFAT-Targetsequenz GGAAA in direkte Wechselwirkung treten und Sp1 die funktionelle Aktivität seines Bindungspartners an dem NFAT-responsiven Promotorkonstrukt steigert. Diese Interaktion wird durch Ionomycin in der frühen Phase der Stimulation (bis 60 min) begünstigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die physikalische Interaktion von NFATc2 und Sp1 anhand von Sp1-Deletionsmutanten näher charakterisiert. Dabei kann sowohl auf physikalischer Ebene, mittels Immunpräzipitation, als auch auf funktionaler Ebene mittels Luziferase-Assay gezeigt werden, dass der N-Terminus von Sp1 mit dem Transkriptionsfaktor NFATc2 interagiert und beide Faktoren gemeinsam die Funktion ihrer Zielgene regulieren.

Mittels Expressionsprofilanalyse werden im dritten Teil dieser Arbeit einige interessante Zielgene von NFATc2 und Sp1, die nach Ionomycinbehandlung differentiell exprimiert werden, identifiziert. Darunter finden sich das Protoonkogen c-Fos, der Tumornekrosefaktor TNF-alpha sowie das Adhäsionsmolekül Integrin-β-3. Wird Sp1 durch siRNA-Technologie gehemmt, findet sich bei c-Fos und TNF-alpha ein abgeschwächter Ionomycineffekt, sodass die DNA-Bindungsaktivität von Sp1-artigen Transkriptionsfaktoren für die NFATc2-vermittelte Regulation dieser Gene von Bedeutung sein muss. Diese Beobachtung wird in unabhängigen Untersuchungen stellvertretend für c-Fos durch qRT-PCR und dessen funktionelle Bedeutung für die Pankreaskarzinomzelle mittels Thymidin-Proliferations-Assay dargelegt. Als Ergebnis kann eine verminderte Zellproliferation, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h bei Knockdown von beiden Transkriptionsfaktoren, beobachtet werden.

Schlussfolgernd besteht die Vermutung, dass die Bindungspartner NFATc2 und Sp1 im Pankreaskarzinom interagieren und gemeinsam Zielgene, die für das Zellwachstum verantwortlich sind, regulieren. Der Verlust bereits eines Transkriptionsfaktors verhindert die onkogene Komplexbildung und die Expression möglicher zellzyklusregulierender Gene.

5.2. Summary

The *nuclear factors of activated T-cells* (NFATs) were mainly characterized by the regulation of the immune response, in which they play an essential role as transcription factors (Rao et al. 1997). In recent years it has been reported that expression of NFAT-protein is not only restricted to T-cells, but can also be found in a number of cells outside the immune system, in which they control the expression of genes that regulate differentiation and growth (Viola et al. 2004). Pancreatic cells are shown to express NFAT (Buchholz et al. 2006). NFAT-proteins are primarily located in the cytoplasm and only translocate to the nucleus after activation. There in place they interact with other binding partners on the DNA (Hogan et al. 2003). Those binding partners are transcription factors that co-operate with NFAT to influence the selection and regulation of NFAT-controlled genes. This study focuses on NFATc2, which is highly expressed in pancreatic carcinomas. However, its abilities to regulate DNA remains elusive and is not investigated in detail.

The aim of this study is to identify possible binding partners of NFATc2 in pancreatic carcinoma cells.

In the first part of this study the expression of NFAT and its potential binding partners is analyzed in a number of established pancreatic carcinoma cell-lines. To find potential binding partners of NFATc2, a literature search is performed for transcription factors that have already been shown to interact with NFATc2 in other cell types and tissues. In addition they have to be calcium-regulated and known for their oncogenic potential. Ionomycin, is a stimulant that guarantees the translocation of NFATc2 into the nucleus by activating the calcium-calcineurin-signaling pathway. However, Ionomycin exerts cytotoxic effects are making long term stimulations impossible. The process describe above is proven by using immunofluorescence studies as well as western blot analysis.

In the following experiments, using immunoprecipitation, a binding of NFATc2 with the transcription factor Sp1 is observed. To verify and characterize this interaction additional experiments are performed. Using immunofluorescence labeling a colocalization of the oncogenic transcriptions factors Sp1 and NFATc2 can be seen in pancreatic carcinoma cell-lines in the presents of

Ionomycin. In additional studies it is shown that they interact in the same complex at the NFAT-target sequence GGAAA. Sp1 increases the activity of its binding partner at the NFAT-responsive promoter construct. This interaction intensifies with the presence of Ionomycin in the early phase of stimulation (< 60 min).

In the second part of this study the physical interaction of NFATc2 and Sp1 is characterized in more detail using mutants with Sp1-deletions. Here, it is shown on multiple levels using immunoprecipitation and luciferase-assays that the N-terminus of Sp1 interacts with NFATc2 to control the function of their target genes.

Thru gene expression analysis some really interesting target genes of NFATc2 and Sp1, which are expressed thru Ionomycin treatment, are identified in the third part of the study. Among them, the proto-oncogene c-fos, tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and the adhesion molecule integrin- β -3 are found. The knock-down of Sp1 using siRNA, decreases the effects of Ionomycin on c-fos and TNF-alpha, indicating that the DNA-binding activity of Sp1 has relevancy in promoting the NFATc2 regulation of these genes. This observation and its relevance for pancreatic cancer is confirmed in independent experiments for c-fos using qRT-PCR and thymidine-proliferation-assay. A decreased cell proliferation is observed after 24 and 48 hours following knock-down of both transcription factors.

In summary it can be presumed that NFATc2 and Sp1 interact in pancreatic carcinoma cells and form a complex that regulates target genes that control cell proliferation. The loss of either one of the two transcription factors inhibits the formation of this complex and its downstream regulation of cell cycle regulating genes.

6. Literaturverzeichnis

1. Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillón J, Morancho B, Santiago V, Lopez-Rodriguez C (2006). Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochemical pharmacology* 72: 1597-1604
2. Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, Li D, Xie H, Yin S, Yu J, Lin Q, Zheng S (2008). Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 134: 83-91
3. Bell B and Tora L (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Experimental cell research* 246: 11-19
4. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nature reviews, Molecular cell biology* 1: 11-21
5. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J (2001). Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *Journal of Cellular Physiology* 188: 143-160
6. Böcker W, Aguzzi A, Denk H, Heitz PU (2004). *Pathologie*.
7. Böhmig M and Rosewicz S (2004). Pankreaskarzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 42: 261-268
8. Bouwman P and Philipson E (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 195: 27-38

9. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/ calcineurin signaling pathway. *EMBO Journal* 25: 3714-3724
10. Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998). Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392: 42-48
11. Crabtree GR and Olson EN (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109: 67-79
12. Dantonel JC, Quintin S, Lakatos L, Labouesse M, Tora L (2000). TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Molecular Cell* 6: 715-722
13. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H, Trauzold A (2008). Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Clinical Cancer Research* 5: 1443-50
14. Ellenrieder V (2008). Unveröffentliche Befunde
15. Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A (2003). Ca²⁺/ calcineurin signaling in cells of the immune system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311: 1117-1132
16. Finkel MP, Reilly CA, Biskis BO (1976). Pathogenesis of radiation and virus-induced bone tumors. *Recent Results Cancer Research* 54: 92-103
17. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR (1996). The Mechanism of Action of Cyclosporin A and FK506. *Clinical Immunology and Immunopathology* 80: 40-45

18. Hochheimer A and Tjian R (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes & Development* 17: 1309-1320
19. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes & Development* 17: 2205-2232
20. Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Dohner H, Lichter P, Gress TM, Bentz M (2004). Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Research* 64: 4428-4433
21. Horsley V and Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The journal of cell biology* 156 (5): 771-774
22. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000). Progressionmodel for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 6: 2969-2972
23. Im S and Rao A (2004). Activation and Deactivation of gene expression by Ca/ Calcineurin-NFAT-mediates Signaling. *Molecules and Cells* 18 (1): 1-9
24. Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S, Tjian R (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63: 155-165
25. Jackson SP and Tjian R (1988). O-Glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55:125-133

26. Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *Journal of Biological Chemistry* 270: 4138-4145
27. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology* 4: 540-544
28. Jungert K, Buck A, von Wichert G, Adler G, König A, Buchholz M, Gress TM, Ellenrieder V (2007). Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 67: 1563-1570.
29. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology* 4: 1-8
30. Kaminuma O, Kitamura F, Kitamura N, Hiroi T, Miyoshi H, Miyawaki A, Miyatake S (2008). Differential contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF-alpha gene expression in T cells. *The Journal of Immunology* 1: 319-326
31. Kiani A, Rao A, Aramburu J (2000). Manipulation immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12: 359-372
32. Kumar AP and Butler AP (1999). Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. *Cancer Letters* 137: 159-165
33. Kwon HS, Kim MS, Edenberg HJ, Hur MW (1999). Sp3 and Sp4 can repress transcription by competing with Sp1 for the core cis-elements on the human ADH5/FDH minimal promoter. *Journal of Biological Chemistry* 274: 20-28

34. Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Eder T, Wascher TC, Paulweber B, Clar H, Hofmann G, Samonigg H, Krippel P (2006). Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment* 97: 67-72
35. Lee CS and Charalambous D (1994). Immunohistochemical localization of the c-fos oncoprotein in pancreatic cancers. *Zentralblatt für Pathologie* 140: 271-275
36. Lee JA, Suh DC, Kang JE, Kim MH, Park H, Lee MN, Kim JM, Jeon BN, Roh HE, Yu MY, Choi KY, Kim KY, Hur MW (2005). Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK. *Journal of Biological Chemistry* 280: 28061-28071
37. Lee M and Park J (2006). Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Molecules and Cells*. 22: 1-7
38. Li B, Wang X, Zhou F, Saunders NA, Frazer IH, Zhao KN (2008). Up-regulated expression of Sp1 protein coincident with a viral protein in human and mouse differentiating keratinocytes may act as a cell differentiation marker. *Differentiation* 76: 1068-1080
39. Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A (1996b). Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 10884-10891
40. Lomberk G and Urrutia R (2005). The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochemical Journal* 392: 1-11

41. Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A (2001). Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15: 47-58
42. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2004). *Der Experimentator: Immunologie*
43. Macian F, Garcia-Cozar S, Im H, Horton HF, Byrne MC, Rao A (2002). Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance. *Cell* 109: 719-731
44. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476-2489
45. Narayan VA, Kriwacki RW, Caradonna JP (1997). Structure of zinc fingers domains from transcription factor Sp1. Insights into sequence-specific protein-DNA recognition. *Journal of Biological Chemistry* 272: 7801-7809
46. Milde-Langosch K (2005). The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European journal of cancer* 41: 2449-2461
47. Ming Chu T (1997). Molecular diagnosis of pancreas carcinoma. *Journal of clinical laboratory analysis* 11: 225-231
48. Mocellin S and Nitti D (2008). TNF and cancer: the two sides of the coin. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 13: 2774-2783
49. Mühlhardt C (2004). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*
50. Neal JW and Clipstone NA (2001). Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *Journal of Biological Chemistry* 276: 3666-3673.

51. Oberholzer MJ (2001). Pathologie verstehen, Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie 55-64
52. Rao A, Luo C, Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annual Review of Immunology 15: 707-747
53. Rehm H (2002). Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics
54. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, Spiegelman BM (1995). c-Fos is required for malignant progression of skin tumours. Cell 82: 721-732
55. Safe S and Abdelrahim M (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. European Journal of Cancer 41 (16): 2438-2448
56. Sagoo JK, Fruman, DA, Wesselborg S, Walsh CT, Bierer BE (1996). Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. Biochemical Journal 320: 879-884
57. Sakorafas GH, Tsiotou, AG, Tsiotou, GG (2000). Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. Cancer treatment reviews 26: 29-52
58. Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L and Dotto GP (2001). Cross talk among calcineurin, Sp1/ Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Science USA 98: 9575-9580

59. Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H (2006). Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nature medicine* 12: 1410-1416
60. Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U (2002). C-Myc activation in primary und metastatic ducal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms and clinical significance. *Modern pathology* 4: 462-469
61. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Avots A, Chuvpilo S, Klein-Hessling S, Kumar JM, Kondo E, Pagel P, Schulze-Luehrmann J, Palmetshofer A (2004). NFAT and NF-kB factors- the distant relatives. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 1166-1170
62. Seyffert E (2003). *Lehrbuch der Genetik*
63. Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC, Xie K (2001). Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 61: 4143-4154
64. Sitlani A and Crothers DM (1996). Fos and Jun do not bend the AP-1 recognition site. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 8: 3248-3252.
65. Sunters A, McCluskey J, Grigoriadis AE (1998). Control of cell cycle gene expression in bone development and during c-Fos-induced osteosarcoma formation. *Developmental genetics* 22: 386-397
66. Suske G (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238: 291-300

67. Tokoyoda K, Yoshihiro T, Toshinori N, Takao A, Kubo M (2000). Synergism between the Calmodulin-binding and autoinhibitory domains on Calcineurin is essential for the induction of their phosphatase activity. *The Journal of biological chemistry* 275: 11728-11734
68. Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK (2004). NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 335-344
69. Wakita K, Ohyanagi H, Yamamoto K, Tokuhisa T, Saitoh Y (1992). Overexpression of c-Ki-ras and c-fos in human pancreatic carcinomas. *International journal of pancreatology* 11: 43-47
70. Wang L, Wei D, Huang S, Peng Z, Le X, Wu TT, Yao J, Ajani J, Xie K (2003). Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clinical Cancer Research* 9: 6371-6380
71. Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR (2004). Expression of Egr-1, c-Fos, and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: an immunohistochemical and in situ hybridisation study. *World Journal of Gastroenterology* 10: 476–480
72. Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO (1999). Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 286: 790-793

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms
- Abbildung 2: Schematische und strukturelle Darstellung der NFAT- und NFκB-Proteinfamilie
- Abbildung 3: Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg
- Abbildung 4: Export von NFAT aus dem Zellkern

Material und Methoden

- Abbildung 5: Chemische Reaktion von Luziferin zu Oxyluziferin
- Abbildung 6: Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid

Ergebnisse

- Abbildung 7: Endogener Nachweis von NFATc2 in Pankreaskarzinomzelllinien
- Abbildung 8: Immunfluoreszenzmikroskopie: NFATc2 transloziert nach Zugabe von Ionomycin in den Nukleus
- Abbildung 9: Western Blot: NFATc2 transloziert nach Zugabe von Ionomycin in den Nukleus
- Abbildung 10: Endogener Nachweis potentieller NFATc2-Partnerproteine
- Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus
- Abbildung 12: Physikalische Interaktion von NFATc2 mit seinen potentiellen Partnerproteinen
- Abbildung 13: Kollokalisierung von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1
- Abbildung 14: Physikalische Interaktion von NFATc2 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1
- Abbildung 15: Physikalische Interaktion von Sp1 mit dem Transkriptionsfaktor NFATc2
- Abbildung 16: Schematische Darstellung des DNA-Pulldown-Versuchs
- Abbildung 17: Physikalische Interaktion an der NFAT-Targetsequenz

- Abbildung 18: DNA-Pulldown-Assay
- Abbildung 19: Direkte Interaktion von NFATc2 und Sp1 im GST-Pulldown-Assay
- Abbildung 20: Schematische Darstellung des dualen Luziferase-Assays
- Abbildung 21: Dualer Luziferase-Assay
- Abbildung 22: Schematische Darstellung der eingesetzten Sp1-Deletionsmutanten
- Abbildung 23: NFATc2 interagiert mit dem N-Terminus von Sp1
- Abbildung 24: Funktionelle Interaktion zwischen NFATc2 und Sp1 im dualen Luziferase-Assay
- Abbildung 25: Expressionsprofilanalyse in Abhängigkeit der Ionomycinbehandlung
- Abbildung 26: Quantitative RT-PCR von 8988t-Zellen gegen c-Fos
- Abbildung 27: Einfluss von NFATc2 und Sp1 auf die Zellproliferation

7.2. **Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AP	aktivierende Domäne
APAF1	Apoptose-auslösender Faktor 1
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia telangiectasia
BCL2	B-cell lymphoma 2
bHLH	basische Helix-Loop-Helix-Domäne
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
C/EBP	CCAAT/ enhancer binding protein
c-Fos	zelluläres Onkogen Fos
CK 1	Casein Kinase 1
CN	Calcineurin
CN-A	Calcineurin A-Untereinheit
CN-B	Calcineurin B-Untereinheit
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAK	Calcium freigebende, aktivierende Calcium-Poren
CREB	cAMP response element binding protein
Crm 1	Chromosome region maintenance 1
Cys ₂ / His ₂ -Typ	2-Cystein-2-Histidin-Typ
DAG	Diaacylglycerol
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium

DNA	Desoxiribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
DPC 4	Deleted in Pancreatic Carcinoma Locus 4
DTT	Dithiothreitol
ECL-Lösung	Luminol, p-Coumarsäure, Tris-HCl
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGR	Early growth response gene
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Fa.	Firma
for	vorwärts
FCS	Fötale Rinderserum
FK 506	Tacrolimus
FLAG	FLAG-Tag
FOXP3	Forkhead Protein 3
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
GRR	Glycin-reiche Region
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF	generelle Transkriptionsfaktoren
h	Stunde
H ₂ O	Wasserstoffdioxid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IL 2	Interleukin 2
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG-Lösung	Isoprophyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRF4	Interferon regulatory factor 4
ITGA ₂	Integrin alpha 2
ITGB ₃	Integrin beta 3
KCl	Kaliumchlorid
kDa	KiloDalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

KLF	Kruppel-like Transkriptionsfaktoren
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Luc	Luziferase
LZ	Leucin-Zipper-Domäne
M	Mol
mA	Milliampere
MEF 2A	Mausembriofibroblasten 2A
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTSS1	Metastasen Suppressorgen
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetranatriumdiphosphat
NES	nukleäres Exportsignal
NFAT	Nukleäre Faktoren aktivierter T-Zellen
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NHR	NFAT-Homologie-Region
NLS	Kernlokalisationssequenz
OD ₆₆₀	optische Dichte von 660
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PanIN	Pankreatisch-intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIK3RI	Phosphoinositide-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PxIxIT	Calcineurin-aktivierendes Gebiet
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
rev	revers

RISC	RNA-inducing-silencing-Complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNAi	RNA Interferenz
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RSD	Rel-similary-Domäne
RTF	regulatorische Transkriptionsfaktoren
RT-PCR	Real-time PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SMAD 4	Signaling mother against decapentaplegic peptide
Sp 1	Specificity protein 1
Sp1-CT	Sp1 Carboxyl-Terminus
Sp1 f.l.	Sp1 full length
Sp1-NT	Sp1 Amino-Terminus
SP	Serin-Prolin-Phosphorylierungsmotive
SRR	serinreichen Regionen
SV 40	Simian vacuolating virus 40
TAD	Transkription-aktivierenden-Domänen
TAF	TBP-assoziierte Faktoren
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBST	Tris-buffered Saline Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGF alpha	Transforming growth factor alpha
TGF beta	Transforming growth factor beta
T-Lymphozyten	Thymus-abhängige Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF25	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie, Mitglied 25
TonEBP	tonicity-responsive enhancer-binding protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton X 100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxyetylenorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
V	Volt

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle	1:	Verwendete Zelllinien
Tabelle	2:	Promotorkonstrukte
Tabelle	3:	Effektorplasmide
Tabelle	4:	Eingesetzte siRNA-Konstrukte

7.4. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Manuela Malsy
Anschrift : Im alten Rod 4
65527 Niedernhausen
Geburtsdatum : 11. Juli 1983
Geburtsort : Hofheim am Taunus
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : ledig

Schulbildung

21.08.1990 – 15.07.1994 : Grundschule der Theitalschule
Niedernhausen
26.08.1994 – 17.07.1996 : Förderstufe der Theitalschule
Niedernhausen
03.09.1996 – 27.06.2003 : Pestalozzigymnasium Idstein
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

20.10.2003 – 26.11.2009 : Medizinstudium an der
Philipps-Universität Marburg
30.08.2005 : Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
26.11.2009 : Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion

13.11.2006 – 08.06.2008 : Promotionsarbeit am medizinischem
Zentrum für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie,
Endokrinologie und Stoffwechsel der
Philipps-Universität Marburg

Famulaturen

- 06.03.2006 – 06.04.2006 : Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie
St. Josefs-Hospital Wiesbaden
- 14.08.2006 – 14.09.2006 : Notfallambulanz
Flughafenklinik Frankfurt am Main
- 06.08.2007 – 06.09.2007 : Abteilung für Anästhesie, Intensivmedizin
und perioperative Medizin,
Kardinal-Schwarzenberg`sches
Krankenhaus Schwarzach, Österreich
- 18.02.2008 – 18.03.2008 : Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
des Kindes- und Jugendalters Lahnhöhe
Zentrum für Soziale Psychiatrie Mittlere
Lahn, Marburg

Praktisches Jahr

- 18.08.2008 – 07.12.2008 : Allgemein-, Visceral- und Unfallchirurgie
Asklepios Stadtklinik Bad Wildungen
- 08.12.2008 – 29.03.2009 : Anästhesie und operative Intensivmedizin
Asklepios Stadtklinik Bad Wildungen
- 30.03.2009 – 19.07.2009 : Innere Medizin
Universitätsklinikum Marburg

7.5. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren:

Dr. Adolph, Prof. Dr. Aigner, PD Dr. Albert, Dr. Al Kadah, Dr. Alpmann, PD Dr. Alter, Prof. Dr. Aumüller, Dr. Bahr, Prof. Dr. Dr. Bals, Dr. Barth, Prof. Dr. Barth, PD Dr. Bartsch, Prof. Dr. Dr. Basler, PD Dr. Bastians, Prof. Dr. Bauer, Dr. Bauer, Prof. Dr. Baum, Dr. Baumann, Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Behr, PD Dr. Benes, Prof. Dr. Berger, Prof. Dr. Besedovsky, PD Dr. Bette, Prof. Dr. Bien, Dr. Bock, PD Dr. Boeckhoff, Dr. Bolm, PD Dr. Braun, Prof. Dr. Brehm, Dr. Breit, Dr. Büch, PD Dr. Buchholz, Dr. Burbelko, PD Dr. Burchert, Dr. Busch, Prof. Dr. Cetin, Prof. Dr. Christiansen, Dr. Chubanov, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Del Rey, PD Dr. Dietrich, Dr. Dinges, PD Dr. Dominguez, Prof. Dr. Donner-Banzhoff, Dr. Duda, Dr. Ebel, Prof. Dr. Eberhart, Prof. Dr. Eilers, PD Dr. Ellenrieder, Prof. Dr. Elsässer, Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic, PD Dr. Feiber, PD Dr. Fritz, Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann, Dr. Funck, Prof. Dr. Garten, Dr. Geks, Prof. Dr. Gerdes, Prof. Dr. Görg, PD Dr. Graf, Prof. Dr. Gress, Prof. Dr. Grimm, PD Dr. Groß, Dr. Grundmann, Prof. Dr. Grzeschik, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Hadij, Prof. Dr. Hamer, Prof. Dr. Hasilik, PD Dr. Hassan, Dr. Hegele, Dr. Hellmeyer, Prof. Dr. Hellwig, Dr. Helwig-Rolig, Prof. Dr. Hermann-Lingen, Prof. Dr. Hertl, PD Dr. Herzum, PD Dr. Höffken, Dr. Hörle, Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Hofmann, PD Dr. Hofstaetter, Prof. Dr. Hoyer, Dr. Iwinska-Zelder, Dipl. Jacke, Dr. Jackowski-Dohrmann, Prof. Dr. Jacob, PD Dr. Jaques, Dr. Kalder, PD Dr. Kalinowski, Prof. Dr. Kann, Dr. Kanngiesser, Dr. Käuser, Dr. Kerwat, Dr. Kill, Dr. Kim-Berger, Prof. Dr. Klaus, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Kingmüller, Prof. Dr. Koch, Prof. Dr. Klose, PD Dr. Köhler, Prof. Dr. Köhler, Prof. Dr. König, Dr. Köster, Prof. Dr. Koolmann, PD Dr. Krebber, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroh, Prof. Dr. Kroll, PD Dr. Krones, PD Dr. Kühnert, Prof. Dr. Kuhlmann, Dr. Kwee, Prof. Dr. Langer, Dr. Lemke, PD Dr. Leonhardt, Dr. Likoyiannis, Prof. Dr. Lill, Prof. Dr. Liß, Prof. Dr. Löffler, Prof. Dr. Loff, Prof. Dr. Lohoff, PD Dr. Lüers, Dr. Lukasewitz, Prof. Dr. Maier, Dr. Maier, Prof. Dr. Maisch, PD Dr. Maisner, Dr. Malek, Dr. Dr. Mandrek, Dr. Mann, PD Dr. Martin, Dr. Martinovic, Dr. Mederos Y Schnitzler, PD Dr. Mennel, Dr. Merte, PD Dr. Michl, PD Dr. Mittag, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof.

Dr. Dr. Mueller, PD Dr. Müller, Prof. Dr. Müller, PD Dr. Mühlberger, Prof. Dr. Mutters, Dr. Nachtigall, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Oertel, Dr. Olbert, Prof. Dr. Pagenstecher, Dr. Pfützner, Prof. Dr. Pieper, Prof. Dr. Plant, Dr. Pressel, PD Dr. Printz, PD Dr. Quante, Dr. Ramaswamy, Dr. Rausch, Dr. Reichel, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Dr. Riera-Knorrenschild, Dr. Rohlfs, Prof. Dr. Röhm, Dr. Rolfes, PD Dr. Rominger, Prof. Dr. Röper, Prof. Dr. Rose, Prof. Dr. Rosenow, Prof. Dr. Rothmund, Dr. Rybinski, Dr. Sattler, Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Schmidt, PD Dr. Schmitt, Dr. Schmitz, Prof. Dr. Schnabel, Prof. Dr. Schneider, Dr. Schierl, Dr. Schofer, PD Dr. Schrader, Dr. Schulze, Prof. Dr. Schultz, Prof. Dr. Seitz, PD Dr. Sesterhenn, Dr. Shiratori, Dr. Skrzypek, Dr. Skwara, Dr. Steinkamp, Prof. Dr. Steiniger, PD Dr. Stiletto, Dr. Stiller, PD Dr. Straßmann, Prof. Dr. Stempel, Prof. Dr. Sure, Prof. Dr. Suske, PD Dr. Tebbe, PD Dr. Teymoortash, PD Dr. Torossian, Dr. Varga, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Voigt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Waldegger, Dr. Walthers, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Werner, PD Dr. Westermann, Prof. Dr. Wiegandt, PD Dr. Wilhelm, Dr. Wollmer, Dr. Wündisch, Prof. Dr. Wulf, Dr. Zemelin, Dr. Zettl, Dr. Zwiorek

7.6. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die maßgeblich an dieser Arbeit beteiligt waren.

Bei Prof. Dr. med. Th. M. Gress bedanke ich mich für die Möglichkeit in seinem Institut diese Arbeit anzufertigen.

Meinen besonderen Dank möchte ich PD Dr. med. Volker Ellenrieder für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation anzufertigen, aussprechen. Mein Dank gilt vor allem der hervorragenden Betreuung während dieser Arbeit, bei der er mich auf stets nette, humorvolle und fachliche Art und Weise hinsichtlich der Durchführung und Auswertung der Arbeit unterstützt hat. Vielen Dank!

Ebenso möchte ich mich auch ganz herzlich bei Dr. med. Alexander König und Dr. med. Thomas Linhart bedanken, die mit ihren technischen Erfahrungen und den hilfreichen Auskünften bei größeren und kleineren Problemen des Laboralltags wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. med. German Horn danke ich für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Immunfluoreszenz.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Besonders Kristina Reutlinger, die mir mit Rat und Tat bei der experimentellen Durchführung zur Seite stand und stets ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Meiner Freundin Katrin Schlegemann danke ich ganz, ganz herzlich für die tolle Zeit im Labor, für die Durchstehung der vielen kleinen und großen Katastrophen des Versuchsalldages sowie für die Verbringung der vielen Feiertage, Wochenenden und Abende im Labor, die diese Zeit unvergesslich machen wird. Danke!!!!

Einen ganz besonderes großes Dankeschön gilt ebenso meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Lebensweg und das sie mir dabei halfen, das zu erfüllen, was ich mir immer erträumte.

Sowie meiner Schwester Alexandra und meiner Freundin Claudia Kreutner, für die vielen hilfreichen Korrekturen, ohne die diese Arbeit nur halb so gut geworden wäre. Vielen Dank!

7.7. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung neuer Interaktionspartner der NFAT-vermittelten Transkription im Pankreaskarzinom“ im medizinischen Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Professor Dr. med. Th. M. Gress ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Eine Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit befindet sich in Vorbereitung.

Marburg, im Dezember 2009

.....