

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. T. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Funktionelle Analyse von CUX1 in tumorassoziierten Makrophagen des Pankreaskarzinoms



Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Benjamin Kühnemuth

aus Wittmund

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 13.01.14

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Patrick Michl

Korreferent: Prof. Dr. Stiewe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.1.1 Molekulare Pathogenese des Pankreaskarzinoms	2
1.1.2 Das Stroma des Pankreaskarzinoms	3
1.2 Tumorassoziierte Makrophagen.....	5
1.2.1 Plastizität von Makrophagen.....	6
1.2.2 Transkriptionelle Regulation der Makrophagenpolarisierung.....	8
1.3 Der Transkriptionsfaktor CUX1	10
1.3.1 Rolle von CUX1 in der Tumorprogression.....	11
1.4 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Laborgeräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.3 Chemikalien.....	18
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Standards	19
2.1.6 Oligonukleotide, Primer und siRNAs	20
2.1.7 Plasmide.....	23
2.1.8 Antikörper	24
2.1.9 Reagenzien und Kits.....	26
2.1.10 Materialien für die Kultur von Zellen	28
2.1.11 Biologisches Material.....	29
2.1.12 Software	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden.....	32

2.2.2	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen	32
2.2.3	Kokultorexperimente.....	35
2.2.4	Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen	36
2.2.5	Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren	37
2.2.6	Luciferase-Reportergen-Assays.....	39
2.2.7	Proteinchemische Methoden	40
2.2.8	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	45
2.2.9	MTT Vitalitäts-Assay.....	49
2.2.10	Durchflusszytometrie	49
2.2.11	Gewebefärbungen	50
2.2.12	Statistische Analyse.....	51
3.	Ergebnisse	52
3.1	Expression von CUX1 in tumorassoziierten Makrophagen des Pankreas- karzinoms.....	52
3.2	Die Expression von CUX1 in Makrophagen wird durch TGF- β 1 stimuliert.....	54
3.3	CUX1 beeinflusst die Zytokinexpression in Makrophagen.....	56
3.3.1	Regulation von CCL5 und CXCL10 durch CUX1	58
3.3.2	CUX1 reguliert CCL5 und CXCL10 auf transkriptioneller Ebene	60
3.3.3	CUX1 reprimiert Transkription durch direkte Promotor-Interaktion	62
3.4	CUX1 beeinflusst die DNA-Bindung von NF- κ Bp65	66
3.5	CUX1 beeinflusst die Acetylierung von NF- κ Bp65	68
3.5.1	CUX1 interagiert mit NF- κ Bp65 und HDAC1.....	69
3.6	CUX1 regulierte Zytokine beeinflussen das Tumormicroenvironment	70
3.6.1	Auswirkungen von CUX1-Expression in Makrophagen auf Attraktion von CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	71
3.6.2	Auswirkungen der CUX1-Expression in Makrophagen auf Angiogenese.....	72
4.	Diskussion	75
4.1	CUX1-Expression in Makrophagen.....	75
4.2	CUX1 vermittelt eine immunsuppressive Wirkung in Makrophagen	77

4.3	CUX1 inhibiert die NF- κ B abhängige Zytokinexpression	78
4.4	Rolle von CUX1 in der Polarisierung von Makrophagen	80
4.5	Auswirkungen von CUX1 in TAMs auf die Tumorprogression	82
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	84
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Anhang	117
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	120
9.	Abbildungsverzeichnis.....	124
10.	Tabellenverzeichnis.....	126
	Verzeichnis akademischer Lehrer	127
	Danksagung	128

1. Einleitung

Maligne Tumore gehören zu den Haupttodesursachen in den industrialisierten Ländern, und trotz enormer Anstrengungen ist die Heilung oder längerfristige Kontrolle einer fortgeschrittenen Krebserkrankung nach wie vor oftmals nicht möglich. Eine wesentliche Ursache für die nur unzureichenden Therapieerfolge und zahlreichen Rückschläge bei der Entwicklung neuer Therapieansätze ist in der äußerst komplexen Biologie maligner solider Tumore zu finden, die trotz großer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten noch immer nur unvollständig verstanden ist.

Lange lag der Fokus der Krebsforschung auf den entarteten Tumorzellen und der Untersuchung ihrer genetischen und molekularen Veränderungen. Der vielfach enttäuschende Ausgang zahlreicher klinischer Studien, welche zielgerichtete Substanzen gegen einzelne molekulare Komponenten der Krebszellen getestet haben, hat deutlich werden lassen, dass das Verhalten eines Tumors und dessen Ansprechen auf eine Therapie einer komplexen Regulation unterliegt. Ein wichtiger Baustein dieser komplexen Wechselwirkungen ist das die Krebszellen umgebende Tumorgewebe (Tumorstroma). Das Tumorstroma, bestehend im Wesentlichen aus diversen Typen nicht-maligner Zellen und Extrazellulärer Matrix, hat einen unbestrittenen Einfluss auf die Entstehung, Entwicklung und Therapieresistenz von Tumoren (Laconi, 2007; Albini *et al.*, 2007; Tlsty *et al.*, 2006).

Das Adenokarzinom des Pankreas zeigt als charakteristisches Merkmal ein sehr stark ausgeprägtes Tumorstroma, das in manchen Fällen bis zu 80 % der Tumormasse ausmachen kann (Erkan *et al.*, 2012). Damit stellt das Pankreaskarzinom ein ideales Modellsystem für die Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen dar und ist daher Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das Pankreas erfüllt Funktionen sowohl als exokrine Drüse, die Verdauungssekrete produziert und in den Darm abgibt, wie auch als endokrine Drüse, die u. a. durch die Produktion von Insulin und Glucagon den Blutzuckerspiegel reguliert. Sowohl das exokrine wie auch das endokrine Gewebe des Pankreas kann maligne entarten. Etwa 95 % der Tumore des Pankreas gehen aus Zellen des exokrinen Teils hervor. In wiederum 92 % der exokrinen Tumore handelt es sich um duktales Adenokarzinome

(Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2012). Diese Arbeit fokussiert sich, sofern nicht gesondert angemerkt, auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas. Das Pankreaskarzinom gehört derzeit zu den tödlichsten Krebserkrankungen des Menschen (Siegel *et al.*, 2013). Mit etwa 15.000 Neuerkrankungen pro Jahr steht es in Deutschland zwar nur auf Platz neun der Häufigkeit aller Krebserkrankungen, aber mit fast ebenso vielen Todesfällen auf Platz vier der krebsbedingten Todesursachen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 7 - 8 % (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2012). Die Ursachen für die hohe Sterblichkeit liegen, neben der meist späten Diagnosestellung, vor allem in der hohen Aggressivität dieser Krankheit und in dem zumeist schlechten Ansprechen auf derzeitige Therapieoptionen (Michl *et al.*, 2013; Krug *et al.*, 2012).

1.1.1 Molekulare Pathogenese des Pankreaskarzinoms

Mit Ausnahme von wenigen hereditären Prädispositionen beruht die Entstehung fast aller bösartigen Tumore auf spontanen genetischen oder epigenetischen Veränderungen des Genoms somatischer Zellen. Durch diese Veränderungen können Zellen neue Eigenschaften erlangen und so die körpereigenen Kontrollmechanismen umgehen, die einer unkontrollierten Vermehrung von Zellen entgegenwirken. Demnach ist die Tumorgenese als ein mehrstufiger, evolutionärer Prozess zu verstehen, bei dem die betroffenen Zellen durch genetische Veränderungen Proliferations- und Überlebensvorteile erlangen und die so erworbenen neuen Eigenschaften an ihre Tochterzellen weitergeben (Greaves *et al.*, 2012; Nowell, 1976).

Den Beginn dieses Prozesses stellen meist Veränderungen in sogenannten Protoonko- und Tumorsuppressorgenen dar, die unter physiologischen Bedingungen für die Wachstumsregulation verantwortlich sind. So sind auch beim Pankreaskarzinom in den meisten Fällen charakteristische Mutationen in Protoonko- und Tumorsuppressorgenen zu finden (Bamford *et al.*, 2004). Insbesondere sind in diesem Zusammenhang die Gene für das G-Protein KRAS und die Tumorsuppressoren TP53, CDKN2A und SMAD4 zu nennen, welche mit einer großen Häufigkeit betroffen sind (Almoguera *et al.*, 1988; Ruggeri *et al.*, 1992; Caldas *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1996). So liegt beispielsweise in über 90 % der humanen Pankreaskarzinome eine Mutation des KRAS Gens vor, die zur Bildung einer konstitutiv aktiven Form des KRAS-Proteins und damit letztendlich zu einer permanenten Aktivierung der KRAS-Signalkaskade führt (Campbell *et al.*, 2010; Rodriguez-Viciano *et al.*, 2005). Die Aktivierung von KRAS ist bereits in frühen Vorläuferläsionen (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia – PanIN) zu

finden und kann daher als möglicher Beginn einer Tumorgenese betrachtet werden (Deramaudt *et al.*, 2005; Maitra *et al.*, 2003).

Die Rolle von onkogenem KRAS in der Tumorgenese des Pankreas wurde in zahlreichen genetischen Mausmodellen charakterisiert. Zwar entwickeln Tiere mit Expression von konstitutiv aktivem Kras in Zellen des Pankreas PanIN-Läsionen ohne weitere Stimuli, wie etwa eine Pankreatitis, jedoch nur in wenigen Fällen invasive Karzinome (Hingorani *et al.*, 2003, Guerra *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurden verschiedene Transgene mit der *Kras*-Mutation kombiniert, um Modelle zu erzeugen, die mit hoher Penetranz ein invasives metastasierendes Pankreaskarzinom entwickeln. Hierzu gehören u. a. Deletionen oder Mutationen von *Trp53*, *Cdkn2a* oder *Smad4* (Aguirre *et al.*, 2003; Hingorani *et al.*; 2005; Kojima *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde Gebrauch gemacht von dem transgenen Mausmodell LSL-*Kras*^{G12D/+}; LSL-*Trp53*^{R172H/+}; *Pdx-1-Cre*. Diese Tiere zeigen eine pankreasspezifische Expression von onkogenem Kras und eines dominant negativen Trp53 und entwickeln Tumore, die histologisch, molekularbiologisch sowie im klinischen Erscheinungsbild sehr große Ähnlichkeit zu der humanen Krankheit aufweisen (Hingorani *et al.*, 2005).

1.1.2 Das Stroma des Pankreaskarzinoms

Eine der charakteristischen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms ist die Präsenz eines ausgeprägten, kollagenreichen Tumorstromas (Desmoplasie) (Abb. 1). Als Tumorstroma bezeichnet man das die Krebszellen umgebende Tumorgewebe, im Wesentlichen bestehend aus genetisch nicht veränderten Zellen und Extrazellulärer Matrix (Chu *et al.*, 2007).

Der Beginn der Stromaentwicklung liegt oftmals bereits vor der Entstehung eines Karzinoms. So sind stromale Elemente sowohl beim Menschen als auch im genetischen Mausmodell bereits in der Umgebung der frühesten PanIN-Läsionen zu beobachten (Detlefsen *et al.*, 2005; Hingorani *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2007). Darüber hinaus geht eine Vielzahl der Pankreaskarzinome aus inflammatorischen Bedingungen hervor, die bereits eine ausgeprägte Stromareaktion zeigen. So stellt eine chronische Entzündung des Pankreas (Pankreatitis), hervorgerufen beispielsweise durch Alkoholmissbrauch, einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung eines Karzinoms dar (Whitcomb, 2004; Malka *et al.*, 2002). In Übereinstimmung hiermit ist die Anzahl an hochgradigen PanINs in Pankreata mit chronischer Pankreatitis gegenüber gesunden Pankreata deutlich erhöht (Andea *et al.*, 2003). Des Weiteren

lassen sich in einem Drittel der Patienten mit chronischer Pankreatitis aktivierende *KRAS*-Mutationen finden (Lohr *et al.*, 2000). Demnach kann vermutet werden, dass stromale Elemente und die durch sie geschaffenen inflammatorischen Bedingungen bereits den Prozess der Tumorentstehung begünstigen können.

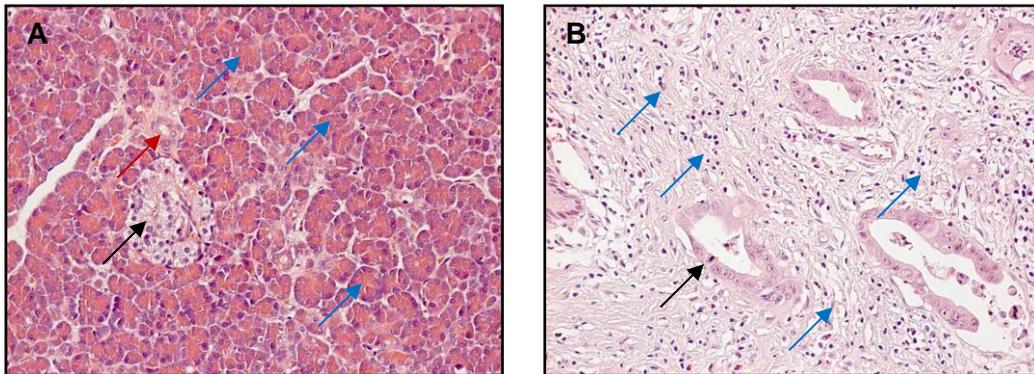


Abbildung 1: H&E-Färbung eines gesunden Pankreas und eines Pankreaskarzinoms. A) gesundes humanes Pankreasgewebe mit Inselzellen (schwarzer Pfeil), exokrinen Azinuszellen (blaue Pfeile) und Dukt (roter Pfeil). **B)** Humanes Pankreaskarzinom mit duktal angeordneten Tumorzellen (schwarzer Pfeil) und dem umgebenden Stromagewebe (blaue Pfeile).

Zu den Stromazellen des Pankreaskarzinoms zählen insbesondere mesenchymale Zellen, Zellen des Lymph- und Blutgefäßsystems sowie eine Vielzahl unterschiedlicher Leukozyten (Chu *et al.*, 2007).

Mesenchymale Zellen des Pankreaskarzinoms beinhalten, neben den die Blutgefäße umgebende Pericyten und einigen Adipocyten, vor allem verschiedene Typen von Fibroblasten und fibroblasten-ähnlichen Zellen. Insbesondere sind hier die sogenannten pankreatischen Sternzellen (Pancreatic Stellate Cells, PSC) zu nennen, die im gesunden Pankreas in einem ruhenden Zustand vorliegen und durch nur teilweise bekannte Stimuli aktiviert werden. Im aktivierten Zustand sind PSC charakterisiert durch die Produktion großer Mengen von EZM-Proteinen wie Kollagen I und III, Fibronectin und Lamin (Bachem *et al.*, 1998). Damit gelten PSCs als Hauptverursacher der Fibrose im Pankreaskarzinom (Apte *et al.*, 2004; Bachem *et al.*, 2005).

Zwar ist das Adenokarzinom des Pankreas deutlich weniger vaskularisiert als beispielsweise neuroendokrine Tumore des Pankreas, dennoch spielen Endothelzellen des Blut- und Lymphgefäßsystems auch hier eine wichtige Rolle bei der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Dies wird bestärkt durch einen begünstigenden

Einfluss der Gefäßdichte auf Tumorgröße und Metastasierung, verbunden mit einer schlechteren Prognose (Itakura *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1999).

Infiltrierende Entzündungszellen stellen einen wesentlichen Bestandteil des Stromas des Pankreaskarzinoms dar (Chu *et al.*, 2007). Die zelluläre Zusammensetzung dieses Infiltrates ist bisher nur wenig untersucht. In einem Kras induzierten genetischen Mausmodell des Pankreaskarzinoms konnte gezeigt werden, dass es sich bei den infiltrierenden Immunzellen insbesondere um potenziell immunsuppressive Zellen wie Myeloid-derived Suppressor Cells (MDSC), regulatorische T-Lymphozyten (Treg) und tumorassoziierte Makrophagen (TAM) handelt (Clark *et al.*, 2007).

Heute wird davon ausgegangen, dass im Falle vieler humaner Tumore das inflammatorische Infiltrat nicht Zeichen einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort ist, sondern dass die Immunzellen durch den Tumor beeinflusst werden und so das Tumorwachstum sogar begünstigen können (Balkwill *et al.*, 2012). Exemplarisch für diese ambivalente Rolle des Immunsystems stehen Makrophagen, die Hauptgegenstand dieser Arbeit sind. Daher soll auf diesen Zelltyp im Folgenden ausführlicher eingegangen werden.

1.2 Tumorassoziierte Makrophagen

Hinweise auf die Bedeutung von Makrophagen für die Tumorbiologie stammen aus der Beobachtung, dass für viele humane Tumore ein Zusammenhang zwischen der Anzahl infiltrierender Makrophagen und der Prognose für den Patienten festgestellt werden konnte. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ist eine erhöhte Anzahl an Makrophagen verbunden mit einer schlechteren Prognose und einer Verkürzung der durchschnittlichen Überlebenszeit (Leek *et al.*, 1996; Lissbrant *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 2012; Fujiwara *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Kawahara *et al.*, 2010; Makitie *et al.*, 2001; Steidl *et al.*, 2010). Dieser negative Einfluss von Makrophagen konnte in Tumor-Mausmodellen durch Makrophagen-Depletion oder Verstärkung der Makrophagen-Infiltration bestätigt werden (Lin *et al.*, 2001; Zeisberger *et al.*, 2006; Bottazzi *et al.*, 1992). Interessanterweise lassen sich auch gegenteilige Beispiele zu diesem negativen Effekt von Makrophagen finden. So stellt eine erhöhte Makrophagendichte im kolorektalen Karzinom einen positiven prognostischen Faktor dar (Lackner *et al.*, 2004; Forssell *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010). Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Wirkungen von Makrophagen bietet die hohe funktionelle Plastizität dieses Zelltyps.

1.2.1 Plastizität von Makrophagen

Tumor-assoziierte Makrophagen haben ihren Ursprung in Monozyten, die durch vom Tumorgewebe freigesetzte Faktoren wie u. a. CCL2, M-CSF oder VEGF aus dem Blutstrom in das Tumorgewebe rekrutiert werden (Graves *et al.*, 1989; Dorsch *et al.*, 1993; Barleon *et al.*, 1996). Im Gewebe reifen sie unter dem Einfluss der jeweils vorliegenden Signale zu Makrophagen heran, die, je nach im Gewebe vorherrschenden Faktoren, deutlich unterscheidbare funktionelle Phänotypen aufweisen können. Durch *In-vitro*-Behandlung mit definierten Stimuli konnten distinkte Makrophagen-Phänotypen generiert werden, die in der aktuellen Literatur, analog zu der Polarisierung von T-Helferzellen in Th1 und Th2, als M1- bzw. M2-Makrophagen bezeichnet werden (Sica *et al.*, 2012).

Der M1- oder auch klassisch aktivierter Makrophage ist der am längsten bekannte und am besten untersuchte Phänotyp. Er kann induziert werden durch Kontakt mit bakteriellen Produkten wie Lipopolysacchariden (LPS) oder durch Stimulation mit proinflammatorischen Signalmolekülen wie Interferon-gamma (INF- γ) oder Tumor-necrosis factor alpha (TNF- α). Diese Makrophagen sind gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentierung, durch die Produktion von toxischen Stoffwechselprodukten wie reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen und durch die Expression eines charakteristischen, proinflammatorischen Zytokinprofils (Martinez *et al.*, 2008).

M1-Makrophagen können eine Th1-Immunantwort induzieren und werden daher in Verbindung gebracht mit der effizienten Bekämpfung sowohl von pathogenen Mikroorganismen als auch von Tumorzellen. Damit gelten klassisch aktivierte Makrophagen als potenziell in der Lage, Tumorwachstum zu inhibieren, indem sie Attraktion, Proliferation und Aktivität von Typ1-T-Zellen stimulieren (Martinez *et al.*, 2008).

Bei den sogenannten M2- oder auch alternativ aktivierten Makrophagen handelt es sich um eine Gruppe von mehreren unterscheidbaren Subtypen. So wurde eine alternative Aktivierung zu M2-Makrophagen neben den IL-4-Rezeptor Liganden IL-4 und IL-13 u. a. auch durch Stimulation mit u. a. IL-10, CCL2 und CXCL4 beobachtet (Stein *et al.*, 1992; Doyle *et al.*, 1994; Gleissner *et al.*, 2010; Bogdan *et al.*, 1993; Roca *et al.*, 2009). Ebenfalls sollen Makrophagen durch hypoxische Bedingungen einen M2-Phänotyp annehmen (Riboldi *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Heterogenität wird in der derzeitigen Literatur oftmals eine weitere Unterteilung in M2a, M2b, M2c oder in M2 und „M2-like“ vorgenommen (Mantovani *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2013).

Entsprechend heterogen sind die für M2-Makrophagen beschriebenen Charakteristika. Zu ihnen gehören u. a. eine erhöhte phagozytotische Aktivität sowie eine gesteigerte Expression von Mannose-Rezeptor 1 (CD206) und mehrerer Scavenger-Rezeptoren (z. B. CD163 und CD204). Des Weiteren ist die Produktion von Ornithin und Polyaminen durch den Arginase-Signalweg charakteristisch. Das sezernierte Zytokinprofil variiert je nach Stimulus, unterscheidet sich aber klar von dem der M1-Makrophagen (Martinez *et al.*, 2008, Mantovani *et al.*, 2004).

M2-Makrophagen sind an Gewebeneu- und -umbildung nach Verletzungen, Gewebhomeostasis und Immunoregulation beteiligt. In dieser Funktion können sie Zellproliferation fördern, Apoptose inhibieren, Angiogenese fördern oder eine adaptive Immunantwort beenden bzw. unterdrücken (Mantovani *et al.*, 2013). Demnach können diese Makrophagen Prozesse fördern, die potenziell ein Tumorwachstum begünstigen.

Die Vermutung, dass M1-Makrophagen Funktionen ausüben, die tumorinhibierend wirken während M2-Makrophagen tumorbegünstigende Eigenschaften besitzen, wird durch zahlreiche Studien bestärkt, welche zeigen, dass ein hoher Anteil an M2-polarisierten Makrophagen einen negativen prognostischen Faktor darstellt, während sich ein hoher Anteil an M1 polarisierten Makrophagen günstig auf die Prognose auswirkt. Mit Ausnahme des kolorektalen Karzinoms zeigen die Makrophagen in den meisten humanen und murinen Tumoren Charakteristika eines M2-Phänotyps (Ma *et al.*, 2010; Bronkhorst *et al.*, 2011; Kurahara *et al.*, 2011; Ong *et al.*, 2012; Galon *et al.*, 2006).

Bei einer Beschreibung von Makrophagen-Phänotypen auf der Grundlage von *In-vitro*-Experimenten ist zu berücksichtigen, dass unter physiologischen Bedingungen in den Geweben eines Organismus eine Vielzahl zeitlich und räumlich unterschiedlicher Signale auf die Zellen einwirkt. So weisen Makrophagen *in-vivo* Phänotypen auf, die von den *In-vitro*-Beobachtungen deutlich abweichen. Beispielsweise zeigen Makrophagen im Fettgewebe adipöser Mäuse einen gemischten Phänotyp, der sowohl die Expression von M1- als auch M2-Zytokinen aufweist (Shaul *et al.*, 2010). Ähnliche gemischte Phänotypen wurden auch für das Mammakarzinom beschrieben (Torroella-Kouri *et al.*, 2009). Dies macht deutlich, dass eine artifizielle Einteilung in M1- und M2-Makrophagen eine starke Vereinfachung darstellt, die der Komplexität der Erscheinungsbilder dieser Zellen im lebenden Organismus nur unzureichend Rechnung tragen kann.

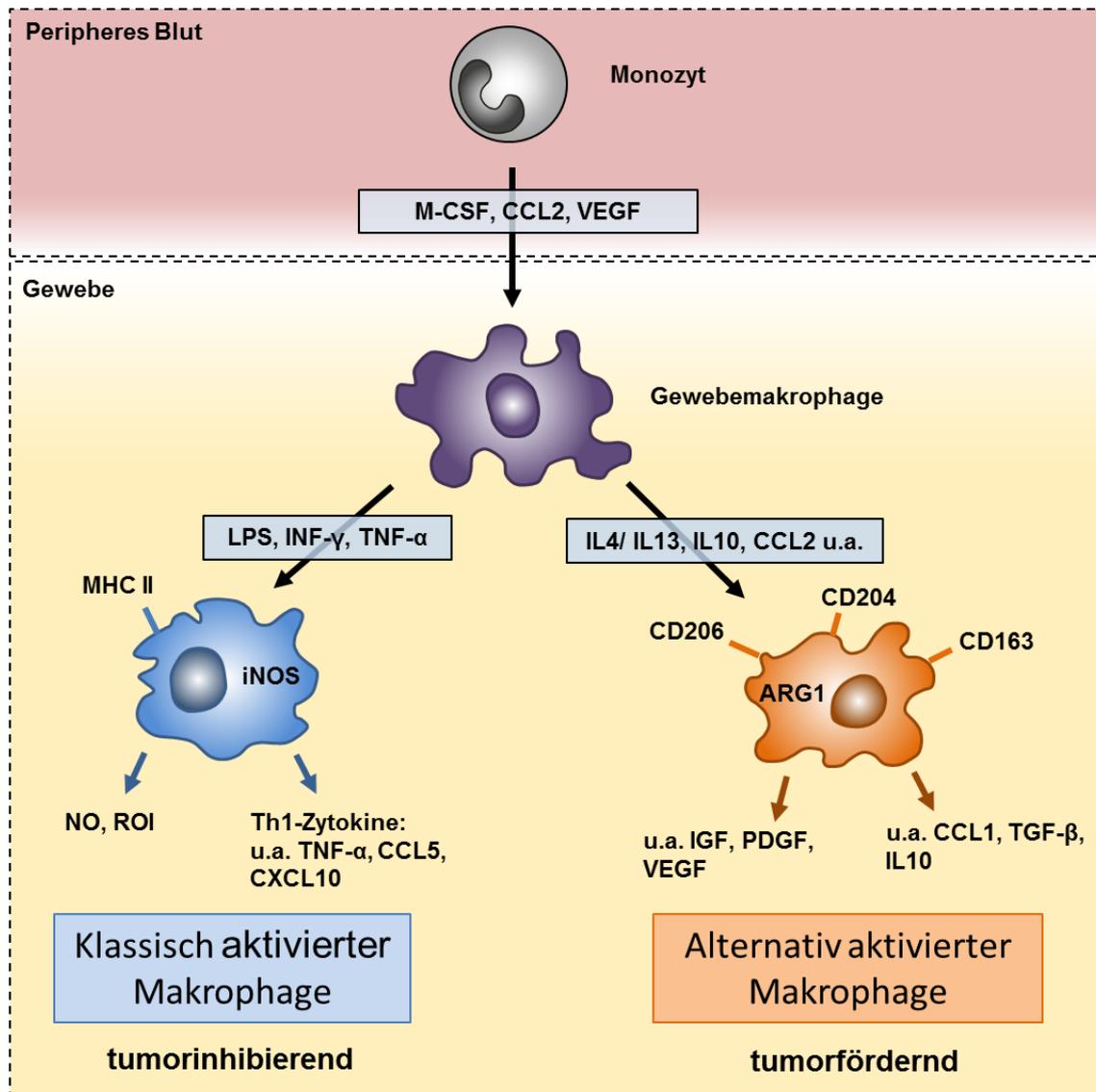


Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht über die Polarisierung von Makrophagen. Aus dem Blutstrom ins Gewebe einwandernde Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen die je nach vorliegenden Faktoren unterscheidbare Phänotypen aufweisen. Grob lassen sich potenziell tumorinhibierende klassisch aktivierte und tumorfördernde alternativ aktivierte Makrophagen unterscheiden.

1.2.2 Transkriptionelle Regulation der Makrophagenpolarisierung

Aufgrund des weiten Spektrums an Makrophagen-Phänotypen und der Vielzahl beteiligter Signale sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen äußerst komplex und bisher nur teilweise verstanden. Dennoch konnten mehrere beteiligte Signalwege und involvierte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Schlüsselrollen kommen dabei Faktoren der Proteinfamilien der „Signal Transducer and Activator of

Transcription“ (STAT) und „Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells“ (NF- κ B) zu, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll. Daneben sind eine Vielzahl weitere Faktoren mit der Polarisierung von Makrophagen in Verbindung gebracht worden (Biswas *et al.*, 2010; Lawrence *et al.*, 2011).

Der kanonische Jak/Stat-Signalweg ist einer der am stärksten konservierten Signalwege in Metazoen. Die Bindung eines extrazellulären Liganden an den Rezeptor führt zur intrazellulären Phosphorylierung der mit ihm assoziierten Januskinasen (JAK). Diese dadurch aktivierten JAKs wiederum sind in der Lage, STAT-Proteine zu phosphorylieren und ebenfalls zu aktivieren. Die aktivierten STATs bilden Dimere oder komplexere Oligomere, gelangen in den Nukleus und regulieren hier durch die Bindung an DNA die Transkription. In Säugern gibt es 7 STATs, die je nach Gewebe, Zelltyp oder Rezeptor aktiviert werden (Harrison, 2012).

Mehrere Mitglieder der STAT-Familie sind an der Makropagenpolarisierung beteiligt. So zeigte sich die durch INF- γ induzierbare STAT1-Aktivität als entscheidend für die M1-Polarisierung. STAT1 bindet an Promotoren M1-assoziiierter Gene wie u. a. NOS2, the MHC class II transactivator (CIITA) und IL-12 und fördert deren Transkription (Darnell *et al.*, 1994). Demgegenüber führt eine Stimulation von Makrophagen mit IL-4 und IL-13 zur Aktivierung von STAT6 (Takeda *et al.*, 1996). STAT6 reguliert zahlreiche Gene, die mit dem M2-Phänotyp assoziiert sind, wie beispielsweise Arginase1 oder Mannose-Rezeptor 1 (CD206) und kann somit als Masterregulator von M2-Genen betrachtet werden (Van den Bossche *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2008). Darüber hinaus beeinflussen sich die STAT-Signalwege gegenseitig. So führt eine Stimulation von Makrophagen mit IL-10 zur Aktivierung von STAT3, was wiederum die Expression von SOCS3 hochreguliert (Williams *et al.*, 2004; Donnelly *et al.*, 1999). SOCS3 ist ein potenter Inhibitor von M1-Zytokin Signalwegen (Qin *et al.*, 2012).

NF- κ B-Signalwege sind ebenfalls entscheidend an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Die NF- κ B-Familie besteht aus fünf Mitgliedern, die jeweils Homo- und Heterodimere miteinander bilden können. Unter nicht stimulierten Bedingungen liegen diese NF- κ B-Dimere gebunden an den Inhibitor of κ B (I- κ B) im Zytoplasma vor. Nach einer Stimulation kommt es zu einer Phosphorylierung von I- κ B und dessen proteasomalem Abbau. Die Freisetzung von NF- κ B ermöglicht die Translokation in den Nukleus und damit die Promotorbindung und Regulation der Transkription von Zielgenen. NF- κ B-Aktivierung ist entscheidend für die Antwort von Makrophagen auf mikrobielle und inflammatorische Stimuli wie etwa TLR-Liganden, IL-1 β und TNF- α und

führt zur Expression zahlreicher proinflammatorischer, M1-assoziiertes Gene wie IL-12, IL-1 oder TNF- α (Mantovani *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2007).

1.3 Der Transkriptionsfaktor CUX1

CUX1, auch bekannt als CUTL1, CCAAT-Displacement-Protein (CDP) oder CUT, ist ein evolutionär hochkonservierter Homeobox-Transkriptionsfaktor. Das humane CUX1-Protein besteht aus 1505 Aminosäuren und enthält vier DNA-Bindungsdomänen: drei so genannte CUT-Repeats und eine Homeodomäne (Harada *et al.*, 1994). Neben dem ca. 200 kDa großen „full-length“ CUX1-Protein (p200) wurden mehrere kleinere CUX1-Isoformen beschrieben, die jeweils entsprechend ihres Molekulargewichtes benannt wurden. Diese verkürzten CUX1-Proteine entstehen durch Verwendung eines alternativen Transkriptionsstarts (p75) oder durch proteolytische Spaltung von CUX1p200 (p150, p110, p90 und p80) (Rong Zeng *et al.*, 2000; Goulet *et al.*, 2004; Goulet *et al.*, 2006; Maitra *et al.*, 2006; Truscott *et al.*, 2007).

Die Anwesenheit der DNA-Bindungsdomänen in den CUX1-Proteinen bestimmt ihre Interaktion mit DNA und ihre transkriptionelle Aktivität. Während CUX1p200 als transkriptioneller Repressor fungiert, können die p110-, p90-, p80- und p75-Isoformen sowohl als transkriptioneller Repressor wie auch als Aktivator wirken. Dennoch beschreibt die überwiegende Mehrheit der Studien CUX1 als transkriptionellen Repressor (Goulet *et al.*, 2002; Goulet *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2001; Lievens *et al.*, 1995; Sansregret *et al.*, 2008).

Diese Repressor-Aktivität kann vermittelt werden durch Verdrängung von transkriptionellen Aktivatoren von ihren DNA-Bindestellen, durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen oder durch die Rekrutierung von Histon-Lysin-Methyltransferasen (Kim *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Nishio *et al.*, 2004). Auch wurde eine negative Regulation der Genexpression durch die Bindung von CUX1 an „Matrix-Attachment-Regionen“ und Modulation ihrer Bindung an das Kerngerüst beschrieben (Banan *et al.*, 1997; Stunkel *et al.*, 2000). Die Mechanismen, die der Funktion von CUX1 als transkriptionellen Aktivator zugrunde liegen, sind bisher nur wenig untersucht.

1.3.1 Rolle von CUX1 in der Tumorprogression

Für mehrere humane Tumore wurde eine gesteigerte CUX1-Expression beschrieben (De Vos *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2003; Michl *et al.*, 2005). Auch für das Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression von CUX1 im Karzinom verglichen mit gesundem Pankreasgewebe signifikant erhöht ist. Darüber hinaus besteht eine erhöhte Expression in hochgradigen Tumoren im Vergleich zu niedriggradigen Tumoren (Ripka *et al.*, 2010; Michl *et al.*, 2005) (Abb. 3). Für das Mammakarzinom konnte eine negative Korrelation zwischen CUX1-Expression und Überleben gezeigt werden (Michl *et al.*, 2005; Cadieux *et al.*, 2009).

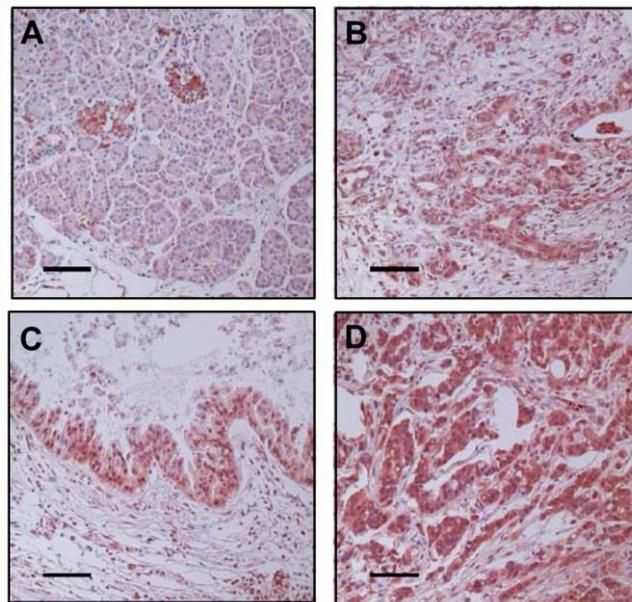


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von CUX1 an humanen Pankreasgeweben. A) gesundes Pankreas, B) G1 Tumor C) G2 Tumor D) G3 Tumor. Balken entspricht 100 µm. Quelle: Michl *et al.*, 2005.

Die tumorfördernde Wirkung von CUX1 konnte bisher auf die Beeinflussung von drei zellulären Prozessen in Krebszellen zurückgeführt werden. Dies sind Zellproliferation, Zellmotilität bzw. -invasivität und Apoptose.

Studien zeigen, dass die proproliferativen Effekte von CUX1 hauptsächlich durch die CUX1p110-Isoform vermittelt werden. Diese Isoform entsteht durch proteolytische Spaltung von CUX1p200 in der G1/S-Transition des Zellzyklus (Goulet *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2001). Stabil mit CUX1p110 transfizierte Zellen zeigen gesteigerte Proliferation bei einer Verkürzung der G1-Phase. Andererseits zeigen aus CUX1-Knockout-Mäusen isolierte Fibroblasten eine verlängerte G1-Phase (Sansregret *et al.*, 2006). Eine genomweite Analyse der CUX1p110-Bindestellen in transformierten und

nicht transformierten Zellen zeigte, dass zahlreiche CUX1-Zielgene eine Rolle spielen in Proliferation und Zellzyklus (Harada *et al.*, 2008).

Erste Hinweise, dass CUX1 eine Rolle in der Zellmotilität spielt, stammen aus Untersuchungen, welche zeigten, dass eine Depletion von CUX1 zu einer reduzierten Motilität und Invasivität führt (Michl *et al.*, 2005). In Übereinstimmung damit zeigen CUX1p110- oder CUX1p200-überexprimierende Zellen eine erhöhte Fähigkeit zur Migration und Invasivität (Kedinger *et al.*, 2009; Cadieux *et al.*, 2009). Zellen mit einem stabilen Knockdown bzw. einer Überexpression von CUX1 zeigen eine reduzierte bzw. erhöhte Anzahl von Lungenmetastasen nach Injektion in die Schwanzvene von Mäusen (Michl *et al.*, 2005; Cadieux *et al.*, 2009). Molekulare Grundlagen für die Effekte von CUX1 auf die Zellmotilität wurden durch genomweiten Promotorbindungsanalysen aufgedeckt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CUX1 die Expression von Genen hemmt, die die Migrationsfähigkeit inhibieren. Hierzu gehören u. a. E-Cadherin und Occludin. Andererseits aktiviert CUX1 die Expression von migrationsfördernden Genen wie u. a. Fokal-Adhäsion-Kinase (FAK), N-Cadherin und Vimentin (Kedinger *et al.*, 2009). Diese Regulation wird vermittelt sowohl durch direkte Bindung von CUX1 an die Promotoren dieser Gene als auch durch die Modulation der Expression von beteiligten Transkriptionsfaktoren wie z. B. SNAI1, SNAI2, SRC und WNT5A (Kedinger *et al.*, 2009; Ripka *et al.*, 2007).

Studien in Pankreaskarzinomzellen zeigten, dass eine siRNA-vermittelte Reduzierung der CUX1-Expression die TNF- α - und TRAIL-induzierte Apoptose steigert, während Überexpression von CUX1 Apoptose inhibiert. Darüber hinaus zeigen Tumor-Xenografts, behandelt mit CUX1-siRNA, ein verzögertes Wachstum und eine erhöhte Apotoserate (Ripka *et al.*, 2010). Zum Teil können diese Effekte erklärt werden durch die positive Regulation des antiapoptischen Proteins BCL2, des Glutamatrezeptors GRIA3 und des Signalmoleküls WNT5A, die als CUX1-Effektoren identifiziert werden konnten (Ripka *et al.*, 2010; Ripka *et al.*, 2010, Griesmann *et al.*, 2013).

1.4 Zielsetzung

In den meisten malignen Tumoren werden Makrophagen progressionsfördernde Wirkungen zugeschrieben. Kenntnisse über die zugrunde liegenden Signalwege und Mechanismen könnten Möglichkeiten zur deren therapeutischer Inhibition aufzeigen.

Der Transkriptionsfaktor CUX1 ist im Gewebe des Pankreaskarzinoms überexprimiert. Seine Expression ist mit einem negativen Einfluss auf die Tumorerkrankung assoziiert,

wie am Mammakarzinom gezeigt werden konnte (Michl *et al.*, 2005). Dieser Einfluss wurde bisher ausschließlich auf die Funktionen von CUX1 in Karzinomzellen zurückgeführt.

Basierend auf immunhistochemischen Beobachtungen, dass die Expression von CUX1 nicht auf das Tumorzellkompartiment beschränkt ist, sondern dass teilweise auch hohe Expressionslevel von CUX1 in Zellen des tumorassoziierten Stromas vorliegen, war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle von CUX1 in stromalen Zellen des Tumorgewebes, insbesondere in den tumorassoziierten Makrophagen, zu charakterisieren. Hierzu wurden drei Fragen bearbeitet:

1. Ist CUX1 in Tumor-assoziierten Makrophagen des Pankreaskarzinoms exprimiert und wie wird diese Expression reguliert?
2. Spielt CUX1 eine funktionelle Rolle bei der Polarisation von Tumor-assoziierten Makrophagen?
3. Welches sind die beteiligten Signalwege und Mechanismen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Amaxa Nukleofektor II	Lonza
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer
Bakterienschüttler HT	INFORS HT
Brutschrank Function Line	Heraeus Instruments
ChemoCam Imager	Intas
Drahtbügel für Färbegestell	Kobe
Dri-Block DB2A	Techne
Drigalski-Spatel	Carl Roth
Electrophoretic Gel System MidiCell Primo	E-C Apparatus Corporation
Electrophoretic Gel System MiniCell Primo	E-C Apparatus Corporation
ELISA Reader Multiskan FC	Thermo Scientific
Färbegestell	Kobe
Färbekasten	Kobe
Feinwaage AE163	Mettler Toledo
Hämocytometer	Marienfeld
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Histoturm (Spezialanfertigung)	Kobe
Kryocontainer „Mr. Frosty“	Nalgene Labware
Kühlschrank	Liebherr
Luminometer DLReady™	Berthold Technologies
Magnet OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Magnetrührer mit Heizplatte MR2002	Heidolph

Gerät	Hersteller
Magnetständer MACS® Multistand	Miltenyi Biotec
Mikrotom RM2155	Leica
Mini-Protean-Tetra-System Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Mini-Protean-Tetra-System Gel Releaser	Bio-Rad
Mini-Protean-Tetra-System Glasplatten dünn	Bio-Rad
Mini-Protean-Tetra-System Glasplatten	Bio-Rad
Multipette	Eppendorf
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PeqLab
PCR-Maschine DNAEngine	Bio-Rad
pH-Meter Education Line	Mettler Toledo
PipetBoy acu	Integra Biosciences
Pipette Discovery ⁺ 0,5 - 10 µl	High Tech Lab
Pipette Discovery ⁺ 2 - 20 µl	High Tech Lab
Pipette Discovery ⁺ 20 - 200 µl	High Tech Lab
Pipette Discovery ⁺ 100 - 1000 µl	High Tech Lab
Rüttler Unimax 2010	Heidolph
Schüttler AS250.3	IKA
Spektrophotometer Nano Drop 1000	peqLab
Standzentrifuge Cryofuge 8000	Heraeus
Standzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Sterilbank Bio-II-A	Telstar
Sterilbank Lamin Air HB2448	Heraeus
Stickstoffaufbewahrungsbehälter	Taylor-Wharton Cryogenics
Tiefkühlschrank Hera freeze	Heraeus Instruments
Timer Model TR118	Oregon Scientific
Tischkühlzentrifuge Mikro 200 R	Hettich
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph
Ultraschallgerät Sonifier W-250D	Branson

Gerät	Hersteller
Vortexer-Schüttler VF2	IKA
Waage Precision Plus	OHAUS
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifuge J2-21 M/E	Beckmann

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
6 Well Inserts für Kokultur; 0,4 µm Porengröße	BD Falcon
96 Well Platte für qPCR MicroAMP	Applied Biosystems
Blotting-Papier; 0,4 mm dick; mittlere Saugfähigkeit	Kobe
Combitips (0,2 - 12,5 ml)	Eppendorf
Combitips plus (2,5 und 12,5 ml)	Eppendorf
Einmalhandschuhe Nobaglove Latex	Noba
Einmalhandschuhe Nobaglove Softnitril	Noba
Einmal-Injektions-Kanüle 26 G Sterican®	Braun
Einmal-Injektions-Kanüle 27 G Sterican®	Braun
ELISA-Platte Immuno Plate Clear	Thermo Scientific
Filter für 500 ml; 75 mm ² ; 0,2 µm Porengröße	Thermo Scientific
Fettstift, DakoPen	Dako
Gewebekulturflasche 25, 75 und 175 cm ² CellStar®	Greiner bio-one
Gewebekulturplatte 96-Well weiß	Greiner bio-one

Produkt	Hersteller
Gewebekulturplatte 96-Well CellStar®	Greiner bio-one
Gewebekulturplatte 6-, 12- und 48-Well	Thermo Scientific
Gewebekulturplatte 24-Well Falcon®	Becton Dickinson
Gewebekulturplatte 6-Well für Kokultur	BD Falcon
Kryotubes; PP; 2 ml; Schraubverschluss	Greiner bio-one
MACS MS-Column	Miltenyi Biotec
MACS Präseparationsfilter; 30 µm	Miltenyi Biotec
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt
Objektträger	Menzel
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can
Petrischalen, 92 x 16 mm (ohne Nocken)	Sarstedt
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl Diamond®	Gilson
PP-Röhrchen 13 ml	Sarstedt
PP-Röhrchen 15 und 50 ml CellStar®	Greiner bio-one
PS-Röhrchen 12 ml CellStar®	Greiner bio-one
PVDF-Membran, Immobilon-P ; 0,45 µm Porengröße	Millipore
Reagiergefäß 1,5 und 2 ml	Thermo Scientific
SafesealTips Premium 10, 200, 1000 µl	Biozym
Serologische Pipette 2 und 25 ml CellStar®	Greiner bio-one
Serologische Pipette 5, 10 und 50 ml	Thermo Scientific
Skalpell CUTFIX	Braun

Produkt	Hersteller
Spritzen BD Plastipak®; 1 ml	Becton Dickinson
Spritzen BD Plastipak®; 10 ml	Becton Dickinson
Spritzenfilter Nalgene; 0,2 µm Porengröße	Thermo Scientific
Zellkulturschale; 10 cm Durchmesser	Thermo Scientific
Zellkulturschale; 14,5 cm Durchmesser	Greiner bio-one
Zellschaber; 25 cm Länge	Thermo Scientific
Zellsieb; 100 µm Porengröße	BD Falcon
Zellsieb; 74 µm Porengröße	Corning Life Sciences

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von folgenden Herstellern bezogen: Amersham Biosciences, AppliChem, Beckman Coulter, BioRad, Carl Roth, Fermentas, Fluka, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.

Alle Lösungen und Verdünnungen wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, mit AMPUWA® Reinstwasser (Fresenius Kabi) hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte unter Verwendung eines pH-Meters durch Zugabe von NaOH oder HCl.

Zur Sterilisation von Lösungen wurden diese, falls möglich, autoklaviert oder alternativ durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm gefiltert.

2.1.4 Enzyme

Tabelle 3: Enzyme

Enzym	Hersteller
β -Galaktosidase	Sigma-Aldrich
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche Diagnostics
Kollagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Applichem
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Sigma-Aldrich
RNase-Free DNase	Qiagen
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics

2.1.5 Standards

Tabelle 4: Standards

Standard	Hersteller
GeneRuler (100 bp - 1000 bp)	Thermo Scientific
GeneRuler (200 bp - 10000 bp)	Thermo Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope	Bio-Rad

2.1.6 Oligonukleotide, Primer und siRNAs

Oligonukleotide für DNA-Pulldown

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für DNA-Pulldown Experimente wurden von Biomers bezogen.

Tabelle 5: Oligonukleotide für DNA-Pulldown

Bezeichnung	Sequenz*
CCL5 wt for	5'-[Btn]TGGTAGCCAATAATGATAGAGTATGCTGTAAGATATCTTT CTCTCCCTCTGCTTCTCAACAAGTCTCTAATCAATTATTCCAC-3'
CCL5 wt rev	5'-GTGGAATAATTGATTAGAGACTTGTTGAGAAGCAGAGGGA GAGAAAGATATCTTACAGCATACTCTATCATTATTGGCTACCA-3'
CCL5 mu for	5'- [Btn]TGGTAGAAAATAATGATAGAGTATGCTGTAAGATATCTTT CTCTCCCTCTGCTTCTCAACAAGTCTCTAAAAAATTATTCCAC-3'
CCL5 mu rev	5'-GTGGAATAATTTTTTAGAGACTTGTTGAGAAGCAGAGGGAG AGAAAGATATCTTACAGCATACTCTATCATTATTTTCTACCA-3'
CXCL10 wt for	5'- [Btn]CTTATCCAATCAGAATTAGGGAG-3'
CXCL10 wt rev	5'- CTCCCTAATTCTGATTGGATAAG-3'
CXCL10 mu for	5'- [Btn]CTTATAAAATCAGAATTAGGGAG-3'
CXCL10 mu rev	5'- CTCCCTAATTCTGATTTTATAAG-3'
CUX1_NF- κ B_ WT 1 for	5'- [Btn]CAGAGGGAAATTCCGTAACCTTGGAGGCTACAATAAAT AATACCTTC- 3'
CUX1_NF- κ B_ WT 1 rev	5'- GAAGGTATTATTTATTGTAGCCTCCAAGTTACGGAATT TCCCTCTG-3'
CUX1_NF- κ B_ WT 2 for	5'- [Btn]ATGGGACTTCCCCAGGAACAGCCAGCAGGTTTTGC TAAGTCAACTGTAATGCCCTTATCCAATCAG-3'
CUX1_NF- κ B_ WT 2 rev	5'- CTGATTGGATAAGGGCATTACAGTTGACTTAGCAAAACCT GCTGGCTGTTCTGGGGAAGTCCCAT-3'
CUX1_NF- κ B_ mu 2 for	5'- [Btn]ATGGGACTTCCCCAGGAACAGCCAGCAGGTTTT GCTAAGTCAACTGTAATGCCCTTATAAAATCAG-3'

Bezeichnung	Sequenz*
CUX1_NF- κB_mu 2 rev	CTGATTTTATAAGGGCATTACAGTTGACTTAGCAAAACCTGCTG GCTGTTCCCTGGGGAAGTCCCAT-3'

*[Btn] = Biotin

Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden unter Verwendung der Software Primer Express V3.0 von Applied Biosystems entworfen und von Biomers bezogen.

Primer für ortsgerichtete Mutagenese

Tabelle 6: Primer für ortsgerichtete Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz
hIP10-Mu_for	5'-ATGCCCTTATAAAATCAGAATTAGGGA-3'
hIP10-Mu_rev	5'-TCCCTAATTCTGATTTTATAAGGGCAT-3'

Primer für Sequenzierung

Tabelle 7: Primer für Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz
IP10_seq	5'-TCAGATACCCAAATGAGCAATG-3'

Primer für cDNA-Synthese

Tabelle 8: Primer für cDNA-Synthese

Bezeichnung	Sequenz
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3' (15 x T)

Primer für qRT-PCR**Tabelle 9: Primer für RT-PCR**

Bezeichnung*	Sequenz
hCCL5 for	5'-CGGGAGTACATCAACTCTTTGGA-3'
hCCL5 rev	5'-CAAGCTAGGACAAGAGCAAGCA-3'
hCXCL9 for	5'-CCCACCCGAACGTCTTATCTAA-3'
hCXCL9 rev	5'-TGGGTCACAGACTCTCAAATTTATG-3'
mCXCL10-1 ChIP for	5'-GGAGCACAAGAGGGGAGAGGGAAAT-3'
mCXCL10-1 ChIP rev	5'-TGACTCAGCAAGGCTCCGCAA-3'
mCXCL10-2 ChIP for	5'-TGCCCTCGGTTTACAGGGGACT-3'
mCXCL10-2 ChIP rev	5'-TCTGCAAAGAGTTTCCCTCCCTGA-3'
hCXCL10 for	5'-TTCAGTAATAACTCTACCCTGGCACTAT-3'
hCXCL10 rev	5'-AAGGTGAGGGAAATATTTGAAGCA-3'
hCXCL11 for	5'-GGCATCTGAAAAACCTAGAACAAGT-3'
hCXCL11 rev	5'-TTGAAAGTCACAAACCATAGAAAAGTCT-3'
hCUX1 for	5'-ACAGCACACTCAAACAACCTGGAA-3'
hCUX1 rev	5'-ACGGTGCAAACCTCCATGGA-3'
hTNF- α for	5'-TGAGGCCAAGCCCTGGTAT-3'
hTNF- α rev	5'-GAGATAGTCGGGCCGATTGA-3'
h/m XS13 for	5'-TGGGCAAGAACACCATGATG-3'
h/m XS13 rev	5'-AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT-3'

* h – human, m - murin

Small interfering RNA (siRNA)**Tabelle 10: Small Interfering RNA**

Bezeichnung*	Sequenz	Herkunft
hCUX1-1	5'- GGAACAGAAGUUACAGAAUtt - 3'	Ambion
hCUX1-2	5'- GGAAGCUGAAGCAGCUUUCtt - 3'	Ambion
hCUX1-3	5'- GGAACAGAAGUUACAGAAUtt - 3'	Ambion
mCUX1-2	5' - GGUUCUGGAAUAACUCUUUtt- 3'	Ambion
negativ Kontrolle	Silencer Negative Control siRNA #1	Ambion

* h – human, m – murin

2.1.7 PlasmideReporter-Konstrukte**Tabelle 11: Reporter-Konstrukte**

Name	Insert	Vektor	Herkunft
TGL-IP10 (WT)	CXCL10 Promotor (-525 bis +97)	pGL3	D. Raddatz, Universität Göttingen
TGL-IP10_mu	CXCL10 Promotor (-525 bis +97)	pGL3	selbst hergestellt
pGL2-974	CCL5 Promotor (-974 bis +55)	pGL2	Antonella Casola, University of Texas, USA

Expressions-Konstrukte**Tabelle 12: Expressions-Konstrukte**

Name	Insert	Vektor	Herkunft
RSV - betaGal	β -Galactosidase	pRSV	H. Samuels, New York University Medical Center, New York, USA
pQCXIP	-	pQCXIP	T. Stiewe, Philipps- Universität Marburg, Deutschland
pQCXIP-CUX1	human CUX1-p200	pQCXIP	H. Griesmann, Philipps- Universität Marburg, Deutschland
pEGFP-C1 RelA	human NF- κ B p65	pEGFP-C1	Warner Greene, Gladstone Institute of Virology and Immunology, San Francisco, USA

2.1.8 AntikörperPrimäre Antikörper**Tabelle 13: Primäre Antikörper**

Antikörper	Methode*	Ursprungs- organismus	Spezifität	Herkunft/bezogen von
Anti – CD11b - APC	FACS	Ratte	Mensch, Maus	BioLegend
Anti - CD68	IHC	Maus	Mensch	Dako
Anti - CUX1	WB, IP	Kaninchen	Mensch, Maus	Michl <i>et al.</i> , 2005

Antikörper	Methode*	Ursprungs- organismus	Spezifität	Herkunft/bezogen von
Anti - CUX1	IHC	Maus	Mensch, Maus	Abcam
Anti - β -Actin	WB	Maus	Mensch, Maus	Sigma-Aldrich
Anti - NF- κ Bp65	IP, ChIP	Kaninchen	Mensch	Santa-Cruz
Anti - NF- κ Bp65	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti-Acetyl - NF- κ Bp65 (Lys310)	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - STAT1	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - STAT3	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - STAT6	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - pSTAT3 (Tyr705)	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti – pNF- κ Bp65 (Ser536)	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - Lamin A/C	WB	Kaninchen	Mensch, Maus	Cell Signaling
Anti - ORC2	WB	Maus	Mensch	Abcam
Rabbit IgG	IP, ChIP	Kaninchen	-	Millipore
Rat IgG2b - APC	FACS	Ratte	-	BioLegend
Anti – HDAC1	IP, WB	Kaninchen	Mensch	Millipore

* WB – Westernblot, IP – Immunopräzipitation, ChIP – Chromatinimmunopräzipitation, IHC – Immunohistochemie, FACS – Durchflusszytometrie

Sekundäre Antikörper für Immunoblot**Tabelle 14: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Ursprungsorganismus	Spezifität	Herkunft/bezogen von
Anti-Mouse IgG*	Schaf	Maus	GE-Healthcare
Anti-Rabbit IgG*	Esel	Kaninchen	GE-Healthcare

* gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (HRP)

2.1.9 Reagenzien und Kits**Tabelle 15: Reagenzien und Kits**

Kit / Reagenz	Hersteller
Attractene Transfection Reagent	Qiagen
CD11b MicroBeads für MACS	Miltenyi Biotec
Einbettmedium für Histologie, DePeX	Serva
HistoGreen	Linaris
Human Macrophage Nukleofector® Kit	Lonza
Human RANTES ELISA Development Kit	PromoKine
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Life Technologies
Lipofectamin™ RNAiMAX Transfection Reagent	Life Technologies
Luciferase Assay System	Promega
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077, Ficoll™	PAA
Mouse CXCL10 ELISA Kit	CellSciences
Mouse RANTES ELISA Development Kit	PromoKine
MycoTrace Kit	PAA
Naive CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec

Kit / Reagenz	Hersteller
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond® Xtra Midi Plus EF Kit	Macherey-Nagel
Omniscript RT Kit	Qiagen
peqGOLD Total RNA Kit	PeqLab
Polybrene®	Abott Laboratories
Protein A Sepharose	VWR
QIAquick®PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific
RNeasy® Midi Kit	Qiagen
RT ² Profiler™ PCR Array System - Mouse Chemokines & Receptors	Qiagen
RT ² First Strand cDNA Kit	Qiagen
Streptavidin-Agarose	Sigma-Aldrich
SYBR® Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems
Transmessenger Transfection Reagent	Qiagen
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories
Western Lightning® Plus-ECL Substrat	PerkinElmer
Western Lightning® Ultra-ECL Substrat	PerkinElmer

2.1.10 Materialien für die Kultur von Zellen

Nährmedien und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen

Tabelle 16: Nährmedien und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine	Invitrogen
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS without Ca ²⁺ & Mg ²⁺ (1 x)	PAA
FBS (Fetal Bovine Serum) Gold	PAA
FBS (Fetal Bovine Serum) Clone	PAA
G418-Sulfat	PAA
Gentamicin (10 mg/ml)	PAA
Hepes buffer solution (1M)	Sigma-Aldrich
Humanes AB-Serum	PAA
L-Glutamine (200 mM), liquid	Invitrogen
Matrigel™, Growth factor reduced	BD Biosciences
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Gibco
OPI-Media supplement (100x)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM® Reduced Serum Medium, no Phenol Red	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich
Puromycin	InvivoGen
Recombinant human CXCL10	Peprtech
Recombinant human CCL5	Peprtech

Produkt	Hersteller
Recombinant human TNF- α	Peprotech
Recombinant human TGF- β 1	Peprotech
Staphylococcal enterotoxin B	Sigma-Aldrich
TGF- β 1 receptor inhibitor SB-431542	Sigma-Aldrich
Trichostatin A	Cell Signaling
Trypsin-EDTA (1 x)	PAA

2.1.11 Biologisches Material

Säugerzellen

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mittels PCR auf eine Kontamination mit Mycoplasmen geprüft (MycoTrace Kit, PAA).

Tabelle 17: Säugerzellen

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungs- medium	Herkunft	Referenz
Capan-1	Pankreaskarzinom, Lebermetastase	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS • 1 mM NaPyruvat • 40 μg/ml Gentamycin 	ATCC	Kyriazis <i>et al.</i> , 1982
S2-007	Pankreaskarzinom, Lebermetastase	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS • 1 mM NaPyruvat • 40 μg/ml Gentamycin 	M. Buchholz, Philipps- Universität Marburg, Deutschland	-

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungs- medium	Herkunft	Referenz
MonoMac6	monozytäre Leukämie	<ul style="list-style-type: none"> • RPMI1640 • 10 % FCS • 2 mM L-Glutamin • 200 U/ml Penicillin • 200 µg/ml Streptomycin 	A. Kaufmann, Philipps- Universität Marburg, Deutschland	Ziegler- Heitbrock <i>et al.</i> , 1988
MonoMac6- mock	MonoMac6; stabil transfiziert mit pQCXIP	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x OPI Media-Supplement • 10 mM Hepes buffer solution 	Selbst hergestellt s. Methoden	
MonoMac6- CUX1	MonoMac6; stabil transfiziert mit pQCXIPp200CUX1	<ul style="list-style-type: none"> • ggf. mit (0,5 µg/ml) Puromycin 	Selbst hergestellt s. Methoden	
HMEC1	human dermal microvascular endothelial cells	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS • 1 mM NaPyruvat • 40 µg/ml Gentamycin 	R. Köhler, Philipps- Universität Marburg, Deutschland	Ades <i>et al.</i> , 1992
LinxA- Hek293	Hek293, stabil transfiziert mit den retroviralen genen gag, pol und env	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS 	Open Biosystems	Hannon <i>et al.</i> , 1999
J774.A1	murine makrophagen- ähnliche Zelllinie	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM • 10 % FCS • 40 µg/ml Gentamycin 	ATCC	Ralph <i>et al.</i> , 1976

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungs- medium	Herkunft	Referenz
THP1	monozytäre Leukämie	<ul style="list-style-type: none"> • RPMI1640 • 2 mM L-Glutamin • 200 U/ml Penicillin • 200 µg/ml Streptomycin • 50 µM 2- Mercaptoethanol 	U. Bauer, Philipps- Universität Marburg, Deutschland	Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980

Mäuse

In dieser Arbeit wurden LSL-*Kras*^{G12D/+}; LSL-*Trp53*^{R172H/+}; *Pdx-1-Cre* Mäuse mit einem gemischten 129/SvJae/ C57Bl/6 Hintergrund verwendet (Hingorani *et al.*, 2005). Die Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung des Fachbereichs Medizin der Philipps Universität Marburg nach den geltenden Richtlinien der Einrichtung gehalten.

2.1.12 Software

Tabelle 18: Software

Programm	Herkunft/bezogen von
Time Lapse Analyser v1.34	Dr. Johannes Huth (Huth <i>et al.</i> , 2010)
Primer Express® Software v3.0	Invitrogen

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im jeweiligen Kulturmedium (s. Tab. 19) kultiviert. Das Ablösen der Zellen zur Passagierung oder für Aussaat erfolgte mittels Trypsin/EDTA. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämatozytometers nach Neubauer bestimmt. Sollte neben der Bestimmung der Zellzahl zugleich ein Überblick über den Anteil lebender Zellen gewonnen werden wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchenden Zellsuspension zunächst mit Trypanblaulösung gemischt.

Trypanblaulösung: • 0,5 % Trypanblau in PBS

2.2.2 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen

Gewinnung von PBMCs aus Buffy-Coats mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation

Die Gewinnung von kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells – PBMC) erfolgte aus von der Blutbank Gießen bezogenen Buffy-Coats gesunder, humaner Spender. Bei einem Buffy-Coat handelt es sich um eine durch Zentrifugation erzeugte Fraktion des Blutes, die, neben einigen Erythrozyten, hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten enthält.

Für die Ficoll-Gradientenzentrifugation wurden 30 ml des Buffy-Coats in 50 ml PP-Röhrchen unter Vermeidung von Vermischung auf 20 ml Ficoll geschichtet. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 800 x g bei abgeschalteter Bremse. Anschließend wurde die sich ergebene Phase aus Leukozyten abgenommen und in 50 ml kaltem PBS aufgenommen. Nach zwei Waschschritten mit je 50 ml kaltem PBS schlossen sich zwei je 5-minütige Inkubationen in Erythrozytenlyselösung jeweils gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation mit 250 x g bei 4 °C an. Das Zellpellet wurde in kaltem PBS resuspendiert und war somit bereit für weitere Bearbeitungsschritte.

Erythrozytenlyselsg.: • 0,15 M NH₄Cl
 • 0,01 M KHCO₃
 • 0,1 mM EDTA

Generierung primärer humaner Makrophagen

Die Isolation primärer humaner Monozyten und deren anschließende Reifung zu Makrophagen erfolgte in Kooperation mit Dipl. Biol. Michael Schipper (AG Renkawitz-Pohl, Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg). Zunächst erfolgte die Gewinnung von PBMCs aus Buffy-Coats mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation (s. o.), der eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) zur Anreicherung der Monozyten folgte (Sanderson *et al.*, 1977). Die Elutriation basiert auf der Etablierung eines Gleichgewichts zwischen Zentrifugalkraft und Flussgeschwindigkeit in der Elutriationskammer einer Zentrifuge. In diesem Gleichgewicht werden die Zellen in der Kammer gehalten und bilden entsprechend ihrer Größe bzw. Masse Zonen verschiedener Zellpopulationen. Durch sukzessive Erhöhung der Pumpleistung bei konstanter Umdrehungszahl verschiebt sich das Gleichgewicht, und die Zellpopulationen werden aus der Kammer gespült und können separat aufgefangen werden.

Für die Elutriation wurden die isolierten PBMCs in die Elutriationskammer eines zuvor sterilisierten und kalibrierten Elutriationsrotors der Zentrifuge J2-21 M/E gepumpt. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen bei konstanter Umdrehungszahl (3000 rpm), aber ansteigender Pumpleistung elutriert. Nach Abschluss der Elutriation wurden die Zellen durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 250 x g bei 4 °C pelletiert und in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Es folgte eine Ermittlung der Reinheit der isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.10).

Die Reifung der isolierten Monozyten zu Makrophagen erfolgte durch 7-tägige Inkubation in unbeschichteten Petrischalen. Hierzu wurden die isolierten Monozyten in RPMI-Medium mit 2 % humanem AB-Serum aufgenommen und 10×10^6 Zellen in 10 ml Medium in eine Petrischale ausgesät. Nach 1 Stunde wurde das Medium von den nun mehrheitlich adhären Zellen abgenommen und durch frisches RPMI mit 5 % humanem AB-Serum ersetzt. Nach fünf Tagen wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches RPMI mit 5 % humanem AB-Serum ersetzt.

Generierung aktivierter humaner CD8⁺-T-Zellen

Für die Isolation naiver CD8⁺-T-Zellen erfolgte zunächst eine Gewinnung von PBMCs aus humanen Buffy-Coats mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation (s. o.). Dem schloss sich die Anreicherung der T-Zellen mittels MACS Cell Separation unter Verwendung des Human Naive CD8⁺ T Cell Isolation Kit nach Angaben des Herstellers an. Dies

beinhaltete eine Depletion von CD45RO⁺-, CD56⁺-, CD57⁺- und CD244⁺-Zellen und eine anschließende Anreicherung von CD8⁺-Zellen. Die isolierten naiven T-Zellen wurden durch 2,5-tägige Inkubation mit 1 µg/ml *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B aktiviert. Die Reinheit der gewonnenen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt (s. 2.2.10).

Isolation von Makrophagen aus Mäuse-Pankreata

LSL-*Kras*^{G12D/+}; LSL-*Trp53*^{R172H/+}; *Pdx-1-Cre* Mäuse wurden im Alter von 4 bis 5 Monaten durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Organe wurden je 2,5 ml Kollagenase-Lösung mit einer 10-ml-Spritze in die Organe injiziert. Anschließend wurde das Organ durch Zerschneiden mit einer sterilen Schere zerkleinert. Nach der Überführung in ein 50-ml-PP-Röhrchen wurden zu den Pankreata weitere 2,5 ml Kollagenase-Lösung gegeben. Pankreata wurden für 20 Minuten, Milzen für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Organstruktur aufzulösen. Anschließend wurden die Organe unter Zuhilfenahme eines Spritzenkolbens durch ein 74 µm- (Milz) bzw. 100 µm-Zellsieb (Pankreas) gepresst und das Sieb anschließend mit 8 ml PBS + 5 % FCS durchspült, um die im Sieb verbliebenen Zellen herauszulösen. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 3 ml Erythrozytenlyselösung resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml PBS wurde die Lyse gestoppt und die Zellen anschließend erneut durch Zentrifugation pelletiert. Im Falle einer unvollständigen Lyse der Erythrozyten, erkennbar durch eine rötliche Färbung der Zellpellets, wurde die Erythrozytenlyse wiederholt. Nach Beendigung der Erythrozytenlyse wurde das Zellpellet in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und nach einer Filterung durch einen MACS-Präseparationsfilter die Anzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Mit der sich ergebenden Zellsuspension wurde nachfolgend eine MACS-Cell Separation mit CD11b-MicroBeads nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Erythrozytenlyselsg.:

- 0,15 M NH₄Cl
- 0,01 M KHCO₃
- 0,1 mM EDTA

Kollagenaselösung:

- 1 mg/ml Kollagenase in PBS

2.2.3 Kokultorexperimente

Kokultur von Makrophagen mit Pankreaskarzinomzellen

Für die Kokultur von Makrophagen mit Pankreaskarzinomzellen wurden je 1×10^5 Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinien Suit2-007 und Capan1 in die Wells einer 6-Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden nach zweimaligem Waschen der Zellen mit RPMI 6-Well-Inserts für Kokultur mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ in die Wells eingesetzt, $1,5 \times 10^5$ MonoMac6 in 2 ml RPMI in diese Inserts ausgesät und weitere Reagenzien nach Bedarf zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Gewinnung von Gesamtzelllysat und darauffolgend die Analyse durch Immunoblot.

Erzeugung von konditioniertem Medium

Für die Erzeugung von durch MonoMac6 konditioniertes Medium wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6-Well-Gewebekulturplatten ausgesät, bei Bedarf transfiziert und für 24 Stunden mit 1 ml RPMI inkubiert. Anschließend wurde das Medium gesammelt und für 10 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert um schwimmende Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen. Der sich ergebene Überstand wurde für weitere Experimente eingesetzt.

Tube Formation Assay

Zunächst wurden Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte mit $50 \mu\text{l}$ BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor-Reduced beschichtet und für 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden $1,2 \times 10^4$ HMEC-1 Zellen in $50 \mu\text{l}$ DMEM mit 10 % FCS auf das erhärtete Gel ausgesät. Nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ konditioniertem Medium bzw. geeigneten Kontrollen wurden die Zellen für 24 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand photographischer Aufnahmen der Wells mit der TimeLapseAnalyzer Software.

T-Zell Migrations-Assay

Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden mit $750 \mu\text{l}$ konditioniertem Medium bzw. geeigneten Kontrollen befüllt. Anschließend wurden 3×10^5 T Zellen in $250 \mu\text{l}$ Medium in

ein zuvor in diese Wells eingesetztes 24-Well-Transwell-Insert mit 3 µm Porengröße eingesetzt und für 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand photographischer Aufnahmen der Wells durch manuelles Auszählen.

2.2.4 Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen

Transfektion von small interfering RNA (siRNA)

Zur Transfektion von siRNA wurde Transmessenger für J774.A1, RNAi-Max für MonoMac6 und Elektroporation mittels Amaxa Nukleofektor II und dem Human Macrophage Nukleofektor® Kit für primäre humane Makrophagen jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet.

Transfektion von DNA-Plasmiden

Für die transiente Transfektion von MonoMac6 mit DNA-Plasmiden wurde Attractene Transfection Reagent nach Angaben des Herstellers verwendet.

Retrovirale Transduktion und Selektion

Die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren tragen das Gen für das retrovirale Verpackungssignal ψ und das Gen für die virale Reverse-Transkriptase/Integrase, aber nicht die zur Virusvermehrung benötigten Gene gag, pol und env. Nach dem Einbringen dieser Plasmide in sogenannte Packaging Zellen, die die Gene gag, pol und env stabil integriert haben, wird vom Vektor transkribierte RNA in Viruspartikel verpackt. Werden Zielzellen mit diesen Viren infiziert, kann die virale RNA durch die Reverse-Transkriptase/Integrase in DNA umgeschrieben und ins Genom integriert werden.

Zur Erzeugung rekombinanter Viren wurden die retroviralen Vektoren pLXSN und pQCXIP und die Packaging Zelllinie Hek293-LinxA verwendet. Für die Generierung der Viren wurden 8×10^5 Hek293-LinxA Zellen in 10 ml DMEM mit 10 % FBS in eine Petrischale ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Transfektion mit dem jeweiligen Plasmid mittels Lipofectamine 2000 nach Angaben des Herstellers. Nach 5-stündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel. Der nach 2-tägiger bzw. 3-tägiger Inkubation erhaltene Überstand enthielt die gewünschten Viruspartikel.

Für die Infektion von MonoMac6 wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 6-Well-Gewebekulturplatte ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel zu 2 ml frischem Kulturmedium und anschließend die Zugabe von 4 ml des zuvor durch einen 0,45 µm Filter gefilterten virenhaltigen Überstandes der Hek293-LinxA Zellen, zusammen mit 8 µg/ml Hexadimethrinbromid. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C und 300 x g in der Standzentrifuge Megafuge 1.0 zentrifugiert und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 4 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel zu frischem Kulturmedium. 24 Stunden nach der ersten Infektion erfolgte eine zweite Infektion mit 72 Stunden altem Überstand.

Frühestens 24 Stunden nach der zweiten Infektion erfolgte der Beginn der Selektion durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums. Die Konzentration wurde so gewählt, dass nicht resistente Zellen innerhalb von 7 - 10 Tagen starben. Für MonoMac6 ergab sich für Puromycin eine Konzentration von 0,5 µg/ml, für G418-Sulfat von 600 µg/ml.

2.2.5 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5 - 1,5%igen TBE-Agarosegelen durch Anlegen einer Spannung von 80 - 120 mV. Die Sichtbarmachung erfolgte durch das Zufügen von Ethidiumbromid. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer.

TBE-Puffer:

- 90 mM TrisBase
- 90 mM Borsäure
- 2 mM EDTA

Kollagenaselsg:

- 0,5 - 1 % Agarose (je nach gewünschter Konzentration)
- in TBE-Puffer

- 10 x Ladebuffer:
- 0,2 % Bromphenolblau
 - 0,2 M EDTA
 - 50 % Glycerin
 - pH 8,0

Quantifizierung von mRNA mittels qRT-PCR

Die Isolation von gesamt RNA erfolgte mit dem peqGOLD-Total-RNA-Kit nach den Angaben des Herstellers. Für die Synthese von cDNA wurde das Omniscript RT Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 0,3 - 1 µg RNA umgeschrieben.

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte unter Verwendung des 7500 Fast Real-Time PCR Systems und des SYBR®Green PCR-Master-Mix. Die verwendeten Primer (Tab. 9) wurden mit Hilfe der Primer Express Software 3.0 entworfen und ihre jeweilige Spezifität mit dem Basic Local Alignment Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) überprüft. Hergestellt wurden die Primer von biomers.net. Die qPCR erfolgte nach folgendem Ansatz (pro Well einer 96-Well-Platte):

- 10 µl SYBR®Green PCR Master Mix (2x)
- 0,2 µl Forward Primer (0,05 pmol)
- 0,2 µl Reverse Primer (0,05 pmol)
- 3,6 µl H₂O
- 6 µl cDNA (1:60 verdünnt)

Die Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta$ -Cycle-Threshold-Methode, wobei die mRNAs des ribosomalen Proteins RPLP0 (NM_001002), GAPDH (NM_002046) bzw., im Falle einer Chromatin-Immunpräzipitation, 1 % Input als Referenz diente.

Mutation der CUX1-Bindestellen in TGL-IP10

Die Generierung des Plasmids TGL-IP10_mu, das im Gegensatz zu dem parentalen Plasmid TGL-IP10 zwei Basenaustausche in der putativen CUX1-Bindestelle von CCAAT nach AAAAT aufweist, wurde das Quik-Change® Site-Directed-Mutagenesis-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die benötigten Primer sind in Tabelle 7

angegeben. Die Gewinnung größerer Mengen mutierter Plasmid-DNA erfolgte durch Vermehrung in *E. coli* DH5 α . Die Bestätigung der erfolgreichen Sequenzveränderung erfolgte durch Sequenzierung der Plasmide mit dem Primer IP10_seq (s. Tab. 6) durch die Firma Seqlab.

2.2.6 Luciferase-Reportergen-Assays

24 Stunden nach der Aussaat von 1×10^5 MonoMac6 in die Wells einer 24-Well-Gewebekulturplatte wurden sie mit entsprechenden, das Firefly-Luciferasegen tragenden Reporterkonstrukten transfiziert. Der Normierung diene die Cotransfektion eines Konstruktes, welches das β -Galaktosidasegen unter Kontrolle des Rous-Sarcoma-Virus(RSV)-Promotors trägt. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Behandlung der Zellen mit einem gewünschten Stimulus. Für die Auswertung wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Lysepuffer pro Well und eine 30-minütige Inkubation auf einem Schüttler lysiert.

Die Detektion der Firefly-Luciferase-Aktivität erfolgte durch Zugabe von 20 μ l Lysat zu 30 μ l Luciferase-Substrat in die Wells einer weißen 96-Well-Gewebekulturplatte. Die Luciferase katalysiert die Umwandlung von D-Luciferin zu Oxyluciferin bei Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 . Hierbei wird Licht einer Wellenlänge von 550 bis 570 nm emittiert. Die Intensität des Lichtsignals ist proportional zur Menge an im Lysat vorhandenen Luciferase-Enzym und kann daher als Maß für die transkriptionelle Aktivität des zu untersuchenden DNA-Abschnitts dienen.

Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte durch die kolorimetrische Erfassung der Umsetzung des farblosen o-Nitrophenyl- β -D-Galactosid (oNPG) zu dem gelblichen Produkt o-Nitrophenol sowie Galactose. Es wurden 20 μ l des Lysates zu 200 μ l Z-Puffer im Well einer 96-Well-Mikrotestplatte gegeben und für 0,5 - 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 420 nm mit einem ELISA Reader photometrisch bestimmt.

Um möglichen Schwankungen durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen Rechnung zu tragen, wurde die Luciferase-Aktivität in Relation zu der β -Galaktosidase-Aktivität gesetzt.

- Na-Phosphat-Puffer:
- 1 M Na-Phosphat
 - pH 7,4

- Z-Puffer:
- 30 mM oNPG
 - 7,5 % Na-Phosphat-Puffer
 - 1 mM MgCl₂
 - 0,4 % β-Mercaptoethanol

2.2.7 Proteinchemische Methoden

Gewinnung von Gesamtzelllysat

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysat wurden die Zellen einmalig mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in einer geeigneten Menge Lysepuffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Oberfläche des jeweiligen Kulturgefäßes abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die nicht löslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 17000 x g und 4 °C in einer Tischkühlzentrifuge pelletiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine und wurde, wenn nötig, bei -20 °C gelagert.

- Lysepuffer:
- 50 mM HEPES pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM EGTA
 - 100 mM NaF
 - 10 mM Na₄P₂O₇
 - 10 % Glycerin
 - 1 % TritonX-100

Jeweils direkt vor der Verwendung wurde der Lysepuffer mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM Na₃VO₄ ergänzt.

Gewinnung von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen

Für die Isolierung von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen wurden die Zellen einmalig mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml kaltem PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Nachfolgend wurden die Zellen durch 3-minütiges Zentrifugieren bei 300 x g und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer A aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellkerne

wurden bei 1000 x g und 4 °C für 20 Minuten pelletiert und der die cytoplasmatischen Proteine enthaltende Überstand in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Diese Fraktion wurde erneut bei 17000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der die cytoplasmatischen Proteine enthaltende Überstand, wenn notwendig, bei -20 °C gelagert. Zur Isolation der nukleären Proteine wurde das aus Zellkernen bestehende Pellet in 150 µl Puffer C aufgenommen und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 17000 x g und 4 °C für 15 Minuten. Der sich ergebende Überstand enthielt die nukleären Proteine und wurde, wenn nötig, bei -20 °C gelagert.

Puffer A:

- 10 mM HEPES pH 7,9
- 10 mM KCl
- 0,1 mM EDTA
- 0,1 mM EGTA
- 1 mM DTT

Puffer C:

- 20 mM HEPES pH 7,9
- 400 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 1 mM DTT

Jeweils direkt vor der Verwendung der Lysepuffer wurden diese mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM Na_3VO_4 ergänzt.

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dieser Test basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G-250 mit basischen Aminosäuren, durch die sich das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde zusätzlich eine Standardreihe mit BSA erstellt.

Immunoblot-Analyse

Die Durchführung der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode nach Laemmli. Verwendet wurde das Mini-Protean-Tetra-System verwendet. Das Trenngel wurde je nach benötigter Konzentration entsprechend angesetzt. Zur Erzeugung einer scharfen und horizontalen Trennkante zwischen Trenn- und Sammelgel wurde das Trenngel im noch nicht polymerisiertem Zustand mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel angesetzt. Zur vollständigen Polymerisation wurde das Gel über Nacht bei 4 °C feucht gelagert. Es wurden 5 - 20 µg Protein pro zu untersuchender Probe mit einer entsprechende Menge 4 x Laemmli-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend in die Taschen eines Polyacrylamidgels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 40 mA.

Trenngel:

	7,5 %	10 %	12 %
H ₂ O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
30 % Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

Sammelgel:

H ₂ O	3 ml
Sammelgelpuffer	1,3 ml
30 % Acrylamid	0,75 ml
10 % SDS	0,05 ml
1 0% APS	0,03 ml
TEMED	0,01 ml

- Trenngelpuffer:
- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- Sammelgelpuffer:
- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
- 4 x Laemmli:
- 0,25 M Tris/HCL pH 6,8
 - 8 % SDS
 - 40 % Glycerol
 - 0,01 % Bromphenolblau
 - 10 % β -Mercaptoethanol
- SDS-Laufpuffer:
- 0,2 M Glycin
 - 0,025 M Tris
 - 0,1 % SDS

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte nach dem „Wet-Blotting“ Verfahren mit dem Mini-Protean-Tetra-System. Die Übertragung erfolgte je nach Größe der zu untersuchenden Proteine für 60 - 120 Minuten bei 400 mA. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in entsprechendem Blockingpuffer bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem jeweiligen primären Antikörper in geeigneter Konzentration im jeweiligen Puffer (s. Tab. 13) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Nach der Beendigung der Primärantikörper-Inkubation und mehrmaligem Waschen mit TBST erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem geeigneten Sekundärantikörper (s. Tab. 14) bei Raumtemperatur in Blockingpuffer. Anschließend erfolgte erneutes Waschen mit TBST. Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung erfolgte mittels ECL-Substrat nach Angaben des Herstellers und dem ChemoCam Imager.

- Transferpuffer:
- 25 mM Tris
 - 200 mM Glycin
 - 20 % Methanol
- TBST:
- 140 mM NaCl
 - 25 mM Tris
 - 1 % Tween[®]20 (v/v)

Blockingpuffer: • 5 % Milchpulver (w/v) bzw. 5 % BSA (w/v) in TBST

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der CCL5- bzw. CXCL10-Konzentrationen in Zellkulturmedien wurden das Human RANTES ELISA Development Kit, das Mouse RANTES ELISA Development Kit und das Mouse CXCL10 ELISA Kit jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet.

DNA-Pulldown

Für den DNA-Pulldown wurden Gesamtzelllysate gewonnen und eine geeignete Proteinmenge zusammen mit 1 ml zuvor mit 1 x Proteaseinhibitor versetztem PBS und 20 µl zuvor aneinander angelagerten dsOligonukleotide über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe von 60 µl Streptavidin-Agarose und eine erneute zweistündige Inkubation unter Rotation bei 4 °C. Durch Zentrifugation in einer Tischkühlzentrifuge wurde die Streptavidin-Agarose zusammen mit den DNA-Protein-Komplexen präzipitiert und 3 mal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Es folgte die Aufnahme in 40 µl 1 x Laemmli-Ladepuffer und eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C. Die so vorbereiteten Proben wurden darauffolgend im Immunoblot analysiert.

STE-Puffer: • 10 mM Tris pH 7,5
 • 1 mM EDTA
 • 150 mM NaCl

Annealing: • 10 µl for Oligo (1 µg/µl)
 • 10 µl rev Oligo (1 µg/µl)
 • in 80 µl STE-Puffer

Programm zum
Annealing: • 5 min 95 °C
 • 10 min 88 °C
 • 10 min 65 °C

Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden Gesamtzell- oder nukleäre Lysate verwendet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden gleiche Proteinmengen je Kondition mit Lysepuffer auf 1 ml Gesamtvolumen angeglichen und 60 µl zuvor zweimal mit PBS gewaschene Protein-A-Sepharose zugegeben. Die sich anschließende zweistündige Inkubation bei 4 °C unter Rotation diente der Entfernung unspezifisch an die Sepharose bindender Proteine. Nachfolgend wurden die Protein-A-Sepharose in einer Tischkühlzentrifuge bei 800 x g pelletiert und das Proteinlysate in ein weiteres 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Das Lysat wurde mit 2 - 3 µg Antikörper über Nacht unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 60 µl, zuvor zweimal mit kaltem PBS gewaschene Protein-A-Sepharose zugegeben und erneut für 2 Stunden bei 4 °C rotiert. Durch dreimaliges Pelletieren, Absaugen des Überstandes und Zugabe von je 1 ml kaltem Lysepuffer erfolgte die Entfernung der nicht an die Beads gebundenen Proteine. Durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C in 40 µl 1x Laemmli-Puffer erfolgte die Vorbereitung der Proben für den Immunoblot.

2.2.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

In dieser Arbeit wurden ChIP mit der murinen Makrophagenzelllinie J774.A1 durchgeführt. Hierzu wurden pro Kondition zwei 10 cm Petrischalen mit je $1,25 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Transfektion von siRNA. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit murinem TNF- α und anschließend die Bearbeitung für die ChIP.

Die kovalente Vernetzung der Proteine mit der DNA erfolgte durch Zugabe von Formaldehyd für eine Endkonzentration von 1 % und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Vernetzung wurde gestoppt durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 0,125 M). Nach der Entfernung des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen unter Verwendung eines Zellschabers in kaltem PBS abgelöst und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Nach Pelletierung der Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 250 x g und 4 °C wurden die Zellen in 3 ml mit Proteaseinhibitor supplementiertem Lysepuffer I pro Kondition resuspendiert. Nach 20-minütiger Lyse der Zellmembran auf Eis erfolgte die Pelletierung der Nuclei durch erneute 5-minütige Zentrifugation bei 250 x g und 4 °C. Anschließend wurden die Zellkerne einer Kondition in je 1 ml mit Proteaseinhibitor supplementiertem Lysepuffer II resuspendiert.

Nach mindestens 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Ultraschallbehandlung (Sonifizierung). Hierfür wurde ein das nukleäre Lysat enthaltendes 15 ml-PP-Röhrchen mit einer Halterung so an der Sonotrode des Sonifikators angeschlossen, dass die Spitze der Sonotrode zu 90 % in die Lösung eingetaucht war. Da bei der Sonifizierung Wärme entsteht, wurden die Proben während der gesamten Behandlung mit einem Gemisch aus Eis und Ethanol gekühlt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Sonifikation:
- 100 Pulse à 1 Sekunde
 - jeweils 2 Sekunden Pause
 - 20 % Amplitude

Anschließend wurde das Lysat in einer Tischkühlzentrifuge bei 17000 x g zentrifugiert, um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen. Von dem sich ergebenden Überstand wurden 50 µl für eine Überprüfung der Sonifizierung abgenommen und über Nacht nach folgendem Protokoll behandelt. Das übrige Chromatin wurde bei 4 °C gelagert.

- Ansatz zur
Kontrolle der
Sonifikation:
- 50 µl sonifiziertes Chromatin
 - 20 µg Proteinase K
 - 20 µg RNase A

Dieser Ansatz wurde für 3 Stunden bei 55 °C und anschließend für wenigstens 8 Stunden bei 65 °C inkubiert. Zur Überprüfung des Sonifizierungsergebnisses wurden 10 µl des Ansatzes auf ein 1 % Agarosegel geladen und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Im Falle einer erfolgreichen Fragmentierung des Chromatins ergaben sich Bruchstücke in einer Größe bis maximal 1 kb. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass ein möglichst homogenes Sonifizierungsergebnis erzielt wurde.

Die verbleibenden 40 µl des revertierten Aliquots wurden für eine Bestimmung der DNA-Konzentration verwendet, mit dem Ziel, gleiche Ausgangsbedingungen für alle Konditionen zu gewährleisten. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte nach

Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick®PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers und einer anschließenden Messung am Spektralphotometer. Pro Kondition wurden jeweils gleiche Chromatinmengen eingesetzt, wenigstens jedoch 80 µg.

Für die weitere Bearbeitung des Chromatins wurde Protein-A-Sepharose benötigt. Diese wurde vor ihrer Verwendung dreimal mit je 10 ml Lysepuffer II gewaschen und unter Rotation im Überkopfschüttler über Nacht bei 4 °C in 15 ml Blockingpuffer inkubiert.

Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, erfolgte eine Vorreinigung des Chromatins. Hierzu wurden dem Chromatin 60 µl der geblockten Beads pro Kondition zugegeben und für 2 Stunden unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren der Beads durch 3-minütige Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C in einer Tischkühlzentrifuge wurde das gereinigte Chromatin in einem geeignetem Volumen Lysepuffer II auf die einzelnen Präzipitationsansätze aufgeteilt. Ein Volumen, entsprechend 1 % des eingesetzten Volumens für die Präzipitationsansätze, wurde für den Input bei 4 °C gelagert. Zu den Präzipitationsansätzen wurden je 3 µg des jeweiligen Antikörpers gegeben. Nach Rotation über Nacht bei 4 °C wurden pro Präzipitationsansatz 60 µl Beads zugegeben und erneut für 2 Stunden bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung nicht gebundenen Materials durch jeweils zweimaliges Waschen mit je 1 ml Waschpuffer I, Waschpuffer II, Waschpuffer III und TE-Puffer, jeweils gefolgt von einer Pelletierung der Präzipitate durch 3-minütige Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C in einer Tischkühlzentrifuge. Der sich jeweils ergebende Überstand wurde unter Verwendung einer Einmal-Injektions-Kanüle 26 G abgesaugt, um versehentliches Absaugen der MicroBeads zu vermeiden.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets und die 1 % Input jeweils in 0,1 ml TE-Puffer supplementiert, mit 30 µg/ml RNase A aufgenommen und für 30 Minuten unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl 10 % SDS und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml). Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Temperatur für eine Über-Nacht-Inkubation auf 65 °C erhöht. Um die nun von den MicroBeads und Proteinen gelösten DNA-Fragmente in der qRT-PCR zu quantifizieren, wurde eine Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick®PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der Menge an Chromatinfragmenten erfolgte durch eine qPCR. Berechnet wurde die jeweilige Menge an DNA relativ zum Input.

- Lyse I:
- 5 mM PIPES pH 8,0
 - 85 mM KCl
 - 0,5 % NP40 (Igepal)

- Lyse II:
- 10 mM TRIS HCl pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 1 % NP40 (Igepal)
 - 1 % Natriumdeoxycholat (DOC)
 - 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
 - 1 mM EDTA

Jeweils direkt vor der Verwendung der Lysepuffer wurden diese mit 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail ergänzt.

- Blockingpuffer:
- Lysepuffer II
 - 1 mg/ml BSA
 - 400 µg/ml Sonicated Salmon Sperm DNA

- Waschpuffer I:
- 20 mM TRIS HCl pH 8,0
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM EDTA
 - 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
 - 1 % Triton X 100

- Waschpuffer II:
- 20 mM TRIS HCL pH 8,0
 - 500 mM NaCl
 - 2 mM EDTA
 - 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
 - 1 % Triton X 100

- Waschpuffer III:
- 10 mM TRIS HCL pH 8,0
 - 1 % NP40 (Igepal)
 - 1 % Natriumdeoxycholat (DOC)
 - 1 mM EDTA

- TE-Puffer:
- 10 mM TRIS HCL pH 8,0
 - 1 mM EDTA

2.2.9 MTT Vitalitäts-Assay

Zur Bestimmung der Zellvitalität bzw. Zellzahl wurden Zellen zu gewünschten Zeitpunkten für 1 Stunde in Nährmedium mit 0,5 mg/ml des Farbstoffes Thiazolylblau inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen in Lyselösung lysiert. Die Messung der Absorption bei 570 nm erfolgte jeweils in Triplikaten.

- Lyselösung:
- 10 % Triton X-100
 - 0,1 M HCl
 - in Isopropanol

2.2.10 Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der Reinheit von Zellpopulationen erfolgte zunächst die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bzw. mit nicht-spezifischen Antikörpern zur Erfassung des Hintergrundsignals (s. Tab. 13). Hierzu wurde eine geeignete Zellzahl durch eine 5-minütige Zentrifugation mit 250 x g bei 4 °C pelletiert und anschließend einmal mit 5 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und die gewünschte Menge an Antikörpern hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C im Dunkeln. Darauf folgte ein weiterer Waschschriff zu Entfernung ungebundener Antikörper. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und waren somit bereit für die Analyse am

Durchflusszytometer. Die Messung erfolgte am BD LSR II der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps-Universität Marburg.

- FACS-Puffer:
- PBS
 - 2 % FCS
 - 2 mM EDTA

2.2.11 Gewebefärbungen

HE-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst durch 2 x 10-minütige Inkubation in Xylol deparaffinisiert und anschließend durch je 3-minütige Inkubationen in wässrigen Lösungen absteigender Ethanolkonzentration (100, 90, 80, 70, 50 und 0 %) rehydriert. Es folgte eine 7-minütige Inkubation in Haematoxylin gefolgt von einem Spülen mit Leitungswasser. Nach 30 Sekunden in einer alkoholischen Eosinlösung wurden die Gewebe in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen in wässriger Lösung (50, 70, 80, 90, 100 %) dehydriert, kurzzeitig in Xylol inkubiert und mit dem DePeX-Einbettmedium für Histologie eingebettet.

Immunohistochemie (IHC)

Verwendet wurden Schnitte humaner Adenokarzinome des Pankreas, zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg. Diese wurden zunächst für 2 x 10 Minuten in Xylol deparaffinisiert, anschließend für 10 Minuten in Ethanol inkubiert und darauffolgend die endogene Peroxidase durch 30-minütige Inkubation in einer 1%igen H₂O₂-Lösung in Methanol deaktiviert. Durch je 5-minütige Inkubationen in wässrigen Lösungen absteigender Ethanolkonzentration (100, 90, 80, 70, 50 und 0 %) erfolgte die Rehydrierung des Gewebes. Die Demaskierung der Epitope wurde erreicht durch 12-minütiges Kochen in Citratpuffer. Die anschließende Inkubation in PBS mit 5 % BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur diente der Reduzierung unspezifischer Bindungen der Antikörpern. Darauf folgte die Über-Nacht-Inkubation mit einem gegen CUX1 gerichteten Primäantikörper, ebenfalls in PBS mit 5 % BSA bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Sichtbarmachung der Antikörperbindung durch Verwendung des Vectastain®ABC Kits nach Angaben des Herstellers. Durch die Inkubation mit dem Substrat

Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), das in einer durch die HRP katalysierten Reaktion mit H_2O_2 einen braunen Farbstoff bildet, erfolgte die Sichtbarmachung der Antikörperbindung. Für eine zusätzliche Färbung von CD68 auf dem selben Gewebeschnitt erfolgte nach Beendigung der ersten Farbreaktion ein erneutes Kochen in Citratpuffer und anschließend das oben beschriebene Verfahren unter Verwendung eines gegen CD68 gerichteten Primärantikörpers und des Substrates HistoGreen, das zu einer grünen Farbreaktion führt.

Nach Beendigung aller Färbungen erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eine Dehydrierung durch Inkubation in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen in wässriger Lösung (0, 50, 70, 80, 90, 100 %), kurzzeitige Inkubation in Xylol und Einbettung mit dem DePeX-Einbettmedium für Histologie.

PBS für IHC:

- 2 mM KH_2PO_4
- 5 mM Na_2HPO_4
- 150 mM NaCl
- pH 7,4

TBS für IHC:

- 150 mM Tris-Base
- 450 mM NaCl
- pH 7,4

Zitratpuffer:

- 10 mM Mononatriumcitrat
- pH 6,0

2.2.12 Statistische Analyse

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Dargestellt ist, sofern nicht anders vermerkt, der Mittelwert und die Standardabweichung. Ein Zweiseitiger ungepaarter Student's t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet. P Werte < 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von CUX1 in tumorassoziierten Makrophagen des Pankreas- karzinoms

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors CUX1 in Pankreaskarzinomgeweben im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe stark erhöht ist und im Verlauf der Tumorentwicklung ansteigt (Ripka *et al.*, 2010, Michl *et al.*, 2005). Basierend auf der Beobachtung, dass die CUX1-Expression nicht auf die Tumorzellen beschränkt ist, sondern auch Zellen des Tumorstromas eine CUX1-Positivität aufweisen wurden immunhistochemische Färbungen zur Bestimmung des Typs der CUX1-exprimierenden Zellen durchgeführt und hierbei insbesondere tumorassoziierte Makrophagen als stromaler Zelltyp mit hoher CUX1-Positivität identifiziert.

Zur Sichtbarmachung von Makrophagen wurden immunhistochemische Färbungen mit einem gegen das von Makrophagen exprimierte Glycoprotein CD68 gerichteten Antikörper durchgeführt. Da bekannt ist, dass CD68 auch von anderen Zellen myeloider Abstammung und ebenfalls von nicht myeloiden Zellen exprimiert wird, wurde ein Antikörper (PG-M1) verwendet, der, im Gegensatz zu anderen Antikörpern, nur mit einem fixierungsresistenten Epitop einer auf Makrophagen beschränkten Isoform von CD68 reagiert (Kunz-Schughart *et al.*, 2003; Heinemann *et al.*, 2000; Falini *et al.*, 1993; Kunisch *et al.*, 2004).

Um die CUX1-Expression in tumorassoziierten Makrophagen zu untersuchen, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen an humanen Pankreaskarzinomgeweben durchgeführt. Alle 10 untersuchten humanen Karzinomgewebe zeigten eine starke Infiltration mit CD68⁺ Makrophagen in den stromalen Arealen. Durch eine auf die CD68-Färbung folgende zweite Färbung mit einem gegen CUX1 gerichteten Antikörper konnte die Expression von CUX1 in Makrophagen sichtbar gemacht werden. Exemplarisch ist das Ergebnis einer solchen Doppelfärbung in Abbildung 5A dargestellt. Die Doppelfärbungen zeigten, neben einer starken cytoplasmatischen und nukleären Präsenz in den Tumorzellen (Abb. 4A, roter Pfeil), deutliche nukleäre CUX1-Signale in einem von Gewebe zu Gewebe schwankenden Anteil CD68-positiver Makrophagen. Die Quantifizierung der CUX1-Färbung in CD68⁺ Makrophagen in den Tumorschnitten ergab einen Anteil von CUX1⁺/CD68⁺-Zellen zwischen 10 und 60 % (Abb. 4B).

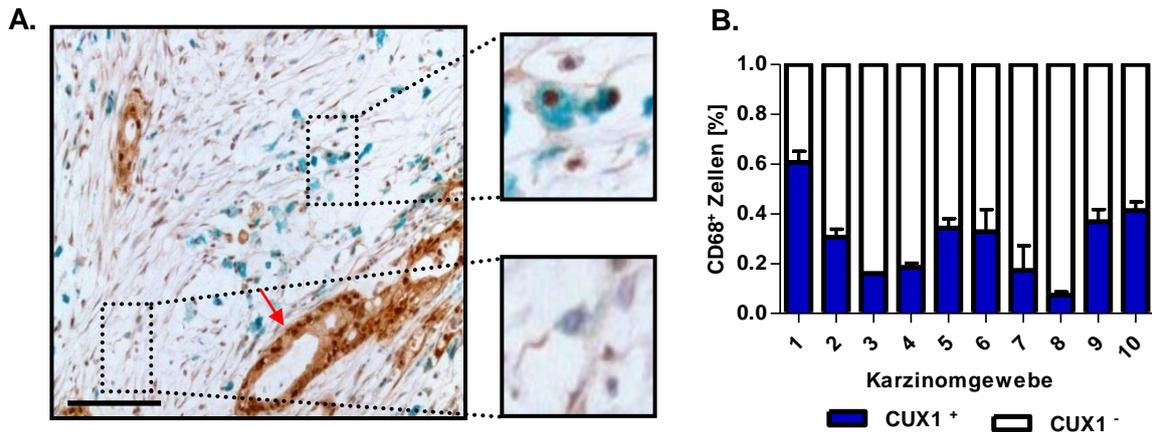


Abbildung 4: CUX1 wird von einem Teil der tumorassoziierten Makrophagen des humanen Pankreaskarzinoms exprimiert. A) Immunohistochemische Doppelfärbung mit einem gegen CD68 (blaugrün) und einem gegen CUX1 (braun) gerichteten Antikörper an einem repräsentativen Gewebeschnitt eines humanen Pankreaskarzinoms. Der rote Pfeil markiert die in dukталen Strukturen angeordneten Tumorzellen. Balken entspricht 100 µm **B)** Auszählung von CUX1⁺/CD68⁺- und CUX1⁻/CD68⁺-Zellen an zehn unabhängigen Karzinomgeweben. Es wurden pro Gewebe mind. 3 separate Schnitte mit jeweils mindestens 5 Sichtfeldern ausgewertet.

Um die CUX1-Expression in Makrophagen vergleichend zwischen malignem und nicht malignem Pankreasgewebe zu untersuchen wurde ein genetisches Mausmodell des Pankreaskarzinoms (*LSL-Kras*^{G12D/+}; *LSL-Trp53*^{R172H/+}; *Pdx-1-Cre*) verwendet. Diese Tiere weisen eine pankreasspezifische Expression von onkogenem Kras und dominant-negativem Trp53 auf und entwickeln mit einer Penetranz von nahezu 100 % innerhalb eines Jahres Pankreaskarzinome, die eine sehr große Ähnlichkeit zur humanen Krankheit aufweisen (Hingorani *et al.*, 2005).

Unter Verwendung des MACS Cell Separation Systems wurden CD11b⁺-Zellen aus Pankreata von 4 - 5 Monate alten Tieren isoliert. In diesem Alter zeigen bereits einige der Tiere fortgeschrittene Tumore während andere ein noch annähernd unverändertes Pankreasgewebe mit wenigen PanIN-Läsionen aufweisen. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels FACS überprüft und lag stets bei über 90 % (s. Anhang Abb. 28). Aus den isolierten Zellen wurde RNA gewonnen und die Menge an CUX1 mRNA relativ zu GAPDH mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 5A). Darüber hinaus wurden die Pankreata sowohl makroskopisch als auch histologisch auf Anzeichen eines Tumors untersucht (Abb. 5B).

Die Analyse von 3 nicht malignen und 6 malignen Pankreata zeigte einen tendenziellen Anstieg der CUX1-mRNA in aus Karzinomgewebe isolierten CD11b⁺-Makrophagen

gegenüber den aus nicht malignem Pankreasgewebe isolierten Zellen, wenngleich dieser Trend aufgrund der geringen Fallzahl von nicht malignen Pankreata keine Signifikanz erreichte (Abb. 5A). Dieser Befund lässt die Vermutung zu, dass die CUX1-Expression auch in Makrophagen im Verlauf der Tumorentwicklung zunimmt.

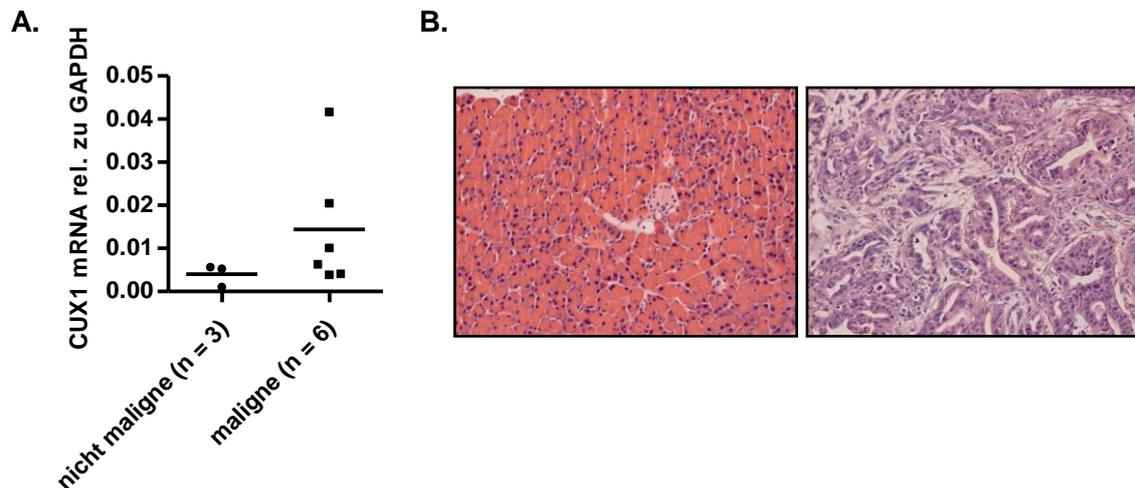


Abbildung 5: CUX1 mRNA ist in CD11b⁺-Makrophagen aus invasiven Pankreakarzinomen gegenüber denen Pankreata ohne invasive Tumore erhöht. A) QRT-PCR-Analyse der CUX1-mRNA von aus Pankreata von LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre Mäusen mit und ohne invasive Tumore isolierten CD11b⁺-Zellen. **B)** HE-Färbung von zwei der entnommenen Pankreata (nicht malignes Pankreas (links), Pankreaskarzinom (rechts)).

3.2 Die Expression von CUX1 in Makrophagen wird durch TGF- β 1 stimuliert

Um die gesteigerte CUX1-Expression in Makrophagen des Pankreaskarzinoms detaillierter zu beleuchten, wurden Untersuchungen zur Regulation der CUX1-Expression in Makrophagen durchgeführt. Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signalwege sind sowohl als wichtige Mediatoren der Tumorprogression wie auch als bedeutend in der Immunregulation bekannt (Friess *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde TGF- β 1 als Stimulator der CUX1-Expression in mehreren Zelltypen beschrieben (Michl *et al.*, 2005; Fragiadaki *et al.*, 2011; De Vos *et al.*, 2002). Daher wurde untersucht, ob TGF- β 1 ebenfalls einen Einfluss auf die CUX1-Expression in Makrophagen hat.

Um die Auswirkungen von TGF- β auf CUX1 in Makrophagen zu untersuchen wurden murine und humane monozytäre Zelllinien sowie primäre humane Makrophagen mit

rekombinantes TGF- β 1 stimuliert und die CUX1-mRNA- und Proteinmengen nach 24-stündiger Inkubation analysiert.

Die Stimulation sowohl von primären humanen Makrophagen wie auch von murinen und humanen monozytären Zelllinien mit rekombinantes TGF- β 1 führte zu einem Anstieg sowohl der CUX1-mRNA (Abb. 6B) als auch des CUX1-Proteins (Abb. 6A).

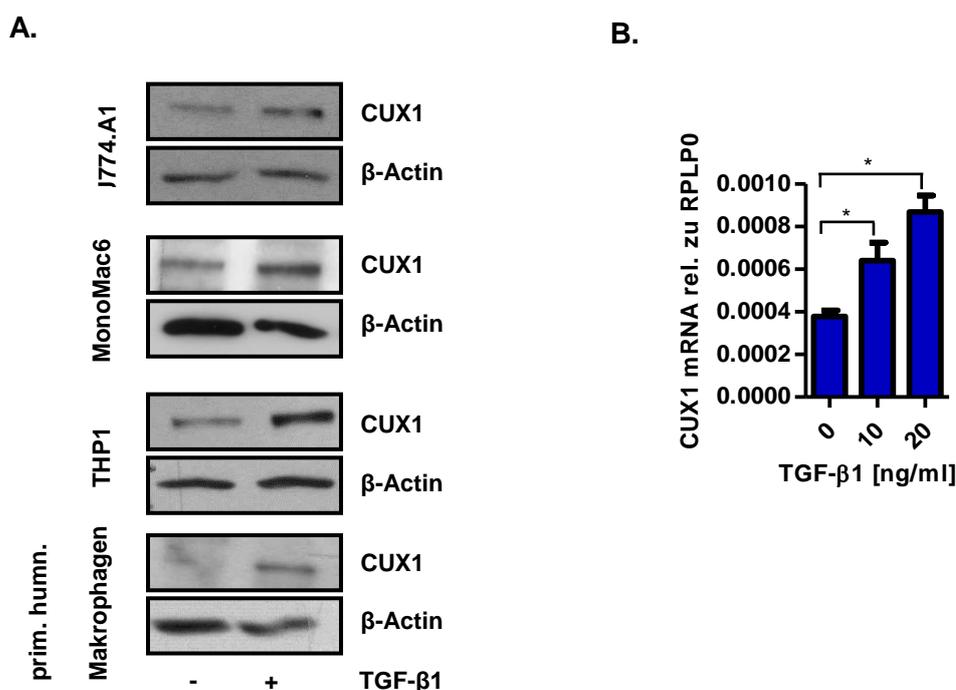


Abbildung 6: CUX1-Protein und -mRNA in monozytären Zellen werden durch Stimulation mit TGF- β 1 erhöht. **A)** Immunoblot Analyse von CUX1 in monozytären Zelllinien und primären humanen Makrophagen nach 24-stündiger Behandlung mit rekombinantes murin bzw. humanem TGF- β 1 (10 ng/ml). **B)** QRT-PCR-Analyse der CUX1-mRNA-Expression in MonoMac6-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit rek. TGF- β 1.

TGF- β wird von zahlreichen Zelltypen innerhalb des Mikromilieus eines Pankreaskarzinoms sezerniert. Als bedeutende Quelle für TGF- β gelten die Tumorzellen selbst (Friess *et al.*, 1993). Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zeigten eine deutliche TGF- β -Expression (s. Anhang Abb. 32). Um die Wirkung von Pankreaskarzinomzellen auf die CUX1-Expression in Makrophagen und insbesondere die Rolle des von den Tumorzellen sezernierten TGF- β zu untersuchen, wurden Kokultorexperimente durchgeführt. Hierfür wurden die monozytäre Zelllinie MonoMac6 gemeinsam mit den humanen Pankreastumorzelllinien Capan-1 und Suit2-007 in einer modifizierten Boydenkammer für 24 Stunden kultiviert.

Anschließend wurde die Menge an CUX1-Protein in den MonoMac6 mittels Immunoblot analysiert.

Die Kultivierung von MonoMac6 mit den Pankreaskarzinom-Zelllinien führte, ebenso wie die Zugabe von rekombinantem TGF- β 1, zu einem Anstieg des CUX1-Proteins in MonoMac6 Zellen. Dieser Anstieg konnte in allen Fällen durch die Zugabe des TGF- β Rezeptor I Inhibitors SB-431542 aufgehoben werden (Abb. 7A). Dieses Resultat deutet auf eine Interaktion zwischen Tumorzelle und Makrophagen mit Beteiligung des TGF- β Signalwegs in der Regulation von CUX1 in Makrophagen hin.

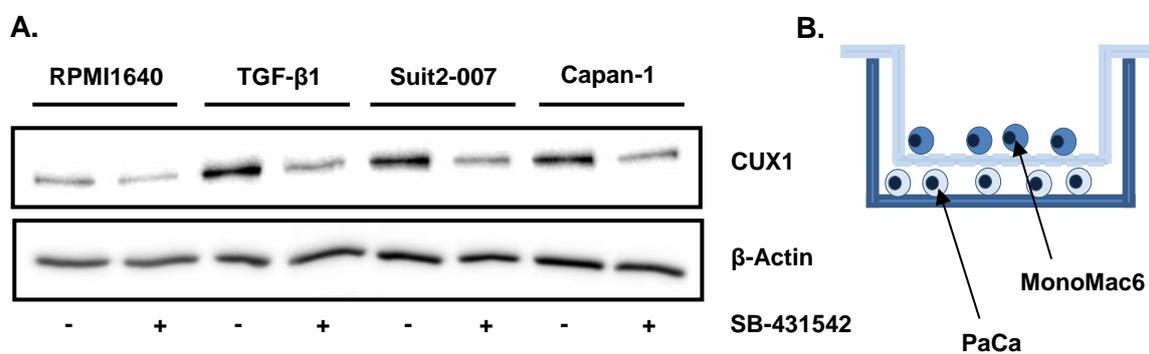


Abbildung 7: Die Co-Kultivierung von Pankreaskarzinomzellen und monozytären Zellen führt zu erhöhten CUX1-Levels in den monozytären Zellen. A) Immunoblot-Analyse der CUX1-Expression in MonoMac6-Zellen nach 24stündiger gemeinsamer Kultivierung mit den Pankreaskarzinomzelllinien Suit2-007 bzw. Capan1 und Zugabe des TGF- β Rezeptor I Inhibitors SB-431542. Als Negativkontrolle wurde reines RPMI-Medium verwendet; als Positivkontrolle dienten 30 ng/ml rekombinantes TGF- β 1 **B)** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

3.3 CUX1 beeinflusst die Zytokinexpression in Makrophagen

Basierend auf den immunohistochemischen Expressionsdaten stellt sich die Frage, ob die CUX1-Expression in tumorassoziierten Makrophagen (TAM) des Pankreaskarzinoms einen funktionellen Effekt bei der Tumorprogression ausübt. Makrophagen beeinflussen das umliegende Tumorgewebe in erster Linie durch die Produktion von sezernierten Faktoren wie u. a. Zytokinen. Da CUX1 bereits als Modulator der Zytokinexpression in Melanomzellen beschrieben wurde, sollte im Folgenden der Einfluss von CUX1 auf die Zytokinexpression in Makrophagen untersucht werden (Ueda *et al.*, 2007).

Zu diesem Zweck wurde die CUX1-Expression in der Makrophagenzelllinie J774.A1 mittels siRNA-Transfektion moduliert (s. Anhang Abb. 29) und die mRNA-Expression von 84 Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren durch einen QRT-PCR Profiler analysiert.

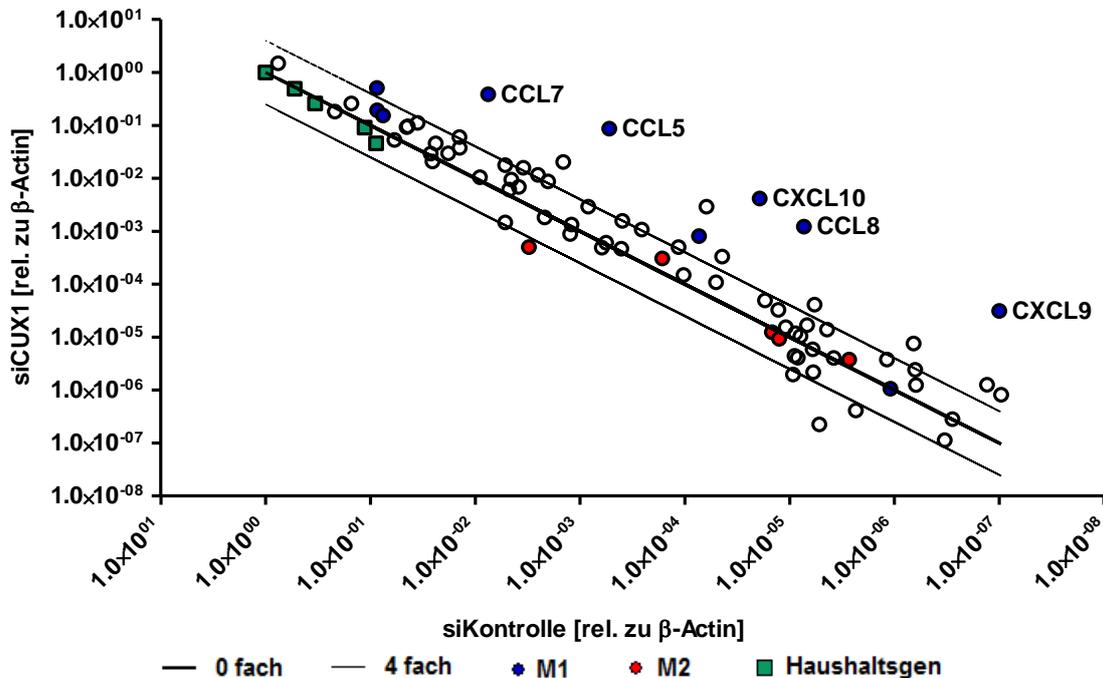


Abbildung 8: CUX1 beeinflusst die mRNA-Level M1-assoziiierter Zytokine. QRT-PCR Profiler Analyse der mRNA-Level einiger mit Inflammation in Verbindung stehender Gene in mit CUX1-siRNA und mit Kontroll siRNA transfizierten J774.A1. Gegeneinander aufgetragen ist die jeweilige mRNA-Menge relativ zu β -Actin. Blau dargestellt sind Gene die mit dem M1-Phänotyp, rot solche die mit dem M2-Phänotyp von Makrophagen in Verbindung gebracht werden (Martinez *et al.*, 2006, Mantovani *et al.*, 2004). Kontrollgene („housekeeping genes“) sind grün markiert.

Es zeigte sich eine signifikanter Anstieg der mRNA-Level einiger M1-assoziiierter Gene wie z. B. CCL7, CCL5, CCL8 und CXCL10 nach Herunterregulation von CUX1 mit siRNA im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen. Gene die mit dem M2-Phänotyp von Makrophagen in Verbindung gebracht werden wie IL-10, CCL22, CCL24, CCL1 oder CCL17 sowie die Haushaltsgene β -Actin, GAPDH, HPRT1, Hsp90 und Gusb waren im Wesentlichen nicht beeinflusst durch die Depletion von CUX1 (Abb. 8). Somit ist aus den Expressionsprofilaten zu postulieren, dass CUX1 M1-assoziierte Chemokine transkriptionell reprimieren kann.

3.3.1 Regulation von CCL5 und CXCL10 durch CUX1

Exemplarisch wurden zwei der durch CUX1 beeinflussten Zytokine, CCL5 und CXCL10, ausgewählt, um die einer CUX1-abhängigen Regulation zugrunde liegenden Mechanismen detaillierter zu untersuchen.

Hierzu wurden in einem ersten Schritt die Ergebnisse des Profiler durch Analyse der mRNA-Level mittels qRT-PCR und durch Untersuchung der Proteinexpression bzw. Sekretion mittels ELISA in J774.A1-Zellen nach Modulation von CUX1 mittels siRNA überprüft (Abb. 9). Die Effizienz der Herunterregulation von CUX1 wurde mittels qRT-PCR überprüft (s. Anhang Abb. 32).

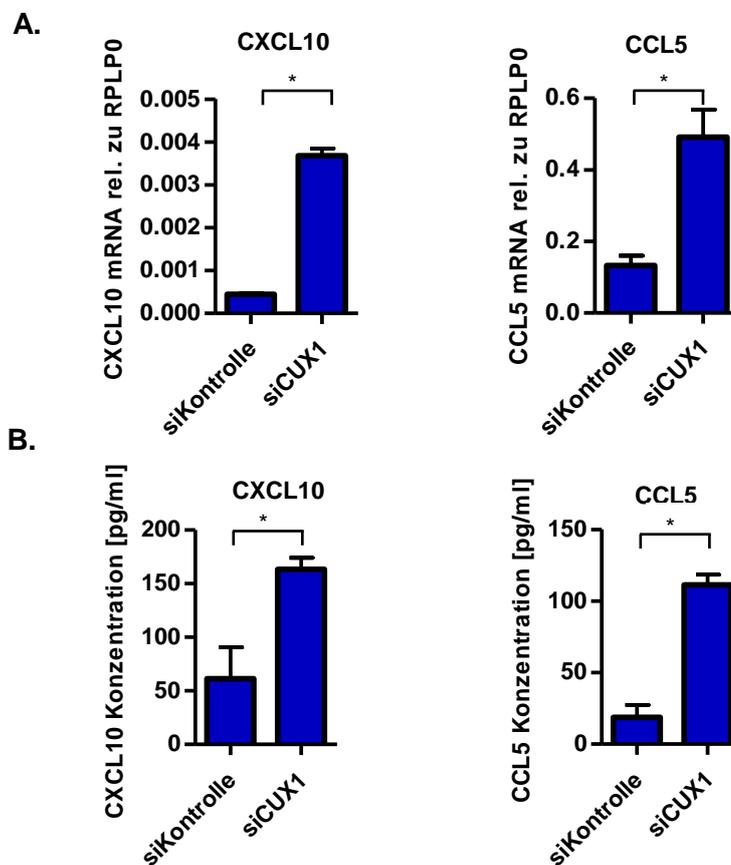


Abbildung 9: CUX1 moduliert die mRNA und Proteinexpression von CCL5 und CXCL10 in J774.A1 Zellen. Die Expression von CUX1 in J774.A1-Zellen wurde durch Transfektion von siRNA herunterreguliert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die mRNA-Expression mittels **A)** qRT-PCR-Analyse und die sezernierte Proteinmenge mittels **B)** ELISA ermittelt.

Um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf weitere Zellsysteme zu bestätigen, wurde die Regulation von CCL5 und CXCL10 in weiteren monozytären Zellen untersucht. Hierfür wurden die murine Zelllinie RAW264 und die humane Zelllinie MonoMac6 sowie primäre humane Makrophagen mit siRNA transfiziert und mRNA-

Expression mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 10). Die Effizienz der Herunterregulation von CUX1 wurde mittels qRT-PCR überprüft (s. Anhang Abb. 32).

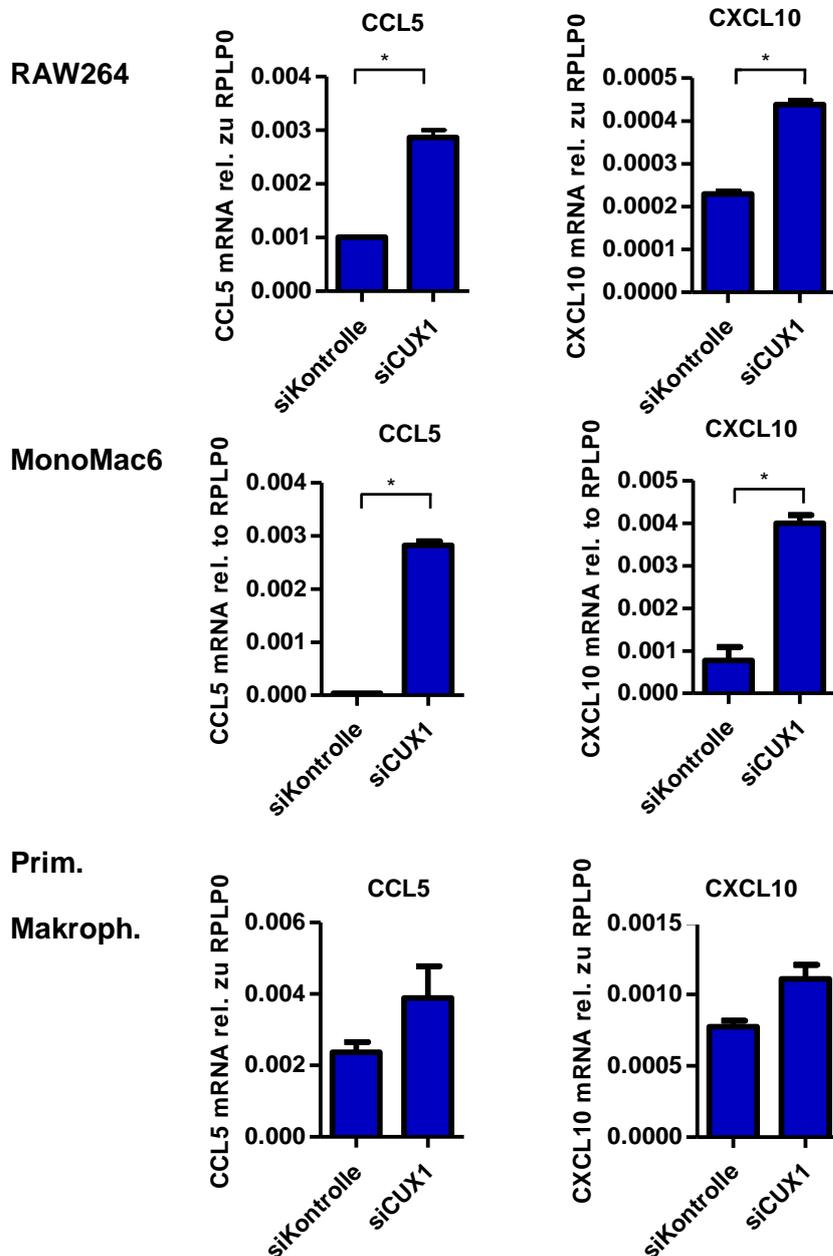


Abbildung 10: CUX1 moduliert die mRNA und Proteinexpression von CCL5 und CXCL10 in RAW264- und MonoMac6-Zellen sowie primären humanen Makrophagen. RAW264, MonoMac6 und J774.A1 wurden jeweils mit siRNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion die Expression von CCL5 und CXCL10 mittels qRT-PCR analysiert.

Es ist bekannt, dass Makrophagen Rezeptoren für doppelsträngige RNA besitzen und auf diese mit Zytokinexpression reagieren (Zhou *et al.*, 2013). Um daher mögliche unspezifische Effekte durch siRNA-Transfektion auszuschließen und die Regulation durch CUX1 weiter zu untersuchen, wurden mittels retroviraler Transduktion stabil

CUX1p200 überexprimierende MonoMac6 (MM6^{CUX1}) und entsprechende Leervektor-Kontrollen (MM6^{Mock}) generiert (s. Anhang Abb. 30). In diesen Zellen wurde die Expression von CCL5 und CXCL10 mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 11). Ausgehend von der Annahme einer Repression der proinflammatorischen M1-Zytokine durch CUX1, wurde die Zytokinexpression durch Behandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α stimuliert.

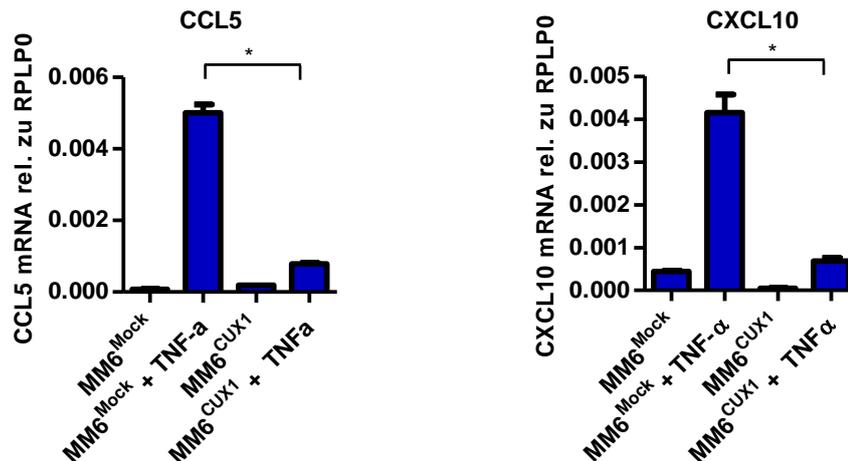


Abbildung 11: Überexpression von CUX1 reprimiert die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von CCL5 und CXCL10 in MonoMac6-Zellen. QRT-PCR-Analyse der CCL5 und CXCL10 mRNA-Level in MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock} nach 4-stündiger Behandlung +/- 20 ng/ml TNF- α .

Im Gegensatz zu der durch CUX1 unbeeinflussten basalen mRNA-Expression zeigte sich, sowohl für CCL5 als auch für CXCL10, eine signifikante Reduktion der TNF- α -induzierte Expression in MonoMac6^{CUX1} Zellen (Abb. 11). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese einer Funktion von CUX1 als transkriptioneller Repressor der Expression dieser Zytokine.

3.3.2 CUX1 reguliert CCL5 und CXCL10 auf transkriptioneller Ebene

Die beobachtete Regulation der mRNA- und Proteinexpression in Makrophagen durch CUX1 könnte auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Denkbar wären eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität oder eine Regulation der Transkription dieser Gene.

Für eine weitere Charakterisierung der Zytokinregulation durch CUX1 wurden die Auswirkungen von CUX1 auf die Promotoraktivität dieser Zytokine untersucht. Hierfür wurden Reporter-Assays mit humanen CCL5 und CXCL10 Promotorfragmenten in stabil CUX1 überexprimierenden MonoMac6 durchgeführt (Abb. 12).

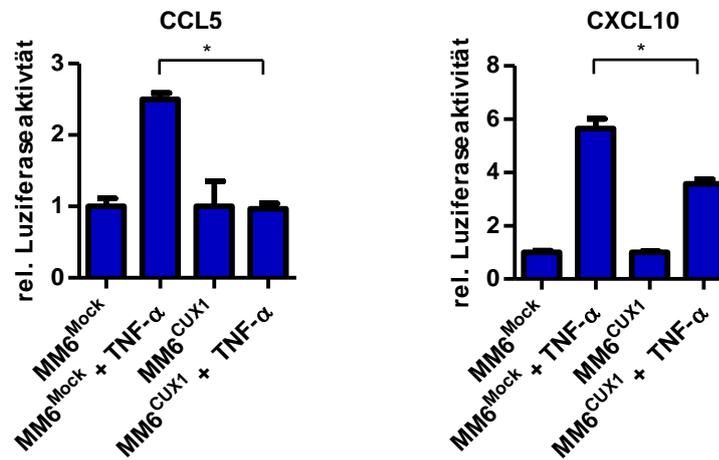


Abbildung 12: CUX1 inhibiert die Aktivität des CCL5- und des CXCL10-Promotors. Reporter-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivität in MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock}. Die Konstrukte enthielten das -974/+55 Fragment des humanen CCL5- bzw. das -525/+97 Fragment des humanen CXCL10-Promotors. Zur Stimulation der Promotoraktivität wurde für 4 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α behandelt. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität normalisiert mit der jeweiligen β -Galaktosidase Aktivität.

Sowohl für das CCL5 wie auch für das CXCL10 Reporterkonstrukt zeigte sich eine Repression der TNF- α -induzierten Promotoraktivität in MonoMac6^{CUX1} im Vergleich zu kontrolltransfizierten MonoMac6^{Mock}-Zellen. Dies bestärkt die Hypothese der transkriptionellen Repression der Zytokin-Transkription durch CUX1 auf Promotorebene.

3.3.3 CUX1 reprimiert Transkription durch direkte Promotor-Interaktion

Der reprimierende Wirkung von CUX1 auf die Promotoraktivität von CCL5 und CXCL10 könnte auf einer direkten Bindung von CUX1 an die jeweiligen Promotoren oder auf einer indirekten Beeinflussung durch Regulation der Expression bzw. der transkriptionellen Aktivität von weiteren an der Zytokinexpression beteiligten Faktoren basieren.

Daher wurde eine Analyse der Expressionslevel einiger für die Zytokinexpression und Makrophagenpolarisierung relevanter Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Hierzu wurden Proteinlysate von MonoMac6^{CUX1}- und MonoMac6^{Mock}-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNF- α Zugabe gesammelt und einer Immunoblot-Analyse unterzogen (Abb. 13).

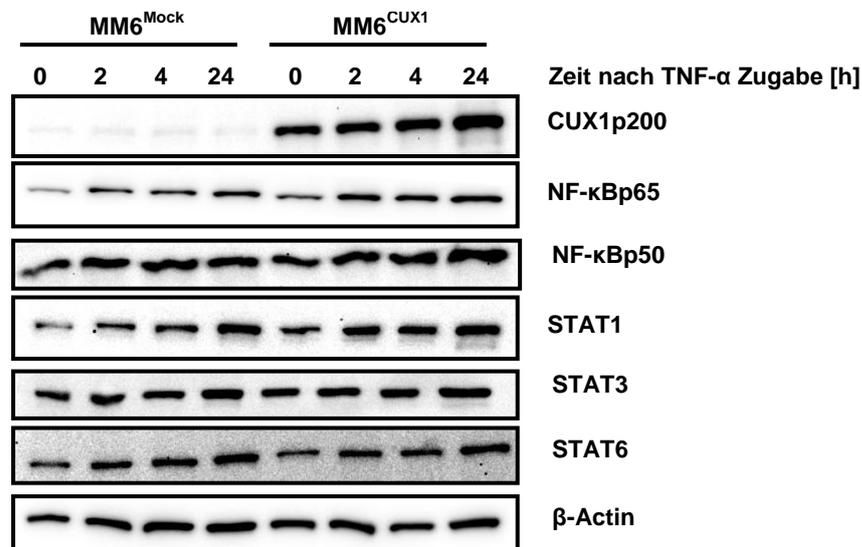


Abbildung 13: Die Expression von STATs und NF- κ Bs in MonoMac6 ist unbeeinflusst durch eine Überexpression von CUX1. Immunoblot-Analyse der Expression verschiedener an der Zytokinexpression beteiligter Transkriptionsfaktoren nach Zugabe von 20 ng/ml TNF- α .

Es konnte kein eindeutiger Effekt von CUX1 auf die Expression der hier untersuchten STAT- bzw. NF- κ B-Transkriptionsfaktoren festgestellt werden.

Sowohl für die Aktivität STAT-abhängiger Signalwege wie auch für den kanonischen NF- κ B Signalweg ist die subzelluläre Lokalisation ein wesentlicher Bestandteil der Aktivitätsregulation. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von STATs und NF- κ Bp50 bzw. NF- κ Bp65 nach TNF- α -Behandlung in Abhängigkeit von der CUX1-

Expression untersucht. Hierzu wurden nukleäre und zytoplasmatische Proteinfraktionen von MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock} erstellt und einer Immunblot-Analyse unterzogen (Abb. 14).

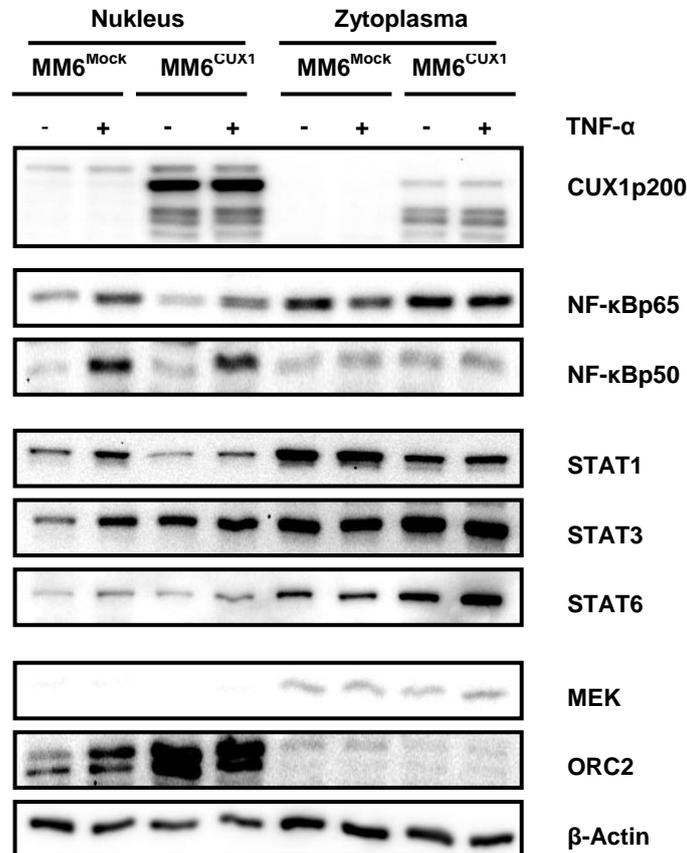


Abbildung 14: Die Lokalisation von STATs und NF-κBs ist unbeeinflusst von CUX1. Immunoblot-Analyse der Lokalisation verschiedener an der Zytokinexpression beteiligter Transkriptionsfaktoren 4 Stunden nach Zugabe von 20 ng/ml TNF-α.

Es zeigten sich keine eindeutigen CUX1-abhängigen Lokalisations-Unterschiede anderer Transkriptionsfaktoren, welche die Beeinflussung der Zytokinexpression durch CUX1 erklären könnten. Aufgrund dieser Befunde kann postuliert werden, dass CUX1 keine indirekten Effekte auf weitere transkriptionelle Effektoren ausübt, sondern als DNA-bindendes Protein die Promotoraktivität dieser Zytokine durch direkte Interaktion mit den jeweiligen Promotoren beeinflusst. Um eine mögliche Bindung von CUX1 zu untersuchen, wurden zunächst die Promotoren auf putative CUX1-Bindestellen hin untersucht (Abb. 15).

CXCL10

-182

GCAGAGGGAAATTCCGTAACCTTGGAGGCTACAATAAATAATACCTTCGAGTCTGC
AACATGGGACTTCCCAGGAACAGCCAGCAGGTTTTGCTAAGTCAACTGTAATGC
CCTTATCCAATCAGAATTAGGGAGGGAAAATGGC

-38

CCL5

-258

CTAATCAATTATTCCACTTTATAAACAAGGAAATAGAACTCAAAGACATTAAGCACT
TTTCCCAAAGGTCGCTTAGCAAGTAAATGGGAGAGACCCTATGACCAGGATGAAA
GCAAGAAATTCCCACAAGAGGACTCATTCCAATCATATCTTGTGAAAAGGTTCC
AATGCCC

-109

Abbildung 15: Putative CUX1-Bindestellen in enger Nachbarschaft zu Bindestellen für NF- κ B in den humanen Promotoren von CCL5 und CXCL10. Gezeigt sind die Sequenzen -182 bis -38 des humanen CXCL10 bzw. -258 bis -109 des humanen CCL5 Promotors relativ zum Transkriptionsstart. Rot markiert sind Bindestellen für NF- κ B, grün putative Bindestellen für das CUX1-Protein.

Sowohl der humane CXCL10 als auch der humane CCL5-Promotor weisen putative CUX1-Bindestellen benachbart zu Bindestellen für NF- κ B auf. Um eine mögliche direkte Bindung von CUX1 an diese putativen CUX1-Bindestellen zu untersuchen, wurden diese Sequenzen in dem bereits zuvor verwendeten CXCL10-Reporterkonstrukt durch ortsgerichtete Mutagenese verändert. Mit beiden Reporter-Konstrukten wurden Reporter-Assays in stabil CUX1 überexprimierenden MonoMac6 durchgeführt (Abb. 16).

Durch den Basenaustausch in einer der zwei putativen CUX1-Bindestellen im CXCL10-Reporterkonstrukt wurde die Repression durch CUX1 zum Teil aufgehoben. Dies deutet auf eine mögliche Bindung von CUX1 an diese Sequenzen hin.

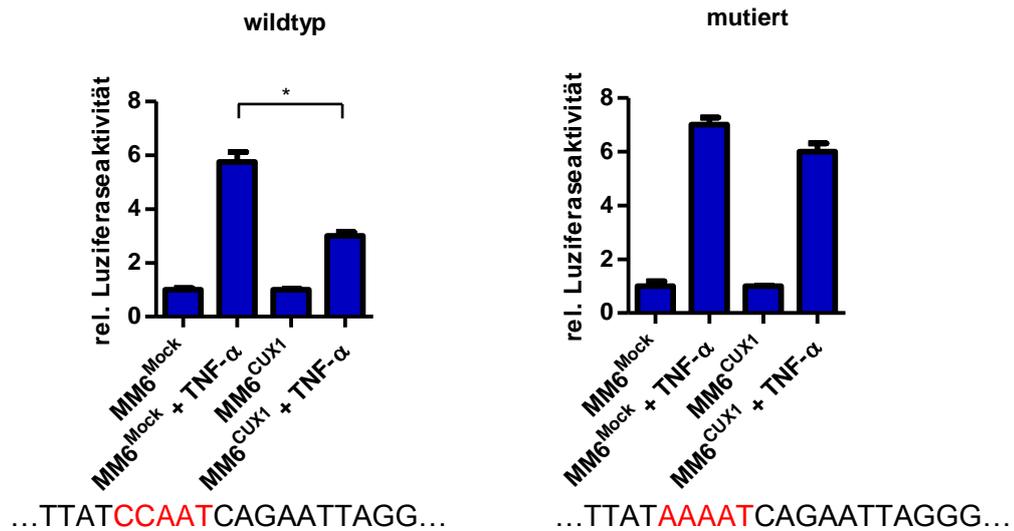


Abbildung 16: Mutation der CUX1-Bindesequenzen im CXCL10-Reporterkonstrukt hebt die Repression durch CUX1 teilweise auf. Reporter-Assays zur Bestimmung der Promotoraktivität in MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock}. Die verwendeten Konstrukte enthielten das -525/+97 Fragment des humanen CXCL10 mit der WT-Sequenz (links) bzw. mit einer mutierten CUX1-Bindestelle (rechts). Zur Stimulation der Promotoraktivität wurde für 4 Stunden mit 20 ng/ml TNF- α behandelt. Dargestellt ist die relative Luziferaseaktivität normalisiert mit der jeweiligen β -Galaktosidase-Aktivität.

Zur Klärung der Frage, ob CUX1 potenziell in der Lage ist, an die Promotoren von CXCL10 und CCL5 zu binden, wurden DNA-Pulldown-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden dsOligonukleotide, die Sequenzen aus den jeweiligen Promotoren aufweisen, mit Zelllysaten von MM6^{CUX1} inkubiert und anschließend präzipitiert. Zum Nachweis der gebundenen Proteine wurde eine Immunblot durchgeführt (Abb. 17).

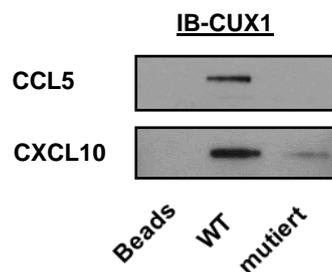


Abbildung 17: CUX1 bindet *in vitro* an die Sequenzen der Promotoren von CCL5 und CXCL10. DNA-Pulldown-Assay mit DNA-Sequenzen des CCL5- und des CXCL10-Promotors. Es wurden jeweils die Wildtyp-Sequenzen (WT) und solche mit mutierter putativer CUX1-Bindestelle verwendet. Die Auswertung erfolgte durch Immunoblot der Präzipitate mit einem gegen CUX1 gerichteten Antikörper.

Es zeigte sich, dass CUX1 *in vitro* in der Lage ist an die Promotorsequenzen von CXCL10 und CCL5 zu binden. Darüber hinaus zeigte, dass eine Mutation der CUX1-

Bindestelle eine Reduktion der Bindung verursacht, sodass zu vermuten ist, dass die CUX1-Bindung sequenzspezifisch ist.

3.4 CUX1 beeinflusst die DNA-Bindung von NF- κ Bp65

Die Beeinflussung der Expression NF- κ B-abhängiger Zytokine und die enge Nachbarschaft der CUX1-Bindestellen zu NF- κ B-Bindestellen lassen die Vermutung zu, dass CUX1 mit NF- κ B an Zytokinpromotoren interagiert.

Um die Auswirkungen von CUX1 auf die DNA-Bindung von NF- κ B zu analysieren wurde im Weiteren der Promotor von CXCL10 untersucht. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Oligonukleotide mit Sequenzen des CXCL10 Promotors entworfen, welche jeweils eine NF- κ B- und eine benachbarte CUX1-Bindestelle enthielten. Mit diesen Oligonukleotiden wurden DNA-Pulldown-Assays mit Proteinlysaten von MonoMac6^{Mock} und MonoMac6^{CUX1} durchgeführt (Abb. 18).

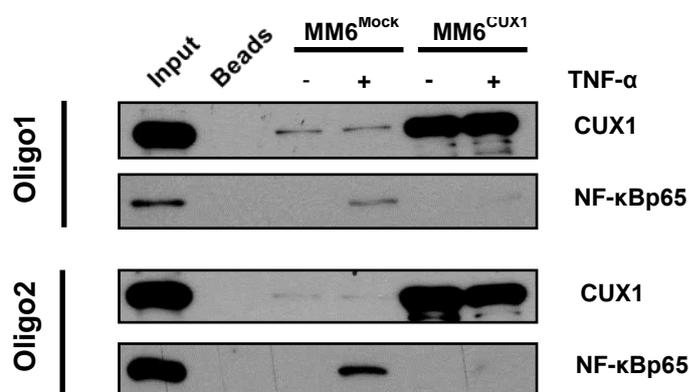


Abbildung 18: CUX1 reduziert die DNA-Bindung von NF- κ Bp65 an den CXCL10-Promotor *in vitro*. DNA-Pulldown Assay mit zwei verschiedenen Oligonukletiden, welche Sequenzen aus dem CXCL10- Promotor jeweils mit benachbarten CUX1- und NF- κ B-Bindungsstelle beinhalten. Die Auswertung erfolgte durch Immunoblot der Präzipitate mit einem gegen CUX1 und einem gegen NF- κ Bp65 gerichteten Antikörper.

Es zeigte sich für beide Sequenzabschnitte jeweils eine Reduktion der TNF- α -induzierten DNA-Bindung von NF- κ Bp65 in den Lysaten der CUX1-überexprimierenden Zellen. Dies deutet auf Beeinflussung der NF- κ Bp65-DNA-Bindungsaktivität durch CUX1 hin.

Um dieses Ergebnis *in vivo* zu bestätigen, wurden Chromatinimmunpräzipitations-Experimente in J774.A1-Zellen durchgeführt. Bei diesem Ansatz wurde die CUX1-Expression mittels siRNA-Transfektion reduziert und die Bindung von NF- κ Bp65 nach TNF- α Stimulation untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels qPCR durch Verwendung von zwei Primerpaaren für den murinen CXCL10-Promotor. Als nicht durch NF- κ B gebundene Negativkontrolle dienten Primer für das Gen des ribosomalen Proteins RPLP0.

Es zeigte sich, dass eine Herunterregulation von CUX1 zu einer deutlich erhöhten basalen und TNF- α induzierten Bindung von NF- κ B p65 an den CXCL10-Promoter führt (Abb. 19). Dieses Ergebnis unterstützt die auf den oben geschilderten Pulldown Experimenten basierende Vermutung, dass CUX1 zu einer reduzierten NF- κ Bp65-Bindung an den CXCL10 Promotor führt.

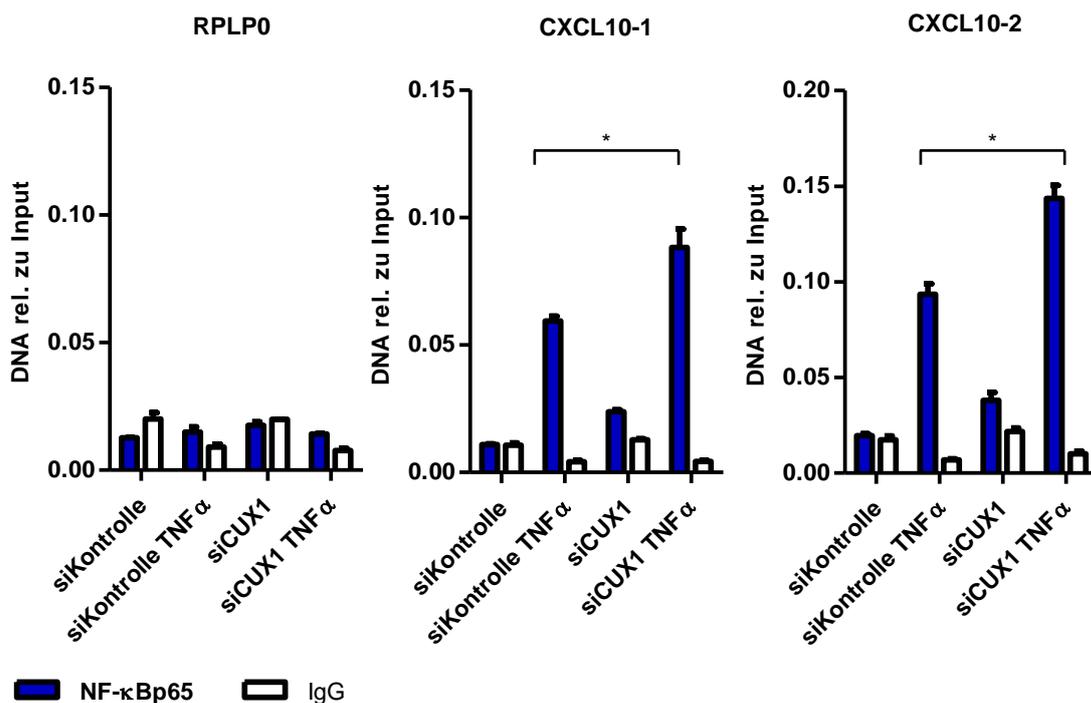


Abbildung 19: CUX1 reduziert die DNA-Bindung von NF- κ Bp65 an den CXCL10-Promotor *in vivo*. Chromatinimmunpräzipitation für NF- κ Bp65 nach siRNA vermitteltem Knockdown von CUX1 in J774.A1-Zellen. Die Bindung an den Promotor wurde durch 4 stündige Behandlung mit 20 ng/ml TNF- α induziert. Durchgeführt wurde die qPCR mit zwei Primerpaaren für den CXCL10-Promotor und einem für einen Abschnitt des ribosomalen Proteins RPLP0.

3.5 CUX1 beeinflusst die Acetylierung von NF- κ Bp65

Wie oben gezeigt, beeinflusst CUX1 sowohl die Promotoraktivität von CXCL10 wie auch die Bindung von NF- κ Bp65 an den Promotor. Ein möglicher Mechanismus könnte daher eine Verdrängung von NF- κ Bp65 aus der DNA-Bindung durch CUX1 sein. Da die transkriptionelle Aktivität sowie die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ Bp65 durch zahlreiche weitere Mechanismen wie z. B. posttranskriptionelle Modifikationen reguliert wird, sollte im Folgenden der Einfluss von CUX1 auf diese Mechanismen untersucht werden.

Hierzu wurden Immunoblots von aus MonoMac6 gewonnenen Proteinlysaten erstellt. Mit dem verfügbaren Antikörper konnte kein Einfluss von CUX1 auf die Phosphorylierung von NF- κ Bp65 festgestellt werden (s. Anhang Abb. 34). Da in der Literatur Daten existieren, dass CUX1 Protein-Deacetylase-Aktivität in den transkriptionellen Komplex rekrutieren kann, wurde im Folgenden der Effekt von CUX1 auf die Acetylierung von NF- κ B untersucht. Da mit dem verwendeten Antikörper gegen acetyliertes NF- κ Bp65 an Position K310 kein Signal im Gesamtlysat erhalten wurde, musste vorher eine Immunopräzipitation von NF- κ Bp65 durchgeführt werden.

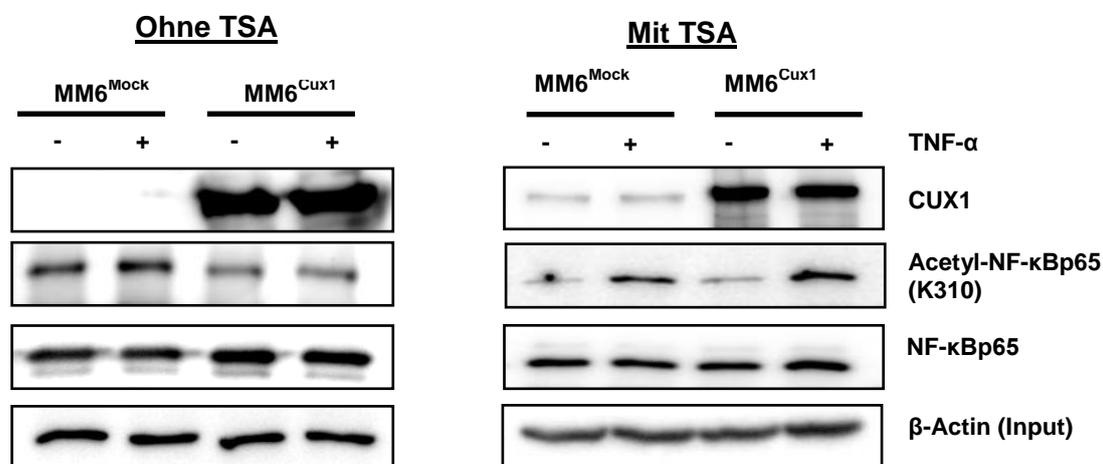


Abbildung 20: CUX1 reduziert Acetylierung von NF- κ Bp65 an Lysin310. Immunoblot Analyse von aus MM6^{Mock}- und MM6^{CUX1}-Lysat gewonnenen NF- κ Bp65 Präzipitaten. Die Zellen wurden nach 1-stündiger Vorinkubation mit TSA jeweils für 4 Stunden mit TNF- α stimuliert. links ohne Behandlung, rechts mit 10 μ M Trichostatin A.

Es zeigte sich, dass die Acetylierung von NF- κ Bp65 an Lysin 310 in CUX1 überexprimierenden Zellen reduziert ist (Abb. 20A). Dieser Effekt konnte durch Behandlung mit dem Histondeacetylase (HDAC) - Inhibitor Trichostatin A aufgehoben

werden (Abb. 20B). Dieses Resultat deutet auf eine Rolle von CUX1 bei der Acetylierung von NF- κ B hin, die durch HDACs vermittelt wird.

3.5.1 CUX1 interagiert mit NF- κ Bp65 und HDAC1

Um die beobachtete Wirkung von CUX1 auf die Acetylierung von NF- κ Bp65 detaillierter zu beleuchten wurde die direkte Interaktion dieser beiden Proteine untersucht. Hierzu wurden Immunopräzipitationen von CUX1 und NF- κ Bp65 aus Proteinlysaten von MonoMac6 durchgeführt und mittels Immunoblot analysiert (Abb. 21).

Die Immunopräzipitationen zeigten, dass CUX1 TNF- α -abhängig mit NF- κ Bp65 präzipitiert werden kann und *vice versa* (Abb. 21).

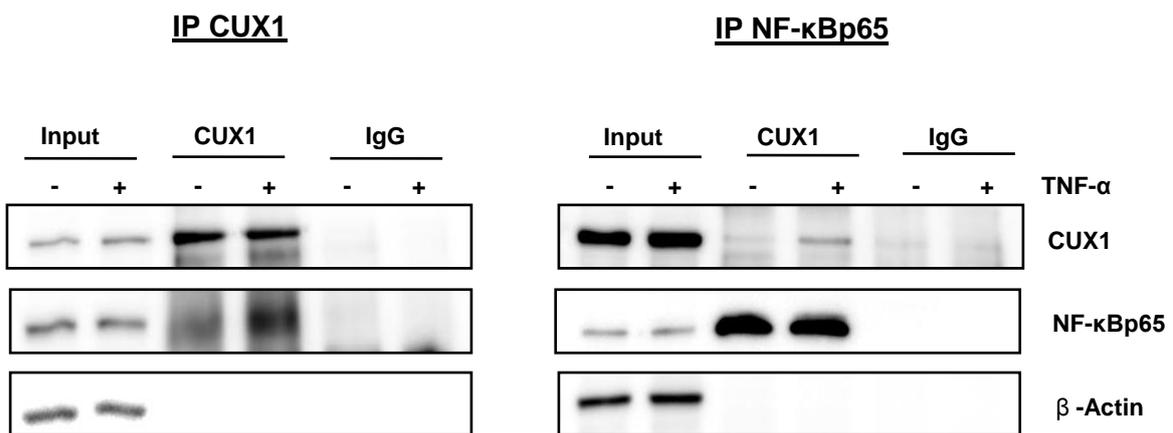


Abbildung 21: CUX1 interagiert mit NF- κ Bp65. Immunoblot-Analyse von Immunopräzipitationen aus Lysaten von MM6^{CUX1}. Die Zellen wurden jeweils für 4 Stunden mit TNF- α stimuliert.

Da CUX1 als Interaktionspartner von Histondeacetylase1 (HDAC1) beschrieben wurde und HDAC1 in Verbindung gebracht wurde mit der Regulation des Acetylierungsstatus von NF- κ Bp65, sollte im Folgenden die Interaktion von CUX1 mit HDAC1 untersucht werden (Li *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 2007). Hierzu wurden Immunopräzipitationen von CUX1 und HDAC1 aus Proteinlysaten von MonoMac6 durchgeführt und mittels Immunoblot analysiert (Abb. 22).

Es zeigte sich eine direkte Interaktion von CUX1 mit HDAC1 in MonoMac6. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die reduzierte Acetylierung von NF- κ Bp65 durch direkte Interaktion von CUX1 und HDAC1.

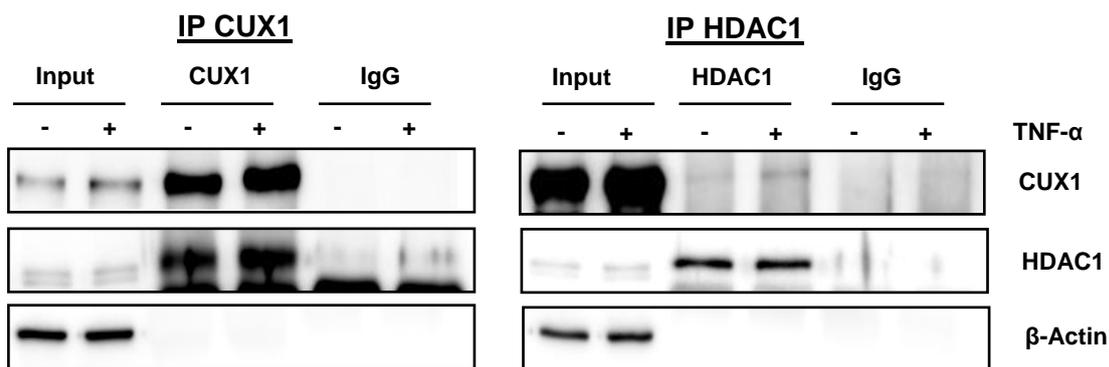


Abbildung 22: CUX1 interagiert mit HDAC1. Immunoblot-Analyse von Immunopräzipitationen aus Lysaten von MM6^{CUX1}. Die Zellen wurden jeweils für 4 Stunden mit TNF- α stimuliert.

3.6 CUX1 regulierte Zytokine beeinflussen das Tumormicroenvironment

Mehrere der identifizierten CUX1-Zytokine wie u.a. CCL5 und CXCL10 werden mit der M1-Polarisierung von Makrophagen in Verbindung gebracht. Dieses M1-Zytokinmuster vermittelt die antitumoralen Wirkungen von M1-polarisierten Makrophagen, insbesondere angiostatische Effekte und eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort (Mantovani *et al.*, 2004).

Um den Einfluss der CUX1-Expression in Makrophagen auf die Angiogenese und T-Zell-Attraktion zu untersuchen, wurden Kokulturrexperimente mit durch MonoMac6 konditioniertem Medium durchgeführt. Da CUX1 als proliferationsfördernder Faktor in anderen Zelltypen beschrieben wurde, erfolgte zunächst eine Prüfung der Auswirkungen von CUX1 auf MonoMac6 in Hinblick auf Proliferation, um Zellzahl-abhängige Effekte in den Kokulturrexperimenten auszuschließen. Hierfür wurden MTT-Assays durchgeführt (s. Anhang Abb. 35). Innerhalb eines Zeitraumes von 24 Stunden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.6.1 Auswirkungen von CUX1-Expression in Makrophagen auf Attraktion von CD8⁺-T-Lymphozyten

Mehrere der als durch CUX1 reprimiert identifizierte Zytokine haben chemotaktische Wirkung auf Zellen des Immunsystems. So sind sowohl CCL5 als auch CXCL10 als Chemoattraktanten für zytotoxische T-Zellen beschrieben (Olson *et al.*, 2002; Franciszkiwicz *et al.*, 2012). Im Folgenden wurde daher der Einfluss der CUX1-Expression in Makrophagen auf die Attraktion von CD8⁺-T-Zellen untersucht.

Hierzu wurden Migrations-Assays in modifizierten Boydenkammern durchgeführt. Um zunächst die Wirkung von CCL5 und CXCL10 auf die Migration der zuvor mittels MACS Cell Separation isolierten Lymphocyten und die Eignung des Assays zur Erfassung ihrer Effekte zu prüfen, wurde rekombinantes humanes CCL5 und CXCL10 eingesetzt (Abb. 23).

Sowohl CCL5 wie auch CXCL10 zeigten einen chemotaktischen Effekt auf CD8⁺-T-Zellen. Daher ist dieser Versuchsaufbau geeignet, die Effekte dieser Zytokine auf CD8⁺-T-Zellen zu untersuchen.

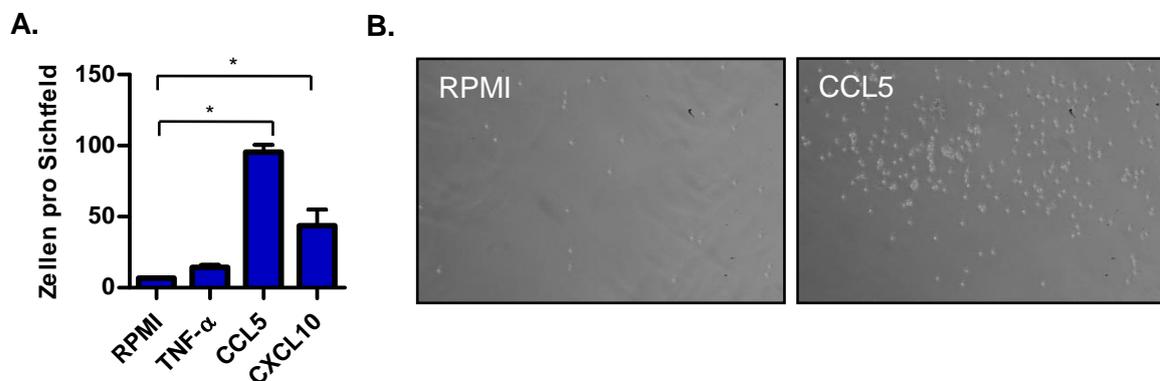


Abbildung 23: CCL5 und CXCL10 wirken als Attraktanten von CD8⁺-Zellen. Es wurden Migrationsassays in modifizierten Boydenkammern durchgeführt. A) Auszählung der innerhalb von 6 Stunden migrierten Zellen. Eingesetzt wurden 20 ng/ml TNF-a bzw. je 100 ng/ml CCL5 bzw. CXCL10 im unteren Kompartiment. **B)** Exemplarische Fotos der durch die Membran migrierten Zellen.

Im folgenden wurden Migrations-Experimente mit konditioniertem Medium von MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock} bzw. von mit siRNA-transfizierten MonoMac6 durchgeführt (Abb. 24).

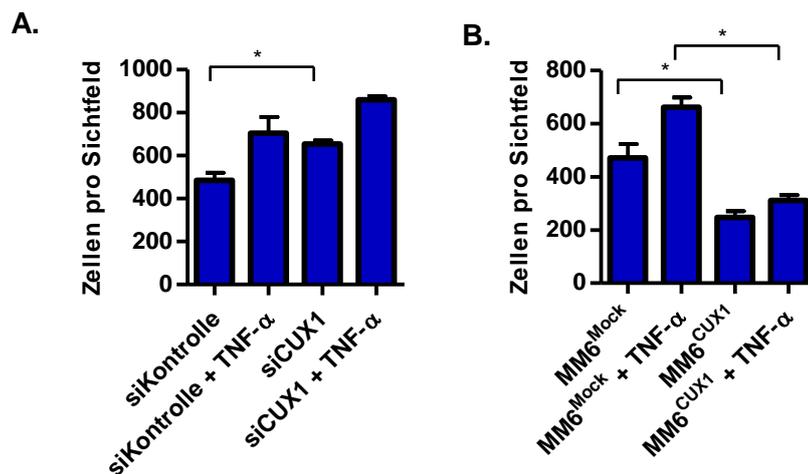


Abbildung 24: CUX1 Expression in Makrophagen inhibiert die chemotaktische Wirkung auf CD8⁺-Lymphozyten. Es wurden Migrationsassays in modifizierten Boydenkammern mit durch MonoMac6 konditioniertem Medium durchgeführt, in denen die CUX1-Expression moduliert wurde. **A)** Knockdown von CUX1. **B)** Überexpression von CUX1.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl migrierender Zellen im Falle einer CUX1-Depletion bzw. eine signifikante Reduktion im Falle einer CUX1-Überexpression. Eine TNF- α -Behandlung der MonoMac6-Zellen während der Konditionierung des Mediums hatte einen verstärkenden Effekt auf die Migration der T-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Rolle von CUX1 als transkriptioneller Repressor von M1- Chemokinen.

3.6.2 Auswirkungen der CUX1-Expression in Makrophagen auf Angiogenese

Neben der Attraktion von T-Zellen ist Angiogenese als tumorfördernde Eigenschaft von Makrophagen auf den Tumor beschrieben. Einige der durch CUX1 reprimierten Zytokine wie z. B. CXCL10 sind als angiostatisch beschrieben. Um die Effekte der CUX1-Expression in Makrophagen auf die Bildung von Blutgefäßen zu untersuchen wurden Angiogenese-Assays mit der Endothelzelllinie HMEC-1 durchgeführt.

Zunächst wurde geprüft, ob der Tubeformation-Assay geeignet ist, die angiostatische Wirkung von CXCL10 zu erfassen. Hierzu wurden zuvor auf Matrigel ausgesäte HMEC-1-Zellen für 24 Stunden mit rekombinantem CXCL10 behandelt. Die sich ergebenden Tubes wurden mit Hilfe der TimeLapseAnalyzer Software erfasst (Abb. 25).

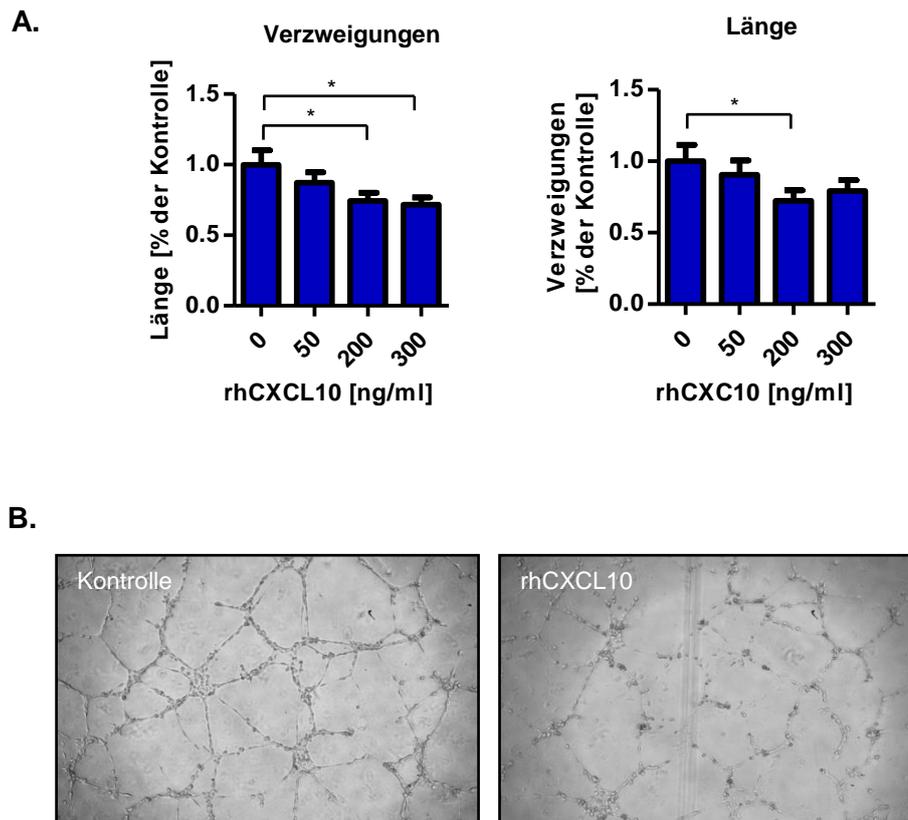


Abbildung 25: Rekombinantes CXCL10 inhibiert die Bildung von gefässartigen „Tubes“ durch HMEC-1 Zellen. Es wurden „Tube formation“ Assays mit HMEC-1-Zellen durchgeführt. Diese wurden für 24 Stunden verschiedenen Konzentrationen rekombinanten CXCL10 ausgesetzt. **A)** Auswertung der Länge und Verzweigungen der Tubes. Dargestellt ist jeweils die Länge der Tubes bzw. die Anzahl der Verzweigungen relativ zur jeweiligen Kontrolle. Die Auswertung erfolgte mit der TimeLapseAnalyzer Software. **B)** Exemplarische fotografische Aufnahmen.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion sowohl der Länge wie auch der Anzahl der Verzweigungen der sich bildenden Tubes. Demnach ist dieser Assay geeignet, die angiostatische Wirkung von CXCL10 zu erfassen.

Im Folgenden wurden Tube-Formation-Experimente mit über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammeltem konditioniertem Medium von MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock} bzw. von mit siRNA transfizierten MonoMac6 durchgeführt (Abb. 26).

Es zeigten sich kürzere und weniger stark verzweigte Tubes im Falle einer CUX1-Depletion bzw. längere und stärker verzweigte im Falle einer CUX1-Überexpression. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Rolle von CUX1 als transkriptioneller Repressor von angiostatischen M1-Zytokinen.

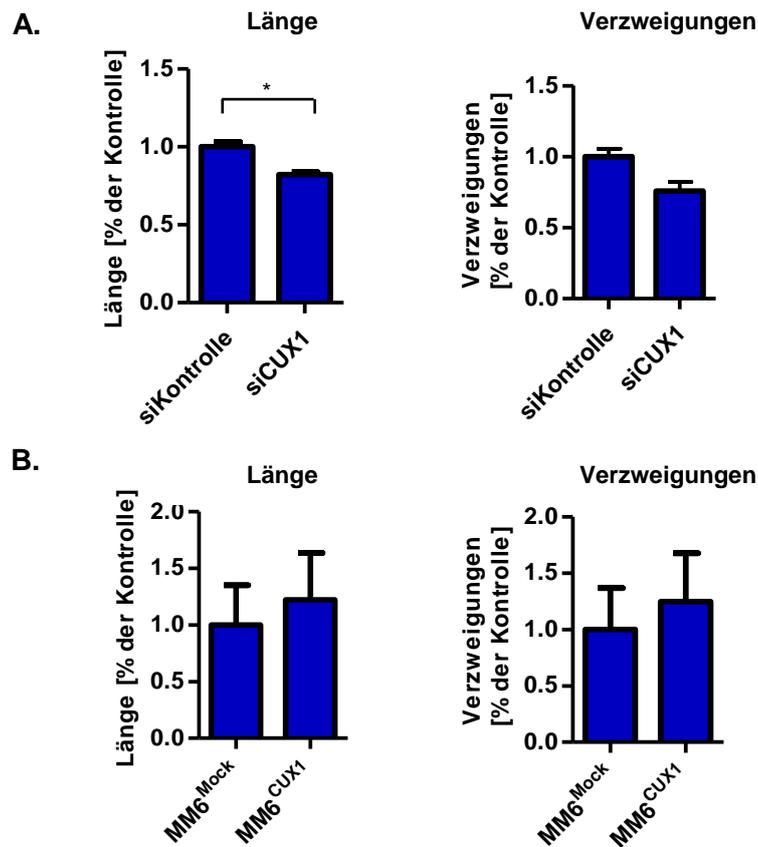


Abbildung 26: CUX1-Expression in Makrophagen fördert die Bildung von Tubes *in vitro*. Es wurden Tube formation Assays mit HMEC-1 Zellen durchgeführt. Diese wurden für 24 Stunden konditioniertem Medium von MonoMac6 Zellen ausgesetzt, in denen die CUX1-Expression moduliert wurde. **A)** Knockdown von CUX1. **B)** Überexpression von CUX1. Dargestellt ist jeweils die Länge der Tubes bzw. die Anzahl der Verzweigungen relativ zur jeweiligen Kontrolle. Die Auswertung erfolgte mit der TimeLapseAnalyzer Software.

4. Diskussion

Zu den Kennzeichen maligner Tumore gehören u. a. ungehemmte Proliferation, abnormale Vaskularisierung, Gewebsinvasion, Metastasierung und die Modulation der Immunantwort (Hanahan *et al.*, 2011). Makrophagen sind entscheidend an all diesen Prozessen beteiligt (Bingle *et al.*, 2006, DeNardo *et al.*, 2009, Cheng *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2007; Ojalvo *et al.*, 2009). Die beteiligten Signalwege und Faktoren sind aber nach wie vor nur unvollständig verstanden. Wissen über diese Vorgänge könnte Möglichkeiten für ein Eingreifen in diese tumorfördernden Prozesse bieten.

Für mehrere solide Tumore konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors CUX1 im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant erhöht ist und im Verlauf der Tumorprogression ansteigt. Im Fall des Mammakarzinoms konnte darüber hinaus eine negative Korrelation zwischen CUX1-Expression und dem rezidivfreien Überleben gezeigt werden (Michl *et al.*, 2005, Cadieux *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Zusammenhang kann auch für das Pankreaskarzinom vermutet werden (Michl *et al.*, 2005; Ripka *et al.*, 2010). Die tumorfördernde Wirkung von CUX1 kann zurückgeführt werden auf die proliferations- und migrationstimulierende Wirkung sowie apoptoseinhibierende Effekte von CUX1 in Tumorzellen (Michl *et al.*, 2005; Ripka *et al.*, 2010; Keding *et al.*, 2009). Über eine Rolle von CUX1 in Zellen des Tumorstromas und insbesondere in Tumor-assoziierten Makrophagen ist bisher nichts bekannt.

4.1 CUX1-Expression in Makrophagen

Basierend auf *In-vitro*-Studien wurde für viele Jahre angenommen, dass die Funktion von CUX1 im Wesentlichen in der Repression von Genen liegt, die in terminal differenzierten Zellen exprimiert sind, und dass sich daher die CUX1-Expression auf undifferenzierte Zellen und embryonale Gewebe beschränkt (Pattison *et al.*, 1997; van Gurp *et al.*, 1999, Ellis *et al.*, 2001). Diese Annahme galt auch für Zellen myeloider Abstammung (Khanna-Gupta *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Expression von CUX1 in ausgereiften Makrophagen beschrieben. Dies steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen von Lievens *et al.*, die zeigten, dass sowohl die Expression als auch die DNA-Bindung von CUX1 während der Differenzierung von phagozytierenden Zellen abnimmt

(Lievens *et al.*, 1995). Passend zu dieser Hypothese wurde auch beschrieben, dass CUX1 die Expression von *GP91PHOX*, einem in terminal differenzierten Makrophagen stark exprimierten Gen, reprimiert (Lievens *et al.*, 1995, Skalnik *et al.*, 1991, Luo *et al.*, 1996).

Mögliche Gründe für diese zu den vorliegenden Daten diskrepanten Befunde könnten in den jeweils verwendeten Zellsystemen bzw. deren Stimulation liegen. So verwendeten Lievens *et al.* die Leukämiezelllinie HL-60, die durch Stimulation mit dem Proteinkinase C (PKC)-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert wurden. PKC hat wichtige Funktionen in der Aktivierung von Makrophagen z. B. in der TLR4-Signaltransduktion und kann daher als proinflammatorischer Stimulus gelten (Valledor *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurden in den hier präsentierten Experimenten, u. a. primäre humane Makrophagen, differenziert durch 7-tägigen Adhärenzstimulus ohne weitere Faktoren, verwendet.

Darüber hinaus konnte in den hier präsentierten Daten eine CUX1-Expression in Makrophagen *in vivo* sowohl durch immunhistochemische Färbungen mit einem makrophagenspezifischen Antikörper wie auch durch Untersuchungen in einem genetischen Mausmodell demonstriert werden. Die beobachtete gesteigerte Expression von CUX1-mRNA in tumorassoziierten Makrophagen gegenüber Makrophagen aus Pankreata mit nicht invasiven Vorläuferläsionen steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Michl *et al.*, dass die Expression des CUX1-Proteins im Gewebe des Pankreaskarzinoms gegenüber gesundem Pankreasgewebe erhöht ist (Michl *et al.*, 2005).

Passend zu Vorbefunden aus anderen Zellsystemen konnte in dieser Arbeit auch in Makrophagen CUX1 als TGF- β -Zielgen identifiziert werden (Fragiadaki *et al.*, 2011; Michl *et al.*, 2005). Es ist bekannt, dass die Expression von TGF- β 1 in der Progression des humanen und murinen Pankreaskarzinoms ansteigt und darüber hinaus eine gesteigerte Expression mit einer reduzierten Überlebensrate korreliert (Streit *et al.*, 2009; Friess *et al.*, 1993). Als Quellen des TGF- β gelten neben stromalen Zellen vor allem die Tumorzellen (Sato *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das von Tumorzellen sezernierte TGF- β die Expression von CUX1 in monozytären Zellen stimuliert. Demnach bietet die Wirkung von TGF- β 1 auf makrophagenähnlichen Zellen einen möglichen Erklärungsansatz für die gesteigerte CUX1-Expression in TAMs des Pankreaskarzinoms.

4.2 CUX1 vermittelt eine immunsuppressive Wirkung in Makrophagen

Die Wirkung von TGF- β auf Tumore bzw. die Tumorentstehung ist ambivalent. TGF- β kann sowohl tumorsupprimierend als auch tumorfördernd wirken. So ist beschrieben, dass TGF- β die Tumorinitiation und die frühe Tumorentwicklung u. a. durch Suppression der Proliferation und Induktion von Apoptose inhibieren kann (Siegel *et al.*, 2003). In fortgeschrittenen Tumorstadien jedoch kann es eine gegenteilige Wirkung entfalten und die Progression fördern. Solch eine tumorfördernde Wirkung konnte auch für das Pankreaskarzinom gezeigt werden (Friess *et al.*, 1993).

Die tumorfördernden Eigenschaften von TGF- β werden u. a. durch seine Wirkung auf maligne Zellen vermittelt z. B. durch eine Fehlregulation des Zellzyklus oder durch Induktion eines Prozesses der Transdifferenzierung von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp (Epithelial-mesenchymale Transition - EMT) (Jungert *et al.*, 2007; Heldin *et al.*, 2012). Des Weiteren wird die tumorfördernde Wirkung von TGF- β vermittelt durch seine Wirkung auf stromale Zellen des Tumorgewebes, insbesondere auf Zellen des Immunsystems (Yang *et al.*, 2010). TGF- β übt Effekte auf nahezu alle Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems aus, die im Wesentlichen der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz durch Kontrolle der Initiation und Beendigung von entzündlichen Prozessen dient (Li *et al.*, 2006). Demnach wirkt TGF- β in erster Linie immunsuppressiv, indem es die Aktivierung und Funktion von zahlreichen Immunzellen unterdrückt bzw. immunsuppressive Zellen wie beispielsweise regulatorische T-Zellen aktiviert (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Castriconi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Cazac *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2005; Fridlender *et al.*, 2009).

Auch für Makrophagen wurde ein immunsuppressiver Effekt von TGF- β nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass TGF- β *in vitro* die LPS induzierte Aktivierung von Makrophagen und die Expression einiger inflammatorischer Mediatoren wie TNF- α , CCL3 and CXCL2 inhibieren kann (Bogdan *et al.*, 1992, Werner *et al.*, 2000). Darüber hinaus blockiert TGF- β die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und reduziert die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in aktivierten Makrophagen (Vodovotz *et al.*, 1993; Tsunawaki *et al.*, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das TGF- β -Zielgen *CUX1* eine inhibierende Wirkung auf die Expression proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen hat. Über eine Rolle von *CUX1* als Modulator von Immunantworten ist

bisher nur wenig bekannt. Darsigny *et al.* konnten zeigen, dass eine experimentell induzierte Colitis in Mäusen mit Expression eines inaktiven Cux1-Proteins (Cux1 Δ HD) einen deutlich schwereren Verlauf nimmt als in Wildtyp Tieren. Cux1 Δ HD-Mäuse zeigten signifikant höhere Level der proinflammatorischen Zytokine Tnf- α , Inf- γ und Cxcl1 im Colon und eine verzögerte Regeneration der Schleimhaut (Darsigny *et al.*, 2010). Diese Befunde könnten auf eine Rolle von CUX1 in der TGF- β abhängigen Beendigung oder Unterdrückung inflammatorischer Prozesse hindeuten.

4.3 CUX1 inhibiert die NF- κ B abhängige Zytokinexpression

Einer der Mechanismen, welcher der TGF- β abhängigen Regulation der Inflammation zugrunde liegt, ist die Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges.

Die Familie der Rel-Proteine umfasst fünf Mitglieder, die in verschiedenen Kombinationen Homo- und Heterodimere, genannt NF- κ B, bilden können. Die häufigste NF- κ B-Form ist das p50/p65-Heterodimer. Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B im Zytoplasma gebunden an einen Inhibitor (Inhibitor of κ B, I- κ B) vor. Durch Stimulation mit LPS oder TNF- α wird I- κ B durch die Inhibitor of κ B Kinase (IKK) phosphoryliert und dadurch für den proteasomalen Abbau markiert. Das NF- κ B-Dimer kann nun in den Nukleus transportiert werden wo es die Expression von Zielgenen reguliert. Die Beendigung der NF- κ B vermittelten Transkription erfolgt durch Bindung von neusynthetisiertem I- κ B an NF- κ B und dem Export aus dem Nukleus (Karin, 1999).

In dieser Arbeit konnte eine Beeinflussung der Bindung von NF- κ Bp65 an den *CXCL10* Promotor durch CUX1 charakterisiert werden. Der funktionelle Antagonismus zwischen NF- κ Bp65 und CUX1 könnte auf die sterische Verdrängung von NF- κ B oder einem für die NF- κ B-Aktivität benötigten Cofaktor zurückzuführen sein. Diese Wirkung von CUX1 als „Displacement Protein“ wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Lievens *et al.*, 1995; Mailly *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1996; Catt *et al.*, 1999).

Darüber hinaus wird die DNA-Bindung und die transkriptionellen Aktivität von NF- κ B durch zahlreiche posttranslationale Modifikationen reguliert (Schmitz *et al.*, 2004). Demnach könnte CUX1 die NF- κ B-Aktivität auch auf Ebene der Proteinmodifikation beeinflussen. Diese Möglichkeiten wurden in der vorliegenden detaillierter Arbeit untersucht. Eine mögliche Beeinflussung der Phosphorylierung, welche die DNA-

Bindung von NF- κ B beeinflusst (Schmitz *et al.*, 2004) konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz hierzu konnte ein Einfluss von CUX1 auf die Acetylierung von NF- κ Bp65 gezeigt werden. Eine Acetylierung von NF- κ Bp65 kann an mehreren Positionen erfolgen. Unter anderem gehören hierzu die Lysinreste K218, K221 und K310 (Chen *et al.*, 2001). Die Acetylierung an Lysin K221 verstärkt die DNA-Bindung von NF- κ Bp65 und verhindert die Bindung an I κ B α , was zu einer Verlängerung der NF- κ B Antwort und zu einer Inhibition des nukleären Exports führt (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Die Acetylierung von Lysin K310 wird benötigt für die vollständige transkriptionelle Aktivität von NF- κ Bp65 (Chen *et al.*, 2002). Dementsprechend wird Deacetylierung mit einer Inhibition der NF- κ B-Antwort in Verbindung gebracht (Greene *et al.*, 2004).

Die Acetylierung von NF- κ Bp65 wird reguliert durch ein Zusammenspiel von Acetyltransferasen und Deacetylasen. NF- κ Bp65 kann acetyliert und damit aktiviert werden durch Coactivator-Komplexe bestehend aus verschiedenen Acetyltransferasen wie u. a. CBP, p300 und p/CAF (Sheppard *et al.*, 1999). Darüber hinaus kann NF- κ B direkt oder indirekt Corepressor-Komplexe rekrutieren, welche Deacetylase-Aktivität besitzen und vermutlich die basale und die induzierte NF- κ B-abhängige Transkription inhibieren. Mehrere Histon-Deacetylasen (HDAC) wie HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3 und HDAC-6 wurden mit einer Deacetylierung von NF- κ Bp65 in Verbindung gebracht (Ashburner *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Kiernan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Für eine Funktion von HDACs als negative Regulatoren der NF- κ B Aktivität sprechen des weiteren Studien, die zeigen, dass eine Überexpression von HDACs die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B senkt. Im Einklang hiermit stehen zudem Berichte über eine erhöhte NF- κ B-Aktivität durch Behandlung mit HDAC-Inhibitoren (Chen *et al.*, 2003; Ashburner *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2002; Quivy *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Interaktion von CUX1 mit HDAC1 gezeigt, die zuvor bereits in anderen Zelltypen beschrieben wurde (Sharma *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1999). Eine Rekrutierung von HDAC1 zu NF- κ Bp65 durch CUX1 bietet einen möglichen Mechanismus für die gezeigte CUX1-abhängig reduzierte Acetylierung von NF- κ Bp65 an K310. Die Acetylierung von K218 und K221 konnte aufgrund fehlender Antikörper nicht untersucht werden.

In Übereinstimmung mit der Hypothese von CUX1 als Modulator der NF- κ B-Acetylierung haben Ueda *et al.* eine Reduzierung der NF- κ Bp65-Acetylierung durch Entfernung der Acetyltransferase CBP aus dem transkriptionellen Komplex von NF- κ B durch CUX1 in Melanomzellen beschrieben (Ueda *et al.*, 2007). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit an den hier verwendeten Zellsystemen allerdings nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die hier dargestellte Wirkung von CUX1 auf die NF- κ B-Aktivität stellt einen neuen zuvor nicht beschriebenen Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von TGF- β dar. Darüber hinaus kommt CUX1 hiermit eine Rolle in phänotypischen Polarisierung von Makrophagen zu.

4.4 Rolle von CUX1 in der Polarisierung von Makrophagen

Makrophagen stellen einen wesentlichen Bestandteil im tumorassoziierten Stroma des Pankreaskarzinoms dar. Daten über ihren Einfluss auf die Progression dieses Tumors sind jedoch begrenzt. Wie für viele andere maligne Tumore konnte auch für das Pankreaskarzinom gezeigt werden, dass Pankreastumorzellen in der Lage sind, die Polarisierung der Makrophagen in Richtung M2 zu verändern. Morphologisch ist in vielen Fällen ein Großteil der infiltrierenden Makrophagen dem M2-Phänotyp zuzuordnen (Menen *et al.*, 2012; Benson *et al.*, 2012; Kurahara *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte in mehreren Studien anhand immunhistochemischer Färbungen von Oberflächenantigenen wie CD163, CD204 und CD206 gezeigt werden, dass die Anzahl an M2-Makrophagen einen fördernden Einfluss auf die Tumorgroße, die Dichte der Lymphgefäße und die Metastasierung hat (Kurahara *et al.*, 2011; Yoshikawa *et al.*, 2012; Ino *et al.*, 2013; Kurahara *et al.*, 2012). Insgesamt hat eine Infiltration mit M2-polarisierten Makrophagen einen negativen Effekt auf die Prognose, während M1-polarisierte Makrophagen einen positiven Einfluss haben (Ino *et al.*, 2013). Der beschriebene reprimierende Effekt von CUX1 auf die M1-assoziierte, proinflammatorische Zytokinexpression lässt vermuten, dass CUX1 einen insgesamt die Tumorprogression fördernden Effekt bei der Polarisierung von Makrophagen hat.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigten große Variationen des Anteils CUX1 exprimierender Makrophagen zwischen den untersuchten Geweben, aber auch innerhalb eines Gewebes. Diese Variationen sind möglicherweise zurückzuführen auf jeweilige Unterschiede im Tumorstadium, der

Differenzierung und der lokalen Präsenz von auf die Makrophagen einwirkenden Faktoren (z. B. TGF- β). Beispielsweise ist bekannt, dass der Makrophagen-Phänotyp in verschiedenen Regionen eines Tumors variieren kann, unter anderem durch den Einfluss hypoxischer Bedingungen (Movahedi *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss von CUX1 auf die Expression von M2-Markergenen nachgewiesen werden. Dennoch steht die hier beschriebene inhibierende Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg in Übereinstimmung mit dem derzeitigen Kenntnisstand über tumorassoziierte Makrophagen. Untersuchungen in Inflammationsgetriggerten murinen Tumormodellen haben gezeigt, dass die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen einen entscheidenden Faktor in der Tumorentstehung und der Entwicklung in frühen Tumorstadien darstellt (Greten *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu zeigen aus etablierten Tumoren isolierte Makrophagen nicht nur eine Expression anti-inflammatorischer, M2-assoziiierter Zytokine wie IL-10 und TGF- β sondern auch eine reduzierte Expression proinflammatorischer, NF- κ B abhängiger Zytokine wie IL-12, TNF- α , IL-6 oder CCL3 (Biswas *et al.*, 2006; Torroella-Kouri *et al.*, 2009; Torroella-Kouri *et al.*, 2005). Demnach findet ein Wandel des Makrophagen-Phänotyps von einem proinflammatorischen M1-Phänotyp in frühen Tumorstadien hin zu einem antiinflammatorischen M2-Phänotyp in etablierten Tumoren statt, der in Verbindung gebracht werden kann mit einer Inaktivierung des NF- κ B Signalweges in diesen Zellen (Biswas *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2000).

Mechanistisch wurde die Inaktivierung von NF- κ B auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt. Sacconi *et al.* zeigten, dass tumorassoziierte Makrophagen, isoliert aus einem Fibrosarkom-Mausmodell bzw. aus humanen Ovarialkarzinomen, eine beeinträchtigte NF- κ B-Aktivierung aufweisen, welche die Autoren auf eine verstärkte nukleäre Lokalisation des inhibitorischen p50/p50-Homodimers zurück führten. Darüber hinaus beobachteten sie eine verzögerte Phosphorylierung von I κ B α und eine damit einhergehende Inhibition der nukleären Translokation von NF- κ Bp65 (Sacconi *et al.*, 2006). Auch Porta *et al.* berichten von einer wesentlichen Funktion des p50/p50-Homodimers in der Inhibition der M1-Effekte (Porta *et al.*, 2009). Torroella-Kouri *et al.* beobachteten in aus murinem Mammakarzinom isolierten Makrophagen eine reduzierte NF- κ B Aktivität, die einherging mit einer reduzierten Expression von p50, p65 und c-rel (Torroella-Kouri *et al.*, 2005; Torroella-Kouri *et al.*, 2009). In den hier verwendeten Zellsystemen konnte keine durch CUX1 modulierte Lokalisation oder Konzentration des inhibitorischen p50/p50-Homodimers festgestellt werden (Daten

nicht gezeigt). Die hier beschriebene Wirkung von CUX1, einer Inhibition des M1-Phänotyps ohne aktive Induktion von M2-Effektoren, legt nahe, dass CUX1 zu einem Phänotyp beiträgt, der in der Literatur als M2c-Polarisierung bzw. regulatorischer oder "deaktivierter" Makrophagen-Phänotyp bezeichnet wird (Mantovani *et al.*, 2004; Mosser *et al.*, 2008; Tsunawaki *et al.*, 1988).

4.5 Auswirkungen von CUX1 in TAMs auf die Tumorprogression

Die beschriebenen Wirkungen von Makrophagen auf den Tumor sind äußerst zahlreich. Ein Schwerpunkt scheint aber auf der Förderung der Tumervaskularisierung und in der Inhibition einer antitumoralen Immunantwort zu liegen. Daher wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von CUX1 in Makrophagen auf diese Prozesse untersucht.

Angiogenese spielt eine fundamentale Rolle in Wachstum und Metastasierung von Tumoren (Harlozinska, 2005). Zwar gehört das Pankreaskarzinom zu den eher gering vaskularisierten Tumoren, doch ist auch hier die Versorgung mit Blutgefäßen entscheidend für das Wachstum und die Metastasierung. So konnte in mehreren Untersuchungen festgestellt werden, dass eine hohe Dichte an Blutgefäßen einen begünstigenden Einfluss auf das Tumorwachstum und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms hat und insgesamt mit einer verschlechterten Prognose für den Patienten assoziiert ist (Jinfeng *et al.*, 2007; Fujioka *et al.*, 2001; Zhongqiu *et al.*, 2004; Kuwahara *et al.*, 2003; Linder *et al.*, 2001).

Die Tumervaskularisierung erfolgt durch ein Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Faktoren, die von den verschiedenen im Tumor befindlichen Zelltypen sezerniert werden. Makrophagen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. So sezernieren M2-polarisierte Makrophagen proangiogene Faktoren wie VEGF, PDGF und Mitglieder der FGF-Familie (Benson *et al.*, 2012; Mantovani *et al.*, 2002; Solinas *et al.*, 2009). Darüber hinaus produzieren sie angiogenesemodulierende Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) oder Cyclooxygenase-2 (Pollard, 2004).

M1-Makrophagen hingegen sezernieren mehrere Faktoren, welche die Angiogenese inhibieren können. Beispielsweise wurden von dem CXCR3-Liganden CXCL10 angiostatische und damit antitumorale Effekte berichtet (Bodnar *et al.*, 2006; Bodnar *et al.*, 2009). Angiostatische Wirkung wurde auch von anderen in dieser Arbeit als

potenzielle CUX1-Zielgene identifizierte Zytokine wie CXCL9 beschrieben (Sahin *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CUX1 die Expression einiger angiostatisch wirkender Zytokine inhibiert und dadurch potenziell zu einer gesteigerten Angiogenese im Tumor beiträgt.

Die Einleitung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort ist ein wesentlicher modulierender Faktor bei der Initiierung und Progression von Tumoren. Oftmals exprimieren Tumorzellen Oberflächenantigene, die durch das adaptive Immunsystem erkannt werden können (Hiltbold *et al.*, 1998). Um eine adaptive Immunantwort auszulösen, müssen dendritische Zellen diese Antigene spezialisierten Immunzellen wie CD4⁺-T-Helfer-Zellen oder CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen mit einem für dieses Antigen spezifischen Rezeptor in lymphatischen Organen präsentieren (Friedl *et al.*, 2005). Daraufhin differenzieren diese zunächst naiven Zellen zu reifen Effektor-Zellen und begeben sich in den Blutstrom, der sie zum Tumor transportiert. Die Einwanderung in das Tumorgewebe erfolgt unter Einfluss von Chemokinen, die durch Immunzellen des Gewebes sezerniert werden. Im Tumorgewebe angelangt, können sie unter bestimmten Voraussetzungen ihre zytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen entfalten.

Für das Pankreaskarzinom konnte sowohl durch Untersuchungen im genetischen Mausmodell als auch anhand humaner Gewebe gezeigt werden, dass CD8⁺-Effektor T-Zellen nur in einem geringen Prozentsatz der Tumore vorhanden sind und darüber hinaus keine Anzeichen einer Aktivierung zeigen (Clark *et al.*, 2007; Fukunaga *et al.*, 2004; Emmrich *et al.*, 1998). Ist eine Infiltration mit CD8⁺-Zellen vorhanden, so ist die mit einer positiven Prognose assoziiert (Fukunaga *et al.*, 2004; Ino *et al.*, 2013; Ryschich *et al.*, 2005). Demnach stellt die Infiltration des Tumorgewebes mit CD8⁺ Zellen einen wesentlichen Faktor für die Immunantwort gegen den Tumor dar.

Da reaktive Effektor-T-Zellen, die gegen Tumorantigene gerichtet sind, im Blut vieler Patienten mit Pankreaskarzinom gefunden werden können, diese aber offenbar den Tumor nicht in ausreichender Zahl infiltrieren, kann vermutet werden, dass bereits die Infiltration der T-Zellen in das Tumorgewebe behindert ist (Schmitz-Winnenthal *et al.*, 2005). Das Einwandern von CD8⁺-T-Zellen erfolgt in erster Linie über die Rezeptoren CXCR3 und CCR5, an welche unter anderem die durch CUX1 reprimierten Zytokine CCL5 und CXCL10 binden (Olson *et al.*, 2002; Franciszkiewicz *et al.*, 2012). Demnach bietet die beobachtete Repression dieser Chemokine durch CUX1 und die dadurch

reduzierte Infiltration mit CD8⁺-T-Zellen einen weiteren Mechanismus durch den CUX1 zur Tumorprogression beitragen kann.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Bislang wurde die tumorfördernde Wirkung von CUX1 auf zellautonome Prozesse in den Tumorzellen zurückgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine tumorfördernde Wirkung von CUX1 in Zellen des Tumorstromas nachgewiesen werden. So wird CUX1 von Makrophagen des humanen und des murinen Pankreaskarzinoms exprimiert und beeinflusst deren Zytokinprofil. Die hier gezeigte CUX1-vermittelte Inaktivierung von NF-κBp65 stellt einen neuen Mechanismus der TGF-β abhängigen Unterdrückung von Anti-Tumor-Immunantworten dar. Darüber hinaus hat die Unterdrückung der Zytokinexpression in Makrophagen durch CUX1 einen tumorfördernden Einfluss der über die Modulation von Immunantworten hinausgeht. Abbildung 27 fasst die Wirkung von CUX1 in Makrophagen des Pankreaskarzinoms zusammen. Eine therapeutische Blockade CUX1-abhängiger Signalwege könnte somit einen neuen Ansatzpunkt darstellen, eine sowohl tumorzell-autonome als auch stromaabhängige progressionsfördernde Signalkaskade zu inhibieren.

In folgenden Arbeiten sollte die Validierung der hier erhaltenen Daten *in vivo* erfolgen um die Relevanz für den humanen Krankheitsverlauf besser abschätzen zu können. Hierfür könnten genetische Mausmodelle des Pankreaskarzinoms in Kombination mit einer makrophagenspezifischen Depletion von CUX1 genutzt werden. Eine Analyse der Tumorentwicklung oder Zusammensetzung in diesen Tieren könnte weiteren Aufschluss über die Wirkung von CUX1 in Makrophagen bieten.

Des Weiteren stellen sich zahlreiche Fragen auf molekularer Ebene:

- Findet eine Bindung von CUX1 an die Promotoren von *CXCL10* und *CCL5* auch *in vivo* statt?
- Mit welchen weiteren Interaktionspartnern ist CUX1 assoziiert?
- Welche Mechanismen tragen zur Wirkung von CUX1 auf NF-κB bei? Verdrängung oder Inaktivierung?

- Welche weiteren Mechanismen CUX1-HDAC1-abhängiger Signalwege sind in Funktion von Makrophagen von Bedeutung (z. B. Histondeacetylierung)?
- Welche Mechanismen und Signalwege regulieren die CUX1-Aktivität in Makrophagen (z. B. Phosphorylierung oder proteolytische Spaltung von CUX1)?

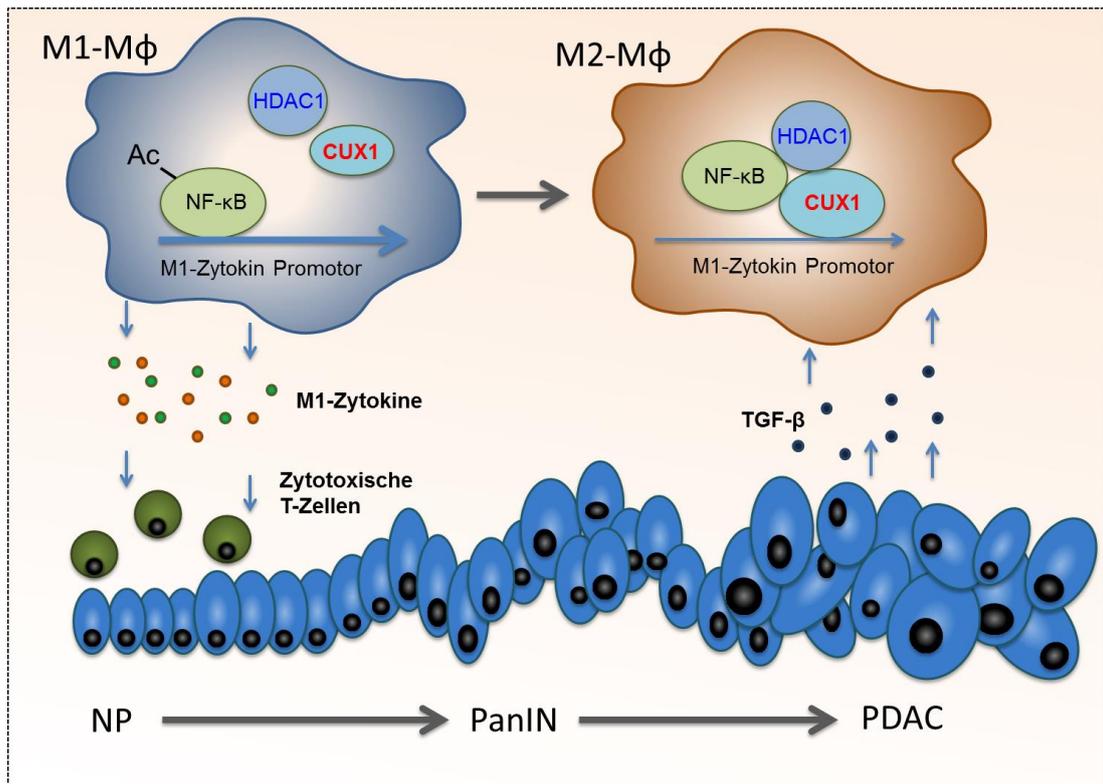


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Rolle von CUX1 in TAMs. Im Verlauf der Entstehung eines Pankreaskarzinoms (PDAC) aus normalem Pankreas (NP) über PanIN-Läsionen (PanIN) nimmt die Expression des immunsuppressiven Zytokins TGF- β zu. Diese gesteigerte TGF- β Expression trägt zu einer Anregung der CUX1-Expression in pankreatischen Makrophagen bei, die wiederum an der Unterdrückung der NF- κ B abhängigen Zytokinexpression beteiligt ist. Hierdurch werden die antitumoralen Effekte von M1-Makrophagen, wie beispielsweise die Einleitung einer Immunantwort, unterdrückt.

5. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zeigt eine charakteristische Stromareaktion mit einer hohen Anzahl tumorinfiltrierender Makrophagen (TAM). Obwohl bekannt ist, dass eine hohe Anzahl von TAMs mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht, ist die Rolle dieses Zelltyps im Pankreaskarzinom nur teilweise verstanden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Makrophagen aus humanen und murinen Tumoren, u. a. auch PDAC, einen progressionsfördernden M2- oder alternativ aktivierten Phänotyp aufweisen.

Der Transkriptionsfaktor CUX1 ist bekannt als wichtiger Mediator der Tumorprogression und ist assoziiert mit einer negativen Prognose. Die tumorfördernden Effekte von CUX1 wurden bisher vor allem seiner promigratorischen, proliferativen und antiapoptotischen Wirkung in Tumorzellen zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CUX1 nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch von den TAMs des PDAC exprimiert wird. Eine Analyse der CUX1-Expression in humanen Karzinomgeweben und einem genetischen Mausmodell des PDAC zeigten eine gesteigerte CUX1-Expression in Makrophagen aus Tumorgewebe. TGF- β , ein wichtiger Mediator der Tumorprogression, der in PDAC-Geweben stark exprimiert ist, wurde als Stimulator der CUX1-Expression in Makrophagen identifiziert. Mittels Überexpression und siRNA-vermitteltem Knockdown von CUX1 wurden eine Reihe von Zytokinen als durch CUX1 reprimiert identifiziert, welche mit dem im allgemeinen als antitumoral wirksamen M1-Phänotyp von Makrophagen assoziiert sind. Für zwei Zytokine, CCL5 und CXCL10, wurden die dieser Repression zugrunde liegenden Mechanismen durch Reporter-Assays, DNA-Pulldown-Experimente und Immunopräzipitationen weiter untersucht. CUX1 wurde als direkter Interaktionspartner von NF- κ Bp65 identifiziert, der dessen Bindung an die Zytokinpromotoren inhibiert. Darüber hinaus reduziert CUX1 die Acetylierung von NF- κ B p65 an Lysin 310, vermutlich durch Rekrutierung von HDAC1. Passend zu diesen M1-antagonisierenden Effekten, inhibiert CUX1 in Makrophagen funktionell durch eine Veränderung sezernerter Zytokine die Attraktion von zytotoxischen T-Zellen und fördert die Angiogenese *in vitro*.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit CUX1 als wichtiger Modulator des Makrophagen-Phänotyps und der Makrophagen-Funktion sowie Antagonist der NF- κ B-abhängigen Genexpression identifiziert. Dieses Wissen könnte zu einem besseren

Verständnis der tumorfördernden Eigenschaften von Makrophagen beitragen und als neuer therapeutischer Ansatzpunkt dienen.

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is characterized by an extensive stromal reaction that is accompanied by high rates of infiltrating macrophages (tumor-associated macrophage - TAM). Even though it is known that a high number of TAMs is associated with a poor prognosis, the role of these cells in PDAC is only partially understood. Several studies have shown that many of the macrophages isolated from human and murine tumors, including PDAC, show a so-called M2 or alternatively activated phenotype which is known to promote tumor progression.

Previously, the transcription factor CUX1 was identified as important mediator of tumor progression that is associated with poor prognosis. The tumor-promoting effect of CUX1 was mainly attributed to its pro-migratory, pro-proliferative and anti-apoptotic effects in cancer cells.

In this study, CUX1 was identified not only to be expressed in cancer cells but also in TAMs. To further investigate the role of CUX1 in TAMs, CUX1 expression was immunohistochemically analyzed in human pancreatic cancer tissues and a genetic mouse model revealing an increased CUX1 expression in macrophages isolated from cancer tissues. TGF- β , a factor known to be highly expressed in PDAC tissues, was identified as a stimulator of CUX1 expression in macrophages. Using overexpression and knockdown strategies, a panel of cytokines, associated with the M1 phenotype of macrophages, was identified as being repressed by CUX1 in monocytic cells. The molecular mechanisms underlying this repression were further analyzed for the cytokines CXCL10 and CCL5 by reporter assays, DNA-pulldown experiments and chromatin-immunoprecipitations. CUX1 was identified to interfere with the NF- κ B signaling pathway by direct interaction with NF- κ B p65 leading to reduced binding of NF- κ B p65 to the cytokine promoters. In addition, CUX1 reduces acetylation of NF- κ B p65 at K310 probably by recruitment of HDAC1. Functionally, CUX1 expression in macrophages antagonizes cytotoxic T-cell attraction and enhances angiogenesis *in vitro*.

Together, this study uncovers CUX1 as an important modulator of the macrophage phenotype and function via modulating of NF- κ B dependent gene expression. This knowledge might contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the tumor-promoting effect of macrophages and to novel therapeutic approaches.

6. Literaturverzeichnis

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology*. 1992; **99**: 683-90.

Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2003; **17**: 3112-26.

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews Cancer*. 2007; **7**: 139-47.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988; **53**: 549-54.

Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003; **16**: 996-1006.

Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2004; **29**: 179-87.

Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS, Jr. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Molecular and cellular biology*. 2001; **21**: 7065-77.

Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. 1998; **115**: 421-32.

Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 2005; **128**: 907-21.

Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology*. 2012; **22**: 33-40.

Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR, Wooster R. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British journal of cancer*. 2004; **91**: 355-8.

Banan M, Rojas IC, Lee WH, King HL, Harriss JV, Kobayashi R, Webb CF, Gottlieb PD. Interaction of the nuclear matrix-associated region (MAR)-binding proteins, SATB1 and CDP/Cux, with a MAR element (L2a) in an upstream regulatory region of the mouse CD8a gene. *The Journal of biological chemistry*. 1997; **272**: 18440-52.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996; **87**: 3336-43.

Benson DD, Meng X, Fullerton DA, Moore EE, Lee JH, Ao L, Silliman CC, Barnett CC, Jr. Activation state of stromal inflammatory cells in murine metastatic pancreatic adenocarcinoma. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2012; **302**: R1067-75.

Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed MW, Brown NJ. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British journal of cancer*. 2006; **94**: 101-7.

Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006; **107**: 2112-22.

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010; **11**: 889-96.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *Journal of immunology*. 2008; **180**: 2011-7.

Bodnar RJ, Yates CC, Rodgers ME, Du X, Wells A. IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *Journal of cell science*. 2009; **122**: 2064-77.

Bodnar RJ, Yates CC, Wells A. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. *Circulation research*. 2006; **98**: 617-25.

Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993; **685**: 713-39.

Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *The Journal of biological chemistry*. 1992; **267**: 23301-8.

Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *Journal of immunology*. 1992; **148**: 1280-5.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; **72**: 248-54.

Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, Jager MJ. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011; **52**: 643-50.

Cadieux C, Kedinger V, Yao L, Vadnais C, Drossos M, Paquet M, Nepveu A. Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. *Cancer research*. 2009; **69**: 7188-97.

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature genetics*. 1994; **8**: 27-32.

Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*. 2010; **467**: 1109-13.

Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; **100**: 4120-5.

Catt D, Hawkins S, Roman A, Luo W, Skalnik DG. Overexpression of CCAAT displacement protein represses the promiscuously active proximal gp91(phox) promoter. *Blood*. 1999; **94**: 3151-60.

Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*. 2000; **13**: 443-51.

Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*. 2001; **293**: 1653-7.

Chen LF, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *Journal of molecular medicine*. 2003; **81**: 549-57.

Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO journal*. 2002; **21**: 6539-48.

Cheng J, Huo DH, Kuang DM, Yang J, Zheng L, Zhuang SM. Human macrophages promote the motility and invasiveness of osteopontin-knockdown tumor cells. *Cancer research*. 2007; **67**: 5141-7.

Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2007; **101**: 887-907.

Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer research*. 2007; **67**: 9518-27.

Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994; **264**: 1415-21.

Darsigny M, St-Jean S, Boudreau F. Cux1 transcription factor is induced in inflammatory bowel disease and protects against experimental colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2010; **16**: 1739-50.

De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, Ensslen M, Raynaud P, Requirand G, Pellet F, Pantesco V, Reme T, Jourdan M, Rossi JF, Orntoft T, Klein B. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene*. 2002; **21**: 6848-57.

DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*. 2009; **16**: 91-102.

Deramaudt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2005; **1756**: 97-101.

Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Kloppel G. Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005; **447**: 800-5.

Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 1999; **19**: 563-73.

Dorsch M, Hock H, Kunzendorf U, Diamantstein T, Blankenstein T. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993; **23**: 186-90.

Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *European journal of immunology*. 1994; **24**: 1441-5.

Ellis T, Gambardella L, Horcher M, Tschanz S, Capol J, Bertram P, Jochum W, Barrandon Y, Busslinger M. The transcriptional repressor CDP (Cutl1) is essential for

epithelial cell differentiation of the lung and the hair follicle. *Genes & development*. 2001; **15**: 2307-19.

Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Lohr M, Liebe S. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*. 1998; **59**: 192-8.

Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M, Kleeff J, Friess H. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012; **9**: 454-67.

Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, et al. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *The American journal of pathology*. 1993; **142**: 1359-72.

Forsell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007; **13**: 1472-9.

Fragiadaki M, Ikeda T, Witherden A, Mason RM, Abraham D, Bou-Gharios G. High doses of TGF-beta potently suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. *Molecular biology of the cell*. 2011; **22**: 1836-44.

Franciszkiwicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadiere C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer research*. 2012; **72**: 6325-32.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009; **16**: 183-94.

Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 2005; **5**: 532-45.

Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, Korc M. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology*. 1993; **105**: 1846-56.

Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, Ito H. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012; **41**: 444-51.

Fujioka S, Yoshida K, Yanagisawa S, Kawakami M, Aoki T, Yamazaki Y. Angiogenesis in pancreatic carcinoma: thymidine phosphorylase expression in stromal cells and intratumoral microvessel density as independent predictors of overall and relapse-free survival. *Cancer*. 2001; **92**: 1788-97.

Fujiwara T, Fukushi J, Yamamoto S, Matsumoto Y, Setsu N, Oda Y, Yamada H, Okada S, Watari K, Ono M, Kuwano M, Kamura S, Iida K, Okada Y, Koga M, Iwamoto Y. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. *The American journal of pathology*. 2011; **179**: 1157-70.

Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Kato H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004; **28**: e26-31.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH,

Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006; **313**: 1960-4.

Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine*. 2005; **202**: 1075-85.

Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology*. 2010; **184**: 4810-8.

Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, Bogoyo M, Nepveu A. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Molecular cell*. 2004; **14**: 207-19.

Goulet B, Truscott M, Nepveu A. A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L. *Biological chemistry*. 2006; **387**: 1285-93.

Goulet B, Watson P, Poirier M, Leduy L, Berube G, Meterissian S, Jolicoeur P, Nepveu A. Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. *Cancer research*. 2002; **62**: 6625-33.

Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science*. 1989; **245**: 1490-3.

Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012; **481**: 306-13.

Greene WC, Chen LF. Regulation of NF-kappaB action by reversible acetylation. *Novartis Foundation symposium*. 2004; **259**: 208-17; discussion 18-25.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004; **118**: 285-96.

Griesmann H, Ripka S, Pralle M, Ellenrieder V, Baumgart S, Buchholz M, Pilarsky C, Aust D, Gress TM, Michl P. WNT5A-NFAT Signaling Mediates Resistance to Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Neoplasia*. 2013; **15**: 11-22.

Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Perez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer cell*. 2007; **11**: 291-302.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 1996; **271**: 350-3.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; **144**: 646-74.

Hannon GJ, Sun P, Carnero A, Xie LY, Maestro R, Conklin DS, Beach D. MaRX: an approach to genetics in mammalian cells. *Science*. 1999; **283**: 1129-30.

Harada R, Dufort D, Denis-Larose C, Nepveu A. Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains. *The Journal of biological chemistry*. 1994; **269**: 2062-7.

Harada R, Vadnais C, Sansregret L, Leduy L, Berube G, Robert F, Nepveu A. Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA replication genes. *Nucleic acids research*. 2008; **36**: 189-202.

Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer research*. 2005; **25**: 3327-33.

Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012; **4**.

Heinemann DE, Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, Koster G. Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2000; **82**: 283-9.

Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGFbeta in cancer. *FEBS letters*. 2012; **586**: 1959-70.

Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, Keegan AD. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Science signaling*. 2008; **1**: ra17.

Hiltbold EM, Ciborowski P, Finn OJ. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cells. *Cancer research*. 1998; **58**: 5066-70.

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*. 2003; **4**: 437-50.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell*. 2005; **7**: 469-83.

Huth J, Buchholz M, Kraus JM, Schmucker M, von Wichert G, Krndija D, Seufferlein T, Gress TM, Kestler HA. Significantly improved precision of cell migration analysis in time-lapse video microscopy through use of a fully automated tracking system. *BMC cell biology*. 2010; **11**: 24.

Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 1999; **79**: 1553-63.

Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 2013; **108**: 914-23.

Itakura J, Ishiwata T, Friess H, Fujii H, Matsumoto Y, Buchler MW, Korc M. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1997; **3**: 1309-16.

Jinfeng M, Kimura W, Sakurai F, Moriya T, Mizutani M, Hirai I. Prognostic role of angiogenesis and its correlations with thymidine phosphorylase and p53 expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Hepato-gastroenterology*. 2007; **54**: 1635-40.

Jungert K, Buck A, von Wichert G, Adler G, König A, Buchholz M, Gress TM, Ellenrieder V. Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells. *Cancer research*. 2007; **67**: 1563-70.

Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999; **18**: 6867-74.

Kawahara A, Hattori S, Akiba J, Nakashima K, Taira T, Watari K, Hosoi F, Uba M, Basaki Y, Koufujii K, Shirouzu K, Akiyama S, Kuwano M, Kage M, Ono M. Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. *Oncology reports*. 2010; **24**: 405-15.

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*. 2007; **13**: 460-9.

Kedinger V, Sansregret L, Harada R, Vadnais C, Cadieux C, Fathers K, Park M, Nepveu A. p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *The Journal of biological chemistry*. 2009; **284**: 27701-11.

Khanna-Gupta A, Zibello T, Sun H, Lekstrom-Himes J, Berliner N. C/EBP epsilon mediates myeloid differentiation and is regulated by the CCAAT displacement protein (CDP/cut). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; **98**: 8000-5.

Kiernan R, Bres V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, Jin DY, Emiliani S, Benkirane M. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *The Journal of biological chemistry*. 2003; **278**: 2758-66.

Kim EC, Lau JS, Rawlings S, Lee AS. Positive and negative regulation of the human thymidine kinase promoter mediated by CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dbpA, and CDP/cut. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1997; **8**: 1329-38.

Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, Kohno K, Umezawa K, Iguchi H, Shirouzu K, Takamori S, Kuwano M, Ono M. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer science*. 2007; **98**: 2009-18.

Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, Schoeb TR, Grizzle WE, Klug CA. Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer research*. 2007; **67**: 8121-30.

Krug S, Michl P. New developments in pancreatic cancer treatment. *Minerva gastroenterologica e dietologica*. 2012; **58**: 427-43.

Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004; **63**: 774-84.

Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Gottfried E, Brockhoff G, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M. [The "classical" macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 2003; **87**: 215-23.

Kurahara H, Shinchu H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *The Journal of surgical research*. 2011; **167**: e211-9.

Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchu H, Natsugoe S. M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage Infiltration of Regional Lymph Nodes Is Associated With Nodal Lymphangiogenesis and Occult Nodal Involvement in pN0 Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2012.

Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas*. 2003; **26**: 344-9.

Kyriazis AP, Kyriazis AA, Scarpelli DG, Fogh J, Rao MS, Lepera R. Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. *The American journal of pathology*. 1982; **106**: 250-60.

Lackner C, Jukic Z, Tsybrovskyy O, Jatzko G, Wette V, Hoefler G, Klimpfinger M, Denk H, Zatloukal K. Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2004; **445**: 160-7.

Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2007; **29**: 738-44.

Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews Immunology*. 2011; **11**: 750-61.

Lee JC, Lee KM, Kim DW, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *Journal of immunology*. 2004; **172**: 7335-40.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer research*. 1996; **56**: 4625-9.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*. 2006; **24**: 99-146.

Li S, Moy L, Pittman N, Shue G, Aufiero B, Neufeld EJ, LeLeiko NS, Walsh MJ. Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *The Journal of biological chemistry*. 1999; **274**: 7803-15.

Lievens PM, Donady JJ, Tufarelli C, Neufeld EJ. Repressor activity of CCAAT displacement protein in HL-60 myeloid leukemia cells. *The Journal of biological chemistry*. 1995; **270**: 12745-50.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine*. 2001; **193**: 727-40.

Linder S, Blasjo M, von Rosen A, Parrado C, Falkmer UG, Falkmer S. Pattern of distribution and prognostic value of angiogenesis in pancreatic duct carcinoma: a semiquantitative immunohistochemical study of 45 patients. *Pancreas*. 2001; **22**: 240-7.

Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *International journal of oncology*. 2000; **17**: 445-51.

Lohr M, Maisonneuve P, Lowenfels AB. K-Ras mutations and benign pancreatic disease. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 2000; **27**: 93-103.

Luo W, Skalnik DG. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1996; **271**: 18203-10.

Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC cancer*. 2010; **10**: 112.

Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005; **121**: 977-90.

Mailly F, Berube G, Harada R, Mao PL, Phillips S, Nepveu A. The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy. *Molecular and cellular biology*. 1996; **16**: 5346-57.

Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003; **16**: 902-12.

Maitra U, Seo J, Lozano MM, Dudley JP. Differentiation-induced cleavage of Cutl1/CDP generates a novel dominant-negative isoform that regulates mammary gene expression. *Molecular and cellular biology*. 2006; **26**: 7466-78.

Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+)) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001; **42**: 1414-21.

Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruszniewski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002; **51**: 849-52.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology*. 2013; **229**: 176-85.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004; **25**: 677-86.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002; **23**: 549-55.

Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology*. 2006; **177**: 7303-11.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009; **27**: 451-83.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008; **13**: 453-61.

Menen RS, Hassanein MK, Momiyama M, Suetsugu A, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. Tumor-educated macrophages promote tumor growth and peritoneal metastasis in an orthotopic nude mouse model of human pancreatic cancer. *In vivo*. 2012; **26**: 565-9.

Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer. *Gut*. 2013; **62**: 317-26.

Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulosom R, D'Arrigo C, Ryder K, Menke A, Gress T, Downward J. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer cell*. 2005; **7**: 521-32.

Moon NS, Premdas P, Truscott M, Leduy L, Berube G, Nepveu A. S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein. *Molecular and cellular biology*. 2001; **21**: 6332-45.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008; **8**: 958-69.

Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stange G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research*. 2010; **70**: 5728-39.

Nishio H, Walsh MJ. CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; **101**: 11257-62.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; **194**: 23-8.

Ojalvo LS, King W, Cox D, Pollard JW. High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *The American journal of pathology*. 2009; **174**: 1048-64.

Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002; **283**: R7-28.

Ong SM, Tan YC, Beretta O, Jiang D, Yeap WH, Tai JJ, Wong WC, Yang H, Schwarz H, Lim KH, Koh PK, Ling KL, Wong SC. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *European journal of immunology*. 2012; **42**: 89-100.

Pattison S, Skalnik DG, Roman A. CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. *Journal of virology*. 1997; **71**: 2013-22.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2004; **4**: 71-8.

Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; **106**: 14978-83.

Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *Journal of immunology*. 2012; **189**: 3439-48.

Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochemical pharmacology*. 2004; **68**: 1221-9.

Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *The Journal of experimental medicine*. 1976; **143**: 1528-33.

Riboldi E, Porta C, Morlacchi S, Viola A, Mantovani A, Sica A. Hypoxia-mediated regulation of macrophage functions in pathophysiology. *International immunology*. 2013; **25**: 67-75.

Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P. WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2007; **28**: 1178-87.

Ripka S, Neesse A, Riedel J, Bug E, Aigner A, Poulsom R, Fulda S, Neoptolemos J, Greenhalf W, Barth P, Gress TM, Michl P. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut*. 2010; **59**: 1101-10.

Ripka S, Riedel J, Neesse A, Griesmann H, Buchholz M, Ellenrieder V, Moeller F, Barth P, Gress TM, Michl P. Glutamate receptor GRIA3--target of CUX1 and mediator of tumor progression in pancreatic cancer. *Neoplasia*. 2010; **12**: 659-67.

Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *The Journal of biological chemistry*. 2009; **284**: 34342-54.

Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2005; **70**: 461-7.

Rong Zeng W, Soucie E, Sung Moon N, Martin-Soudant N, Berube G, Leduy L, Nepveu A. Exon/intron structure and alternative transcripts of the CUTL1 gene. *Gene*. 2000; **241**: 75-85.

Ruggeri B, Zhang SY, Caamano J, DiRado M, Flynn SD, Klein-Szanto AJ. Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene*. 1992; **7**: 1503-11.

Ryschich E, Notzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, Weitz J, Frohlich B, Klar E, Buchler MW, Schmidt J. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005; **11**: 498-504.

Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-

associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research*. 2006; **66**: 11432-40.

Sahin H, Borkham-Kamphorst E, Kuppe C, Zaldivar MM, Grouls C, Al-samman M, Nellen A, Schmitz P, Heinrichs D, Berres ML, Doleschel D, Scholten D, Weiskirchen R, Moeller MJ, Kiessling F, Trautwein C, Wasmuth HE. Chemokine Cxcl9 attenuates liver fibrosis-associated angiogenesis in mice. *Hepatology*. 2012; **55**: 1610-9.

Sanderson RJ, Bird KE. Cell separations by counterflow centrifugation. *Methods in cell biology*. 1977; **15**: 1-14.

Sansregret L, Goulet B, Harada R, Wilson B, Leduy L, Bertoglio J, Nepveu A. The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Molecular and cellular biology*. 2006; **26**: 2441-55.

Sansregret L, Nepveu A. The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene*. 2008; **412**: 84-94.

Satoh K, Shimosegawa T, Hirota M, Koizumi M, Toyota T. Expression of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) and its receptors in pancreatic duct cell carcinoma and in chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1998; **16**: 468-74.

Schmitz-Winnenthal FH, Volk C, Z'Graggen K, Galindo L, Nummer D, Ziouta Y, Bucur M, Weitz J, Schirmacher V, Buchler MW, Beckhove P. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer research*. 2005; **65**: 10079-87.

Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*. 2004; **5**: 1348-58.

Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2000; **88**: 2239-45.

Sharma M, Brantley JG, Vassmer D, Chaturvedi G, Baas J, Vanden Heuvel GB. The homeodomain protein Cux1 interacts with Grg4 to repress p27 kip1 expression during kidney development. *Gene*. 2009; **439**: 87-94.

Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS, Obin MS. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes*. 2010; **59**: 1171-81.

Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Molecular and cellular biology*. 1999; **19**: 6367-78.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*. 2012; **122**: 787-95.

Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *Journal of immunology*. 2000; **164**: 762-7.

Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003; **3**: 807-21.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013; **63**: 11-30.

Skalnik DG, Strauss EC, Orkin SH. CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1991; **266**: 16736-44.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2009; **86**: 1065-73.

Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2010; **362**: 875-85.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine*. 1992; **176**: 287-92.

Streit S, Michalski CW, Erkan M, Friess H, Kleeff J. Confirmation of DNA microarray-derived differentially expressed genes in pancreatic cancer using quantitative RT-PCR. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 2009; **9**: 577-82.

Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *Journal of virology*. 2000; **74**: 2489-501.

Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996; **380**: 627-30.

Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 2005; **8**: 369-80.

Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual review of pathology*. 2006; **1**: 119-50.

Torroella-Kouri M, Ma X, Perry G, Ivanova M, Cejas PJ, Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Lopez DM. Diminished expression of transcription factors nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer binding protein underlies a novel tumor evasion mechanism affecting macrophages of mammary tumor-bearing mice. *Cancer research*. 2005; **65**: 10578-84.

Torroella-Kouri M, Silvera R, Rodriguez D, Caso R, Shatry A, Opiela S, Ilkovitch D, Schwendener RA, Iragavarapu-Charyulu V, Cardentey Y, Strbo N, Lopez DM. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer research*. 2009; **69**: 4800-9.

Truscott M, Denault JB, Goulet B, Leduy L, Salvesen GS, Nepveu A. Carboxyl-terminal proteolytic processing of CUX1 by a caspase enables transcriptional activation in proliferating cells. *The Journal of biological chemistry*. 2007; **282**: 30216-26.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1980; **26**: 171-6.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature*. 1988; **334**: 260-2.

Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K, Ishii E, Hanada R, Ohki M, Aburatani H, Hayashi Y. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer research*. 2003; **63**: 4882-7.

Ueda Y, Su Y, Richmond A. CCAAT displacement protein regulates nuclear factor-kappa beta-mediated chemokine transcription in melanoma cells. *Melanoma research*. 2007; **17**: 91-103.

Valledor AF, Xaus J, Comalada M, Soler C, Celada A. Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of immunology*. 2000; **164**: 29-37.

Van den Bossche J, Bogaert P, van Hengel J, Guerin CJ, Berx G, Movahedi K, Van den Bergh R, Pereira-Fernandes A, Geuns JM, Pircher H, Dorny P, Grooten J, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. *Blood*. 2009; **114**: 4664-74.

van Gurp MF, Pratap J, Luong M, Javed A, Hoffmann H, Giordano A, Stein JL, Neufeld EJ, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. The CCAAT displacement protein/cut homeodomain protein represses osteocalcin gene transcription and forms complexes with the retinoblastoma protein-related protein p107 and cyclin A. *Cancer research*. 1999; **59**: 5980-8.

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine*. 1993; **178**: 605-13.

Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *The Journal of biological chemistry*. 2000; **275**: 36653-8.

Whitcomb DC. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004; **287**: G315-9.

Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *Journal of immunology*. 2004; **172**: 567-76.

Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology*. 2010; **31**: 220-7.

Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Kato Y, Aizawa M, Ochiai A. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer science*. 2012.

Yu Z, Zhang W, Kone BC. Histone deacetylases augment cytokine induction of the iNOS gene. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002; **13**: 2009-17.

Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjallman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *British journal of cancer*. 2006; **95**: 272-81.

Zhang BC, Gao J, Wang J, Rao ZG, Wang BC, Gao JF. Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Medical oncology*. 2011; **28**: 1447-52.

Zhang W, Kone BC. NF-kappaB inhibits transcription of the H(+)-K(+)-ATPase alpha(2)-subunit gene: role of histone deacetylases. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002; **283**: F904-11.

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular cell*. 2002; **9**: 625-36.

Zhongqiu W, Guangming L, Jieshou L, Xinhua Z, Ziqian C, Kui M. The comparative study of tumor angiogenesis and CT enhancement in pancreatic carcinoma. *European journal of radiology*. 2004; **49**: 274-80.

Zhou H, Liao J, Aloor J, Nie H, Wilson BC, Fessler MB, Gao HM, Hong JS. CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *Journal of immunology*. 2013; **190**: 115-25.

Zhou Q, Peng RQ, Wu XJ, Xia Q, Hou JH, Ding Y, Zhou QM, Zhang X, Pang ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhang XS. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *Journal of translational medicine*. 2010; **8**: 13.

Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1988; **41**: 456-61.

7. Anhang

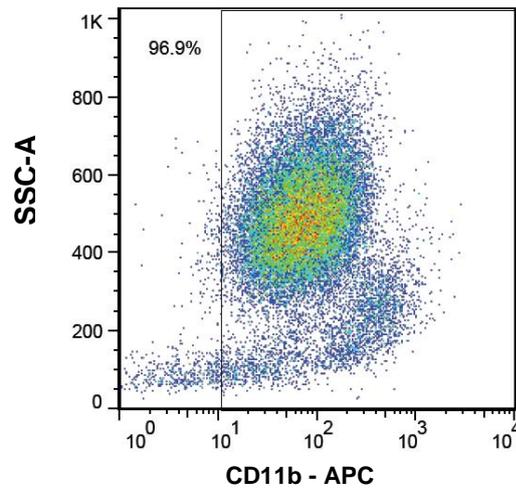


Abbildung 28: Überprüfung des Anteils an CD11b⁺-Zellen aus den isolierten Zellen. FACS-Analyse der aus Pankreata von LSL-*Kras*^{G12D/+}; LSL-*Trp53*^{R172H/+}; *Pdx-1-Cre* Mäusen isolierten Zellen. Verwendet wurde ein CD11b-APC Antikörper.

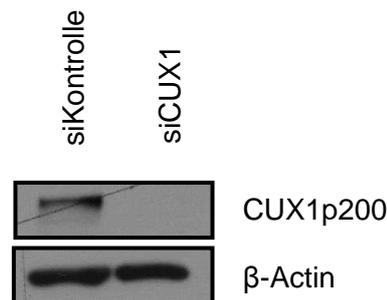


Abbildung 29: CUX1 Knockdown-Effizienz in J774.A1. Immunoblot-Analyse von J774.A1 48 Stunden nach Transfektion von gegen CUX1 gerichteter siRNA.

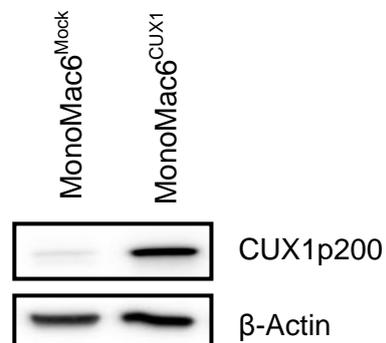


Abbildung 30: Überexpression von CUX1 in MonoMac6. Immunoblot-Analyse von mittels retroviraler Transduktion stabil CUX1-überexprimierenden MonoMac6 (MonoMac6^{CUX1}) und entsprechenden Leervektor-Kontrollen (MonoMac6^{mock}).

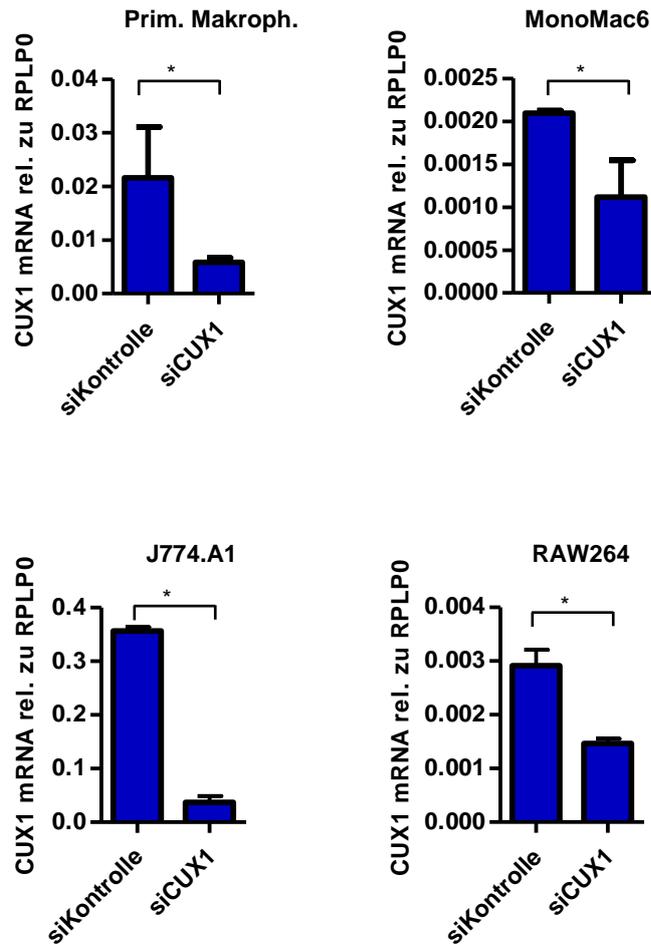


Abbildung 31: Knockdown-Effizienz. QRT-PCR -Analyse von monozytären Zellen 24 Stunden nach Transfektion von gegen CUX1 gerichteter siRNA.

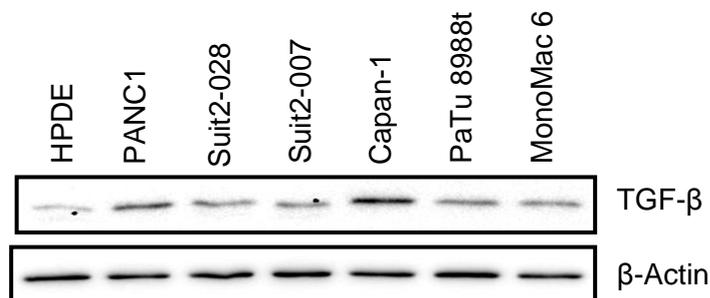


Abbildung 32: TGF-β in Zelllinien. Immunoblot-Analyse der TGF-β Expression in verschiedenen Zelllinien.

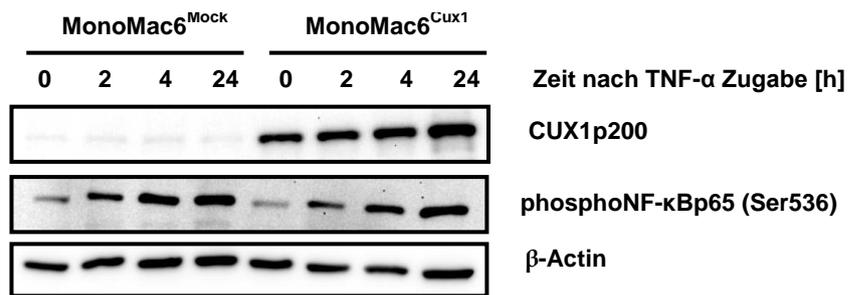


Abbildung 33: CUX1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von NF-κBp65 an Serin 536. Immunoblot-Analyse der Phosphorylierung von NF-κBp65 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 20 ng/ml TNF-α.

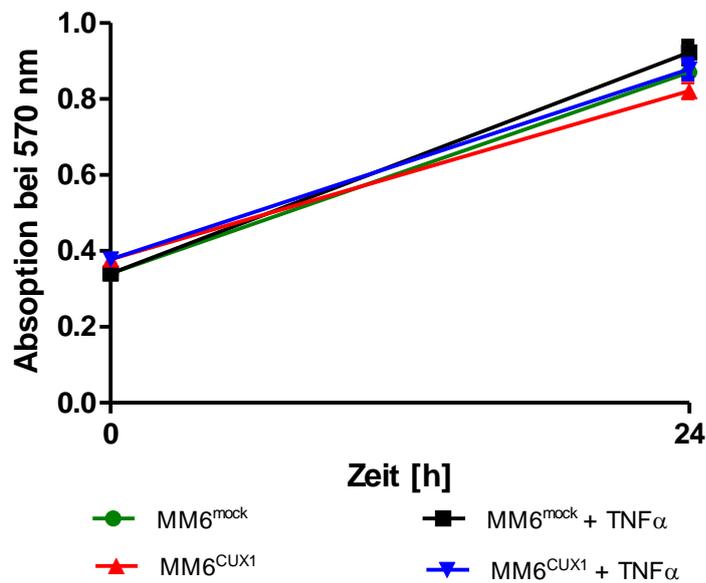


Abbildung 34: CUX1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl von MonoMac6 in einem Zeitraum von 24 Stunden. MTT-Assay von MonoMac6^{CUX1} und MonoMac6^{Mock} jeweils +/- 20 ng/ml TNF-α.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin
μ M	Micromolar
A	Adenosin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cDNA	Complementary DNA
CDP	CCAAT-Displacement Protein
COX2	Cyclooxygenase 2
CUX1	Cut-like homeobox 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Abkürzung	Name
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epidermal-Mesenchymal Transition
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
I κ B	Inhibitor of Kappa B
kb	Kilo-Basepaar
kDa	Kilo-Dalton
IKK	Inhibitor of Kappa B Kinase
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MDSC	Meyloid Derived Suppressor Cell

Abkürzung	Name
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	Non Essential Amino Acids
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
oNPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PSC	Pancreatic Stellate Cell
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RNAi	RNA interference
rpm	Rounds per Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RSV	Rous Sarcoma Virus
SDS	Sodium dodecyl sulfate

Abkürzung	Name
siRNA	Small interfering RNA
SDS	Sodium-Dodecyl-sulfat
siRNA	small interfering RNA
SMAD	SMA (small body size)-MAD (mothers against decapentaplegic)
SNAI	Snail Family Zinc Finger 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	Thymin
TAM	Tumor-associated Macrophage
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth-factor β
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor α
Treg	Regulatory T-Lymphocyte
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
Tween [®] 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: H&E-Färbung eines gesunden Pankreas und eines Pankreaskarzinoms.	4
Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht über die Polarisierung von Makrophagen.....	8
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von CUX1 an humanen Pankreasgeweben.	11
Abbildung 4: CUX1 wird von einem Teil der tumorassoziierten Makrophagen des humanen Pankreaskarzinoms exprimiert.	53
Abbildung 5: CUX1 mRNA ist in CD11b ⁺ -Makrophagen aus invasiven Pankreaskarzinomen gegenüber denen Pankreata ohne invasive Tumore erhöht.....	54
Abbildung 6: CUX1-Protein und -mRNA in monozytären Zellen werden durch Stimulation mit TGF- β 1 erhöht.	55
Abbildung 7: Die Co-Kultivierung von Pankreaskarzinomzellen und monozytären Zellen führt zu erhöhten CUX1-Levels in den monozytären Zellen.	56
Abbildung 8: CUX1 beeinflusst die mRNA-Level M1-assoziiierter Zytokine.	57
Abbildung 9: CUX1 moduliert die mRNA und Proteinexpression von CCL5 und CXCL10 in J774.A1 Zellen.....	58
Abbildung 10: CUX1 moduliert die mRNA und Proteinexpression von CCL5 und CXCL10 in RAW264- und MonoMac6-Zellen sowie primären humanen Makrophagen.	59
Abbildung 11: Überexpression von CUX1 reprimiert die TNF- α -induzierte mRNA-Expression von CCL5 und CXCL10 in MonoMac6-Zellen.	60
Abbildung 12: CUX1 inhibiert die Aktivität des <i>CCL5</i> - und des <i>CXCL10</i> -Promotors....	61
Abbildung 13: Die Expression von STATs und NF- κ Bs in MonoMac6 ist unbeeinflusst durch eine Überexpression von CUX1.	62
Abbildung 14: Die Lokalisation von STATs und NF- κ Bs ist unbeeinflusst von CUX1. .	63
Abbildung 15: Putative CUX1-Bindestellen in enger Nachbarschaft zu Bindestellen für NF- κ B in den humanen Promotoren von <i>CCL5</i> und <i>CXCL10</i>	64

Abbildung 16: Mutation der CUX1-Bindesequenzen im CXCL10-Reporterkonstrukt hebt die Repression durch CUX1 teilweise auf.	65
Abbildung 17: CUX1 bindet <i>in vitro</i> an die Sequenzen der Promotoren von CCL5 und CXCL10.....	65
Abbildung 18: CUX1 reduziert die DNA-Bindung von NF- κ Bp65 an den CXCL10-Promotor <i>in vitro</i>	66
Abbildung 19: CUX1 reduziert die DNA-Bindung von NF- κ Bp65 an den CXCL10-Promotor <i>in vivo</i>	67
Abbildung 20: CUX1 reduziert Acetylierung von NF- κ Bp65 an Lysin310.....	68
Abbildung 21: CUX1 interagiert mit NF- κ Bp65.	69
Abbildung 22: CUX1 interagiert mit HDAC1.	70
Abbildung 23: CCL5 und CXCL10 wirken als Attraktanten von CD8 ⁺ -Zellen.	71
Abbildung 24: CUX1 Expression in Makrophagen inhibiert die chemotaktische Wirkung auf CD8 ⁺ -Lymphozyten.....	72
Abbildung 25: Rekombinantes CXCL10 inhibiert die Bildung von gefässartigen „Tubes“ durch HMEC-1 Zellen.	73
Abbildung 26: CUX1-Expression in Makrophagen fördert die Bildung von Tubes <i>in vitro</i>	74
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Rolle von CUX1 in TAMs.....	85
Abbildung 28: Überprüfung des Anteils an CD11b ⁺ -Zellen aus den isolierten Zellen.	117
Abbildung 29: CUX1 Knockdown-Effizienz in J774.A1.....	117
Abbildung 30: Überexpression von CUX1 in MonoMac6.....	117
Abbildung 31: Knockdown-Effizienz.	118
Abbildung 32: TGF- β in Zelllinien.	118
Abbildung 33: CUX1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von NF- κ Bp65 an Serin 536.	119

Abbildung 34: CUX1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl von MonoMac6 in einem Zeitraum von 24 Stunden. 119

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	16
Tabelle 3: Enzyme	19
Tabelle 4: Standards.....	19
Tabelle 5: Oligonukleotide für DNA-Pulldown	20
Tabelle 6: Primer für ortsgerichtete Mutagenese.....	21
Tabelle 7: Primer für Sequenzierung.....	21
Tabelle 8: Primer für cDNA-Synthese	21
Tabelle 9: Primer für RT-PCR	22
Tabelle 10: Small Interfering RNA.....	23
Tabelle 11: Reporter-Konstrukte	23
Tabelle 12: Expressions-Konstrukte.....	24
Tabelle 13: Primäre Antikörper	24
Tabelle 14: Sekundäre Antikörper.....	26
Tabelle 15: Reagenzien und Kits	26
Tabelle 16: Nährmedien und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen	28
Tabelle 17: Säugerzellen	29
Tabelle 18: Software	31

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Buchholz, Exner, Gress, Griesmann, Milosevic, Ripka, Schäfer, Singh, Singh, Weihe, Michl, Yu.

in Oldenburg:

Ahrichs, Ammermüller, Berthe-Corti, Brinkhoff, Bolhuis, Butte, Cypionka, De Vries, Dürselen, Eber, Finch, Friedl, Goldbaum, Harmand, Harms, Haeseler, Huntke, Janssen-Bienhold, Klump, Koch, Kretzberg, Kroencke, Langemann, Martens, Metzling, Müller, Palinksa, Rhiel, Richter-Landsberg, Riedel, Schminke, Simon, Scholten, Sommer, Verhey, Wackernagel, Weiler, Winkler, Witte, Wittstock.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung für Gastroenterologie anzufertigen. Besonderer Dank gilt darüberhinaus Prof. Dr. Patrick Michl für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die in jeglicher Sicht gewährte Unterstützung.

Dr. Shiv Singh, Dr. Malte Buchholz, Dr. Nai-Ming Chen, Dr. Elisabeth Glesel und Dr. Michael Schipper danke ich für den Gedankenaustausch, Anregungen und den Spaß an der Zusammenarbeit.

Darüberhinaus danke ich den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Leonie Mühlberg, Dr. Nada Milosevic, Eleni Aprin, Carolin Lölkes, Jan Riedel und Dr. Sebastian Krug für ihre Unterstützung und das oftmals freundliche Arbeitsklima.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitgliedern der AG-Ellenrieder für ihre fachliche Hilfe sowie moralische Unterstützung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung insbesondere meinem Bruder Timo und meinem Vater Rainer für das Korrekturlesen der Arbeit.