

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Charakterisierung NFATc1-abhängiger transkriptioneller Mechanismen
während der inflammationsinduzierten Pankreaskarzinomentstehung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg vorgelegt von

Lisanne Regul aus Wolfen

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 23.08.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. V. Ellenrieder

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. V. Fendrich

Allen Pankreaskarzinompatienten

In Erinnerung an meinen Opa Volker Regul

Inhalt

Inhalt

Inhalt.....	VIII
Zusammenfassung.....	XI
Summary.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie	1
1.1.2 Pathophysiologie und Karzinogenese des Pankreas	2
1.2 <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>	5
1.2.1 Struktur und Funktion	5
1.2.2 Aktivierung von NFAT durch den Calcium-Calcineurin-Signalweg.....	6
1.2.3 Die Funktion von NFAT im Pankreaskarzinom	8
1.3 <i>Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)</i>	10
1.3.1 Regulation und Funktion	10
1.3.2 Die Bedeutung von EGFR im Pankreaskarzinom	11
2 Zielsetzung.....	13
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Laborgeräte	14
3.2 Materialien	16
3.3 Chemikalien.....	18
3.4 Kits.....	22
3.5 Enzyme	23
3.6 Puffer.....	23
3.6.1 Zellysepuffer	23
3.6.2 Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.6.3 Puffer für Western Blot	25
3.6.4 Waschen und Entwickeln der Nitrocellulosemembran.....	25
3.6.5 Agarose-Gel-Elektrophorese	26
3.6.6 Reagenzien für Chromatinimmunpräzipitation.....	26

Inhalt

3.6.7	Puffer für Immunhistochemie	28
3.6.8	Sonstige Puffer.....	29
3.6.9	Lösungen für die Azinuszellisolation	29
3.7	Kultivierung von Azinuszellen	30
3.7.1	Azinuszellextraktion.....	30
3.7.2	Behandlung der Azini.....	31
3.8	Zellbiologische Methoden.....	32
3.8.1	Verwendete Zelllinien.....	32
3.8.2	Zellkultivierung	32
3.8.3	Zellpassage.....	32
3.8.4	Zellzahlermittlung.....	32
3.8.5	Langzeitkonservierung.....	33
3.8.6	Zelltransfektion.....	33
3.8.7	Zelltransfektion mit Lipofectamin	33
3.8.8	Transiente Transfektion von siRNA	34
3.8.9	Luciferase Reporter Assay	35
3.8.10	Zellbehandlung	35
3.9	Tierversuche	36
3.9.1	Verwendete transgene Mausmodelle.....	36
3.9.2	Verpaarung und Haltung	37
3.9.3	Genotypisierung	37
3.9.4	Agarosegelelektrophorese	40
3.9.5	Behandlung.....	41
3.10	Molekularbiologische Methoden	42
3.10.1	RNA-Analysen	42
3.10.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.10.3	c-DNA-Transkription	43
3.10.4	Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR).....	44
3.11	Proteinbiochemische Methoden	45
3.11.1	Proteinisolation	45
3.11.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	46
3.11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
3.11.4	Western Blot.....	47

Inhalt

3.11.5	Immunpräzipitation	48
3.11.6	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	49
3.12	Histologie.....	52
3.13	Statistische Auswertung.....	54
4	Ergebnisse	55
4.1	NFATc1-Expression in der entzündungsgetriggerten ADM des Pankreas	55
4.2	Die Hemmung von NFATc1 vermindert die EGFR-induzierte ADM <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	60
4.3	Die EGFR-abhängige Aktivierung von AP-1-Proteinen in der ADM des Pankreas.....	64
4.4	Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun	66
4.5	Die EGFR-vermittelte NFATc1;c-Jun-Interaktion reguliert die Expression von Sox9	68
5	Diskussion.....	73
5.1	Der Verlust von NFATc1 verhindert die EGFR-abhängige azinär-duktale Transdifferenzierung in der inflammationsassoziierten Pankreaskarzinomentstehung	73
5.2	Die EGFR-Aktivierung in der ADM des Pankreas induziert die Komplexbildung von NFATc1 und c-Jun.....	75
5.3	Die Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun vermittelt die Sox9-Expression während der EGFR-Signalweg-induzierten ADM.....	77
5.4	Schlussfolgerung	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Anhang	95
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	95
7.2	Tabellenverzeichnis.....	96
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	96
7.4	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	100
7.5	Danksagung	101

Zusammenfassung

Die onkogene aktivierende Mutation von Kras stellt ein Schlüsselereignis in der Entstehung eines Pankreaskarzinoms (PDAC) dar und findet sich bereits in metaplastischen exokrinen Arealen des Organs. Allerdings ist die isolierte onkogene Aktivierung von Kras nicht suffizient, um die Pankreaskarzinogenese über die Stadien der Präinvasivität hinaus zu akzelerieren, sondern setzt die funktionelle Kooperation mit inflammatorischen Signalwegen voraus, die z.B. im Kontext einer chronischen Pankreatitis induziert werden. Zu den zentralen inflammationsresponsiven Ereignissen in der Karzinogenese des Pankreas zählt die Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege. Trotz zahlreicher Arbeiten, die die Relevanz der EGFR-Signaltransduktion in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms untersuchten, blieb der Mechanismus der EGFR-abhängigen azinär-duktalem Transdifferenzierung bisher ungeklärt.

In Vorarbeiten charakterisierte die Arbeitsgruppe von Prof. Ellenrieder den inflammatorischen Transkriptionsfaktor *Nuclear Activated Factor of T-cells c1* (NFATc1) als essentielles onkogenes Protein in der Genese und Progression des Pankreaskarzinoms. In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von NFATc1 innerhalb der inflammationsgetriggerten, EGFR-abhängigen Pankreaskarzinomentstehung untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine robuste EGFR-abhängige Induktion der NFATc1-Expression in metaplastischen Pankreasarealen. Mechanistisch begünstigt die Aktivierung des EGFR-Signalwegs die Bildung eines NFATc1;c-Jun-Partnerkomplexes, der durch direkte Promotorbindung die transkriptionelle Aktivierung des epithelialen Transkriptionsfaktors Sox9 kontrolliert und somit azinär-duktalem Transdifferenzierungsvorgänge initiiert. Die pharmakologische und genetische NFATc1-Inhibition hingegen führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Reduktion der EGFR-vermittelten azinär-duktalem Transdifferenzierung und Pankreasmetaplasie. Diese Arbeit beschreibt NFATc1 als zentralen Mediator duktalem Transdifferenzierungsprozesse in der EGFR-vermittelten Pankreaskarzinomentstehung

Zusammenfassung

und charakterisiert den Transkriptionsfaktor als vielversprechendes Zielprotein für pharmakologische Ansätze der Pankreaskarzinomprophylaxe bei Patienten mit chronischer Pankreatitis.

Summary

Summary

Acinar-to-ductal Metaplasia (ADM) constitutes the first step in pancreatic carcinogenesis. On the molecular level, ADM formation and pancreatic cancer (PDAC) initiation are linked to activating oncogenic mutation of Kras. Although Kras mutations have been characterized as the crucial genetic event in PDAC initiation and progression, exclusive Kras-mutation is not sufficient to drive progression of PDAC precursor lesion beyond the state of premalignancy. Instead, oncogenic activation of Kras cooperates with inflammatory signaling pathways, e.g. in context of chronic pancreatitis to promote pancreatic carcinogenesis. Inflammation-associated activation of the EGFR-signaling pathway has previously been proposed as an essential component of Kras-driven PDAC initiation and progression, although the detailed mechanisms of EGFR-dependent ADM-formation remain elusive.

Previous studies of our group characterized the inflammatory transcription factor Nuclear *Factor of Activated T-cells c1* (NFATc1) as a pivotal oncogenic driver of pancreatic carcinogenesis and PDAC progression. The aim of this thesis was to define the role of NFATc1 in inflammation induced EGFR-dependent PDAC initiation.

In vitro and *in vivo* studies reveal EGFR-dependent NFATc1-expression in metaplastic lesions of the inflammation-challenged pancreas. Upon induction of EGFR-signaling, NFATc1 forms a complex with the AP1-family protein c-Jun at the promoter of the ductal-fate determinant *Sox9* for subsequent transcriptional activation, thus inducing acinar-to-ductal transdifferentiation. In contrast, pharmacologic or genetic inhibition of NFATc1 activity effectively blocks *Sox9* transcription and prevents EGFR-dependent ADM, thus characterizing NFATc1 as a central mediator of EGFR-dependent PDAC initiation.

Therefore, pharmacological approaches that interfere with NFATc1 activation might represent a promising strategy to prevent PDAC development in high risk chronic pancreatitis patients.

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Bösartige Neubildungen nahmen mit 25% die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems in Deutschland im Jahr 2013 ein (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2013). Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland ungefähr 16 080 Männer und Frauen, die etwa gleich häufig betroffen sind, neu an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und 15 487 Menschen starben daran. Damit gilt das Pankreaskarzinom mit 3,2% aller Krebsneuerkrankungen zwar nur als die 10-häufigste Krebserkrankung der Männer und mit 3,6% die 6-häufigste Tumorerkrankung der Frauen, jedoch steht es mit 6,4% bzw. 7,9% an 4. Stelle der häufigsten Krebstodesfälle (Kaatsch et al., 2013). Das aggressive Verhalten des Pankreaskarzinoms führt dazu, dass es mit 8% eine der geringsten 5-Jahres-Überlebensrate aller malignen Entitäten aufweist (Kaatsch et al., 2013). Die malignen Neubildungen des Pankreas können sowohl vom exokrinen als auch vom endokrinen Gewebe ausgehen, wobei das invasive duktales Adenokarzinom am häufigsten vorkommt (Kaatsch et al., 2013; Spalding & Williamson, 2007). Durch symptomarme Frühstadien des Pankreaskarzinoms erfolgt die Diagnosestellung häufig erst in lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadien, die eine kurative Tumoresektion verbieten. Im Rahmen von palliativen Therapiemaßnahmen wird bei entsprechendem Allgemeinzustand des Patienten entweder FOLFIRINOX oder Gemcitabine in Kombination mit Nab-Paclitaxel oder Erlotinib als Erstlinientherapie eingesetzt (Poplin et al., 2009). Als Zweitlinientherapie können verschiedene Kombinationstherapien zur Anwendung kommen, die zum Teil eine längere Überlebensdauer gewährleisten, allerdings auch höhergradige Nebenwirkungen zur Folge haben. Mit der Kombination von Gemcitabine und Erlotinib, einem EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Antagonisten, kann ein medianer Überlebensvorteil von 2 Wochen erreicht werden (Moore et al., 2007). Bei Patienten mit einem günstigen Risikoprofil (guter Allgemeinzustand, Bilirubinwert unter dem 1,5-fachen des Normwertes, Alter <75 Jahre) bietet sich eine Kombinationstherapie aus 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) an, die eine deutliche Verbesserung des medianen und progressionsfreien Überlebens zeigt. Allerdings häuft

Einleitung

sich unter dieser Therapie die Rate an höhergradigen Nebenwirkungen (Conroy et al., 2011; Seufferlein et al., 2013). Auch die Kombination von Nab-Paclitaxel (an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel) (Von Hoff et al., 2013) und Gemcitabine verspricht eine Verlängerung des medianen Überlebens (Seufferlein et al., 2013).

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 71 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen (Kaatsch et al., 2013) gilt das Pankreaskarzinom als Tumor des alten Menschen. Neben einigen wenigen Formen des hereditären Pankreaskarzinoms gibt es eine Vielzahl an Mutationen und epigenetischen Veränderungen, die als molekulare Ursachen für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms identifiziert werden konnten. Der wichtigste exogene Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist der Nikotinabusus. Rauchen verdoppelt das Risiko, an einem Adenokarzinom des Pankreas zu erkranken und 25% der Krankheitsfälle sind dem Rauchen zuzurechnen (Coughlin et al., 2000; Larsson et al., 2005; Nilsen & Vatten, 2000). Weiterhin gelten fleisch- und fettreiche Ernährung, Adipositas, niedrige Serum-Folat-Spiegel, Diabetes mellitus, Alkoholkonsum und chronische Pankreatitis als Risikofaktoren (Maitra & Hruban, 2008). Verschiedene prospektive Studien zeigen, dass Patienten, die an einer chronischen Pankreatitis leiden, ein erhöhtes Risiko haben, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken als die allgemeine Bevölkerung (Malka, 2002; Talamini et al., 1999). Patienten, die an einer chronischen Pankreatitis leiden, haben ein 4-15-fach erhöhtes Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Raimondi et al., 2010), wobei das Lebenszeitrisiko, jemals an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, 1,6% beträgt (Kaatsch et al., 2013). Allerdings entwickelten innerhalb von 20 Jahren nur etwa 5% der Patienten mit chronischer Pankreatitis ein Pankreaskarzinom (Raimondi et al., 2010).

1.1.2 Pathophysiologie und Karzinogenese des Pankreas

Analog zur Adenom-Karzinom-Sequenz in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms geht man davon aus, dass dem invasiven duktalem Pankreaskarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)*) verschiedene Vorläuferläsionen vorausgehen (Hruban et al., 2000). Die bekannten Vorstufen sind: *mucinous cystic neoplasia (MCN)*, *intraductal pancreatic mucinous neoplasia (IPMN)* und *pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)*. Letztere, die intraepithelialen Neoplasien, kommen am häufigsten vor und werden in PanIN Läsionen 1-3 unterteilt, basierend auf dem Grad der

Einleitung

zytologischen Veränderungen oder Kernatypien. Bei PanIN 1-2 handelt es sich um nichtinvasive, mikroskopische Läsionen der kleinen (<5mm Durchmesser) duktalem Zellen, die sich flach oder papillär mit säulen- oder würfelförmig angeordneten Zellen präsentieren können (Maitra & Hruban, 2008). Die PanIN-3-Vorläuferläsion gilt als Carcinoma in situ und ist durch deutliche Kernatypien, Nekrosen und irreguläre Mitosen charakterisiert (Vincent et al., 2011).

Lineage-Tracing-Experimente in genetisch veränderten Mausmodellen identifizierten die Azinuszelle als mögliche Ursprungszelle des Pankreaskarzinoms (De La O et al., 2008; Habbe et al., 2008). Man geht davon aus, dass die azinären Zellen nach Entzündungsinduktion zunächst zu Progenitorzellen dedifferenzieren und sich dann bei einem weiteren Reiz, z.B. der Stimulation durch ein Wachstumshormon, zu duktalem Zellen transdifferenzieren (Friedlander et al., 2009; Maitra & Hruban, 2008). Dieser Prozess der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) gilt als erster Schritt der Pankreaskarzinominitiation und geht der Ausbildung von PanIN-Läsionen voraus (Collins et al., 2012; Guerra et al., 2007).

Anhand molekularer Genanalysen konnte festgestellt werden, dass in Zellen des Pankreaskarzinoms, aber auch schon in den Zellen der Vorläuferläsionen zahlreiche somatische Mutationen und epigenetische Veränderungen vorliegen (Maitra & Hruban, 2008). Die am häufigsten und frühesten detektierbare Mutation ist eine aktivierende Mutation im Kodon 12 des Protoonkogens Kras. Das Adenokarzinom des Pankreas gilt als maligne Entität mit der höchsten Inzidenz an onkogenen Kras-Mutationen und in 90% aller Pankreaskarzinome liegt eine Kras-Mutation vor (Caladas & Kern, 1995). Kras gehört zur Familie der Ras-Proteine, deren Mitglieder GTP-bindende Proteine sind, die wichtige zelluläre Funktionen, wie z.B. Proliferation, Survival oder Zellmotilität regulieren (Hingorani & Tuveson, 2003). Genetisch veränderte Mausmodelle mit einer konditionalen Aktivierung von Kras (PDX1-Cre;LSL-Kras^{G12D}-Mäuse) belegten die Relevanz dieser genetischen Veränderung für die azinär-duktalem Transdifferenzierung des Pankreas und die Pankreaskarzinomprogression (Hingorani et al., 2003), zeigten aber auch, dass die alleinige Mutation von Kras nur mit einer geringen Inzidenz und einer langen Latenzzeit zur Ausbildung eines PDAC führt (Hingorani et al., 2005; Hingorani et al., 2003). Auch in einer weiteren Arbeit, die jedoch aufgrund der Nutzung eines anderen Cre-Promotorsystems nicht mit der von

Einleitung

Hingorani und Kollegen verglichen werden kann, konnte gezeigt werden, dass die Kras-Mutation zwar eine der frühesten Mutationen in der Karzinogenese des Pankreas darstellt, jedoch als isolierte genetische Veränderung nicht zur Entstehung eines PDAC führen kann. Vielmehr stoppte nach der azinär-duktalem Transdifferenzierung die Progressivität auf dem Level präinvasiver Vorläuferläsionen. Ein invasiv duktales Pankreaskarzinom entstand bei alleiniger Kras-Mutation nicht (Grippo et al., 2003).

Im Laufe der Entwicklung von intraepithelialer Neoplasie zum invasiven duktalem Pankreaskarzinom treten in transformierten exokrinen Pankreaszellen noch weitere Deletionen oder Mutationen in Tumorsuppressorgenen, Onkogenen oder Genen der Genomstabilität, sowie epigenetische Veränderungen auf (Inaktivierung des Tumorsuppressors p53, Inaktivierung von p16, Smad4, BRCA2), die mit der onkogenen Aktivierung von Kras kooperieren, um die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms voranzutreiben (Hruban et al., 2000; Maitra et al., 2005).

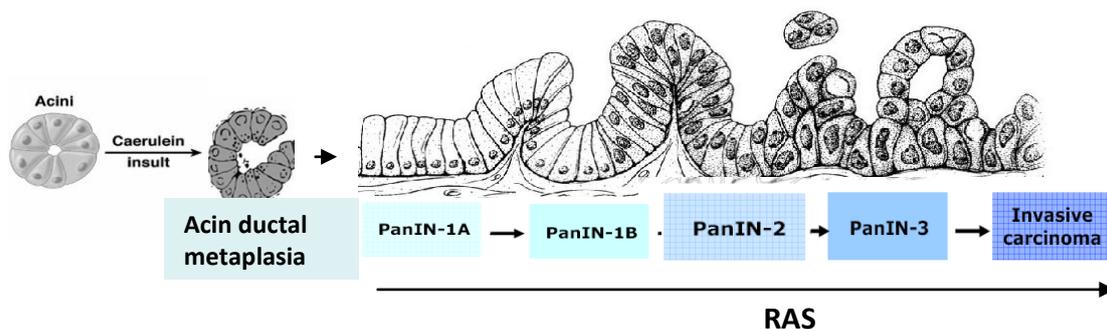


Abbildung 1: Progressionsmodell gesunder Azinuszellen zu Zellen eines invasiven duktalem Pankreaskarzinoms. Azinuszellen durchlaufen den Prozess der azinär-duktalem Metaplasie und transdifferenzieren sich zu duktalem-ähnlichen Zellen. Das Modell zeigt die Entwicklung des Pankreaskarzinoms über verschiedene Vorläuferläsionen und die Bedeutung der Mutation des Protoonkogens Kras (Hruban et al., 2008).

Zusätzlich zur Inaktivierung zentraler Tumorsuppressorgene kooperiert eine chronische Entzündung des Pankreas mit einer onkogenen Kras-Mutation in der Pankreaskarzinomentstehung (Guerra et al., 2011). Guerra und Kollegen zeigen, dass die Entzündung bei vorliegender Kras-Mutation zu einem Verlust der onkogeninduzierten Seneszenz führen kann (Guerra et al., 2011). Außerdem führt die Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung von Wachstumsfaktoren, die bei gegebener Kras-Mutation zur irreversiblen Karzinogenese des Pankreas beiträgt (Ardito et al., 2012).

Einleitung

1.2 *Nuclear Factor of Activated T-cells*

1.2.1 Struktur und Funktion

Der *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) wurde zunächst als induzierbarer Transkriptionsfaktor, der an dem Interleukin-2-Promotor bindet und somit T-Zellen aktivieren kann, beschrieben (Shaw et al., 1988). Heute ist bekannt, dass NFAT durch transkriptionelle Aktivierung inflammatorischer Zielgene, wie z.B. IL-3, GM-CSF, IL-4, IL-10 und IFN- γ zahlreiche Funktionen im Immunsystem übernimmt (Hogan et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NFAT auch über das Immunsystem hinaus eine große Bedeutung hat und ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert wird (Horsley & Pavlath, 2002). Unter anderem beeinflussen Mitglieder der NFAT-Familie die Embryogenese und Differenzierung des kardiovaskulären und renalen Systems sowie verschiedener Bindegewebszellen, wie Myozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Keratinozyten (Ranger et al., 2000; Santini et al., 2001; Yi et al., 2010; H. Zhu et al., 2014). Weiterhin reguliert NFAT die Migration von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese und die Synthese von Glukagon, Insulin und dem Glukagon-ähnlichen Peptid 1 im endokrinen Pankreas (Fürstenau et al., 1997; Hernández et al., 2001; Lawrence et al., 2014).

Mit NFAT1 (NFATc2, NFATp), NFAT2 (NFATc1, NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3, NFATx) und NFAT5 (tonicity element binding protein, TonEBP) gehören 5 Mitglieder zur NFAT-Familie, die in struktureller Hinsicht mit der Familie der Rel-Transkriptionsfaktoren (NF- κ B) verwandt sind. Das primordiale NFAT5, das sich in der Struktur des Gens stark von den anderen Familienmitgliedern unterscheidet und über alternative Signalwege reguliert wird, wird von den folgenden Betrachtungen ausgenommen (Lopez-Rodríguez et al., 1999; Macian, 2005). NFAT1-4, im Weiteren als NFAT zusammengefasst, ähneln sich im strukturellen Aufbau, besitzen allerdings alternative Genprodukte, die durch das Spleißen am N- und C-Terminus entstehen (Imamura et al., 1998). Allen Isoformen gemein ist eine regulatorische Domäne, die NFAT-homologe Region (NHR), eine *Rel-homology region* (RHR), die Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der Rel-Transkriptionsfaktoren besitzt sowie eine terminale C-Domäne (Jain et al., 1995). Innerhalb der NHR, welche eine Transaktivierungsdomäne enthält und Promotorelemente bindet, um Gentranskription zu aktivieren (Mancini & Toker, 2009), befinden sich die zur Aktivierung von NFAT

Einleitung

notwendigen Phosphorylierungsstellen, die sich in Serin-reiche (SRR 1-2) und Serin-Prolin-reiche (SP1-3) Regionen aufteilen (Okamura et al., 2000). Auch die Bindungsstelle für das ebenfalls für die Expression notwendige Calcineurin befindet sich in der NFAT-homologen Region (Macian, 2005).



Abbildung 2: Darstellung der NFAT-Struktur. TAD: Transaktivierungsdomäne, SRR: Serin-reiche Region, SP: Serin-Prolin-reiche Region, NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz (Modifiziert nach Mancini & Toker, 2009).

1.2.2 Aktivierung von NFAT durch den Calcium-Calcineurin-Signalweg

In ruhenden Zellen liegt NFAT inaktiv im Zytoplasma vor. Eine Aktivierung von NFAT erfolgt durch Ca^{2+} /Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors (Rao et al., 1997). Wenn bestimmte Liganden an den Oberflächenrezeptoren der Zellen binden, erfolgt die Aktivierung von Phospholipase C (Hogan et al., 2003), die im Folgenden Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat in Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Trisphosphonat (InsP3) spaltet. InsP3 führt zur temporären Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Calciumspeichern. Allerdings ist ein zusätzlicher extrazellulärer Calciuminflux durch das Öffnen von *Ca²⁺ release activated channels* (CRAC-Kanäle) notwendig (König et al., 2010), um durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin zu aktivieren. Durch die Bindung von Ca^{2+} an die regulatorische Untereinheit Calcineurin B erfolgt eine „Voraktivierung“, die durch die Bindung von Calmodulin an die katalytische Untereinheit Calcineurin A bis zu 20-mal verstärkt wird und die Dislokation einer autoinhibitorischen Domäne initiiert (Klee et al., 1998). Die Serin-Prolin-reichen Sequenzen der regulatorischen NFAT-homologen Region werden durch Calcineurin dephosphoryliert und nukleare Lokalisationssequenzen freigelegt. Infolge der Dephosphorylierung transloziert NFAT in den Zellkern, um Zielgene zu binden und zu regulieren (Okamura et al., 2000).

Einleitung

Die Bindung von NFAT an die DNA der Zielpromotoren und -enhancer erfolgt als Homo- oder Heterodimer durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren an der Konsensussequenz GGAAA (Graef et al., 2001; Rao et al., 1997). Die Interaktion mit NFAT-Partnerproteinen erhöht die DNA-Bindungsaffinität und bestimmt darüber hinaus die Targetgenauswahl und die Funktion der NFAT-abhängigen Transkriptionskontrolle. So wird je nach Zelltyp und Stimulus die Bindung von verschiedenen Partnern und damit die Expression verschiedene Gene kontrolliert (Macian, 2005). Dabei interagiert NFAT nicht nur mit anderen Transkriptionsfaktoren, sondern auch mit Chromatin modifizierenden Proteinen wie Histonacetylasen und Histonmethyltransferasen (Choo et al., 2009; König et al., 2010; Baumgart et al., 2012).

Die transkriptionelle Aktivität von NFAT wird durch dessen Lokalisation und Phosphorylierung bestimmt. Somit führen verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel eine fallende Calciumkonzentration oder eine gehemmte Calcineurinaktivität, zur Inaktivierung von NFAT (Klee et al., 1998; König et al., 2010). Darüber hinaus wird die Aktivität von NFAT durch verschiedene Exportkinase bestimmt (König et al., 2010). Dazu zählt Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), die nach vorheriger Vorphosphorylierung der NFAT-Proteine durch „*priming*“ Kinasen wie Protein-Kinase A (PKA) oder DYRK 1a die SP2-Region phosphoryliert und damit auch vor Degradation im Zytoplasma schützt (Beals, 1997). Die SRR1-Motive werden unter anderem von der Casein-Kinase 1 (CK1), p38 und JNK phosphoryliert und führen damit ebenso zum Export des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern (Hogan et al., 2003; Mancini & Toker, 2009).

Die vielen Regulatoren des NFAT-Signalweges eröffnen die Möglichkeit der pharmakologischen Intervention, um die NFAT-Aktivität zu hemmen. Die immunsuppressiv wirkenden Substanzen Cyclosporin A (CsA) oder FK506 (Tacrolimus), blockieren die NFAT:Calcineurin-Interaktion und hemmen somit die aktivierende Dephosphorylierung und konsekutive Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern (Buchholz & Ellenrieder, 2007; Milan et al., 1994).

Einleitung

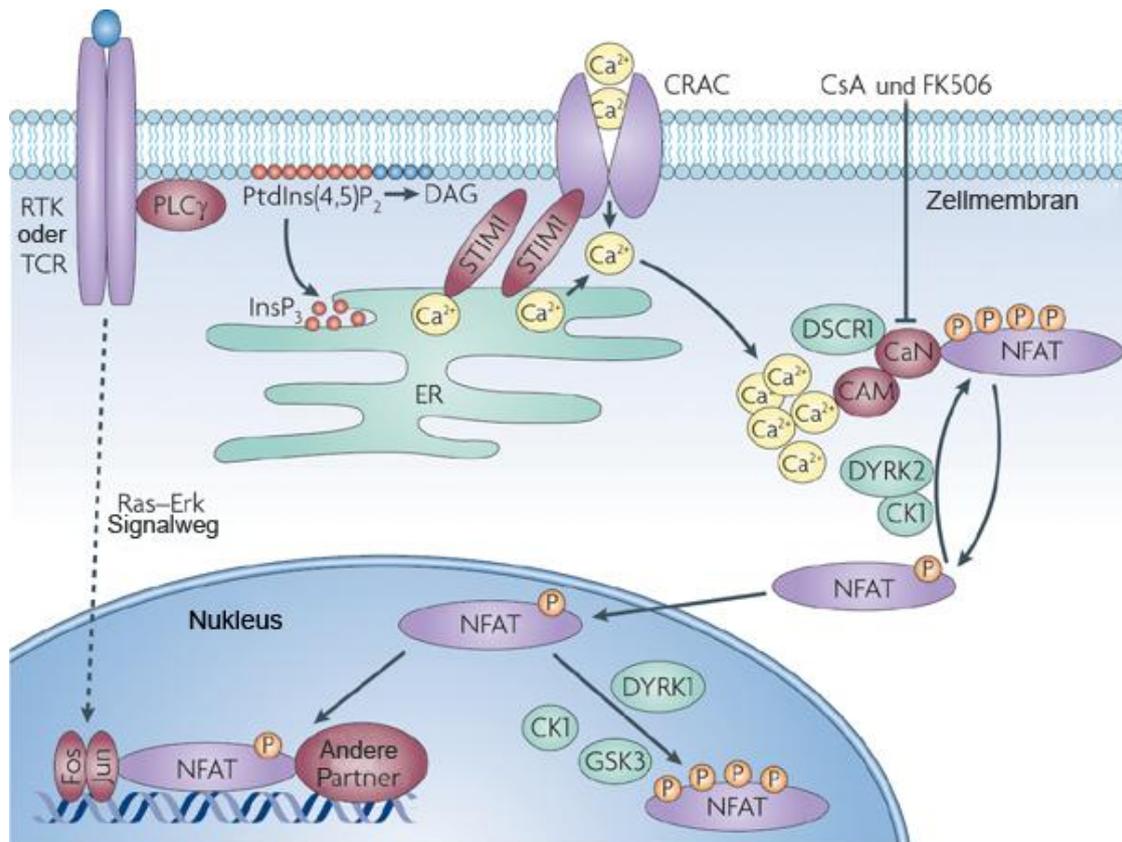


Abbildung 3: Aktivierung von NFATc2 durch den Calcium-Calcineurin-Signalweg. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert nach Ligandenbindung die Phospholipase C γ (PLC γ). Das nach der Hydrolyse entstandene InsP₃ stimuliert zusätzlich zu dem *stromal interaction molecule 1* (STIM1) die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch die steigende Ca²⁺-Konzentration wird der Calciumeinstrom von extrazellulär via Öffnung von CRAC-Kanälen stimuliert. Durch Interaktion von Ca²⁺-bindendem Calmodulin (CAM) mit der Phosphatase Calcineurin (CaN) wird das zytosolische NFAT dephosphoryliert. NFAT kann daraufhin in den Zellkern translozieren, mit Partnern an den Promotoren der Ziel-DNA binden und die Transkription starten. Die Signalkette wird unterbrochen, indem nukleare Exportkinasen (GSK3, CK1 und DYRK) NFAT rephosphorylieren und somit den nuklearen Export einleiten. Im Zellkern sorgen die Erhaltungskinasen CK1 und DYRK für die Hyperphosphorylierung von NFAT und damit für die Inaktivität von NFAT (Mancini & Toker, 2009).

1.2.3 Die Funktion von NFAT im Pankreaskarzinom

Neben den zuvor aufgeführten vielfältigen NFAT-Funktionen während der Entwicklung und Differenzierung findet sich in zahlreichen hämatologischen und soliden Tumoren eine Überexpression von Mitgliedern der NFAT-Familie (Macian, 2005; Mancini & Toker, 2009; Wu et al., 2010). Dabei fördert NFAT die Zelltransformation, Migration, Invasion oder auch die Tumorangio-genese (König et al., 2010; Robbs et al., 2008; Yiu & Toker, 2006). Den verschiedenen Isoformen von NFAT werden dabei unterschiedliche Funktionen in der Karzinogenese und Tumorprogression zugeschrieben. Während

Einleitung

NFATc1 als onkogener Transkriptionsfaktor fungiert, konnten NFATc2 sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften zugeordnet werden (Baumgart et al., 2012; Mancini & Toker, 2009; Robbs et al., 2008). Sowohl für das Pankreaskarzinom als auch für seine Vorläuferläsionen konnte im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe eine Überexpression von NFATc1 und NFATc2 nachgewiesen werden (Baumgart et al., 2012; König et al., 2010).

Eine wesentliche onkogene Funktion von NFAT ist die Kontrolle von Wachstumsfunktionen. NFAT beeinflusst den Zellzyklus durch Bindung und Aktivierung von Zellzyklusregulatoren wie CDK4, CDK6 und Cyclin D1 und erhöht somit die G1/S-Transition des Zellzyklus (Neal & Clipstone, 2003). In Verbindung mit der antiapoptotischen Wirkung von NFAT (Mancini & Toker, 2009) resultiert dies in einer stark proliferationsfördernden Funktion. Ein weiterer Mechanismus der NFAT-abhängigen Wachstumskontrolle im Pankreaskarzinom umfasst die NFAT-abhängige Verdrängung von Smad3-Repressorkomplexen vom *TGF- β inhibitory element* (TIE) des c-myc-Promotors. So trägt NFAT wesentlich zur TGF- β -abhängigen Aktivierung dieses zentralen Onkogens bei und steigert diese über eine Induktion der Zellzyklusprogression die Pankreaskarzinomzellproliferation (Singh et al., 2010; König et al., 2010).

Die onkogenen Funktionen der NFAT-Isoform c1 konnten unlängst in einem transgenen Mausmodell mit pankreasspezifischer konstitutiver Aktivierung von NFATc1 gezeigt werden. $Kras^{G12D};NFATc1$ -Mäuse wiesen im Vergleich zu $Kras^{G12D}$ -Tieren eine massiv beschleunigte Karzinogenese auf. $Kras^{G12D};NFATc1$ -Mäuse entwickelten Pankreaskarzinome mit einer Penetranz von 100%, die in ihrer Histologie und ihrem Metastasierungsverhalten sehr stark humanen Pankreaskarzinomen glichen (Baumgart et al., 2014). Molekulare und biochemische Untersuchungen in diesem Mausmodell zeigten, dass ein signifikanter Anteil der onkogenen NFATc1-Funktionen durch die funktionelle und biochemische Kooperation mit dem inflammatorischen Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3 ermöglicht wird. Über Enhancer-Promotor-Kommunikationen regulieren NFATc1 und STAT3 gemeinsame Zielgene mit funktioneller Bedeutung für Proliferation, Zellmotilität, Zellmigration und extrazelluläre Matrixregulation wie z.B. EGFR, Cyclin

Einleitung

D3, Rcan1, Matrix-Metalloproteinase 13 (Mmp13) und die Wnt-Familienmitglieder Wnt1 und Wnt10a (Baumgart et al., 2014).

Zusammengefasst ist NFATc1 ein wichtiger onkogener transkriptioneller Regulator der Genexpression während der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms und beeinflusst Prozesse des Tumorwachstums, des Survivals und der Metastasierung.

1.3 *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)

1.3.1 Regulation und Funktion

Der EGF-Rezeptor (EGFR, ErbB-1, HER-1), der auf allen epithelialen und stromalen Zellen sowie auf manchen glialen sowie glatten Muskelzellen exprimiert wird, gehört zu der Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren weitere Mitglieder HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 und HER4/ErbB-4 sind. Der transmembranäre Rezeptor teilt sich in eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne, einen transmembranären Anteil und in eine zytoplasmatische Region mit enzymatischer Aktivität (Ullrich & Schlessinger, 1990; Wells, 1999; Yarden & Schlessinger, 1987). Die Rezeptor-Tyrosinkinase kontrolliert komplexe Signal-Transduktions-Kaskaden, die überlebenswichtige Prozesse der Zelle wie Proliferation, Survival, Adhäsion, Migration und Differenzierung regulieren (Yarden, 2001). Verschiedene Liganden wie *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF)- α und Neuroreguline binden an dem extrazellulären Teil des Rezeptors und verändern die Rezeptorkonformation, sodass sie Homodimere oder Heterodimere mit verwandten Rezeptoren binden (Yosef et al., 1991). In der Folge kommt es zur Autophosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten und danach zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Honegger et al., 1990; Hunter & Cooper, 1981; Ushiro & Cohen, 1980). Zu den EGFR-abhängigen Signalkaskaden zählen der mitogenaktivierte Protein (MAP)-Kinase-Signalweg, die Phosphoinositol-Kinase, die antiapoptotische Kinase Akt und andere Faktoren, die zum Teil transkriptionsregulierende Funktionen einnehmen. Die Entscheidung welcher Signalweg aktiviert wird, wird sowohl durch die Ligandenbindung als auch durch die darauffolgende Art der Homo- oder Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors bestimmt. In der Regel werden durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors Zellwachstumsprozesse initiiert (Wells, 1999; Yarden, 2001; Yarden & Kelman, 1991).

Mit der Aktivierung des EGF-Rezeptors wird auch zeitgleich die Inhibition des Rezeptors im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus aktiviert. Einerseits

Einleitung

kommt es durch eine Protein-Tyrosinkinase zur Dephosphorylierung des Rezeptors, andererseits wird ein *Son of Sevenless* (SOS) ähnliches Molekül gehemmt und hindert somit die Ausbreitung der Signalkaskade durch Inhibition von Ras bzw. des MAP-Kinase-Signalwegs (Douville & Downward, 1997). Außerdem kann EGFR nach posttranslationaler Modifikation durch die Ubiquitin-Ligase *Casitas B-lineage lymphoma* (c-Cbl) proteolytisch gespalten werden (Douville & Downward, 1997; Levkowitz et al., 1999; Oda et al., 2005; Ravid et al., 2004; Rozakis-Adcock et al., 1995; Yokouchi, 1999).

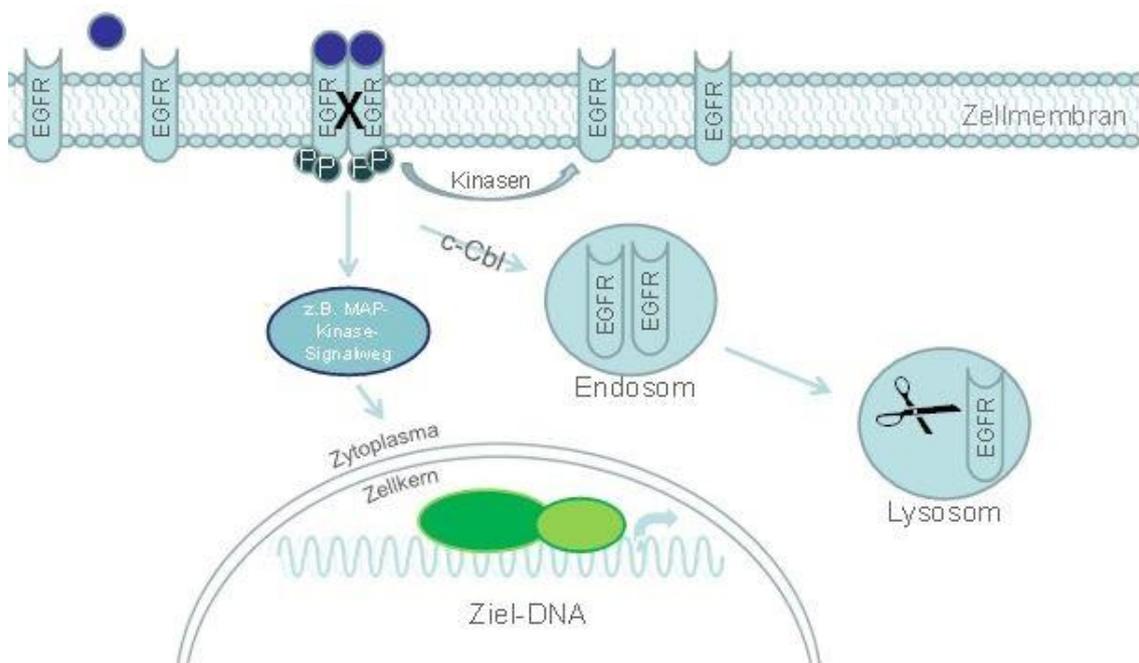


Abbildung 4: Aktivierung und Degradation des EGF-Rezeptors. Durch die Bindung eines Liganden, z.B. EGF oder TGF α , wird die Dimerisierung der Rezeptoren mit folgender Autophosphorylierung angeregt. In seiner Funktion als Rezeptor-Tyrosinkinase phosphoryliert EGFR die Tyrosinreste seiner Zielproteine und aktiviert damit verschiedene Signalkaskaden, unter anderem den MAP-Kinase-Signalweg, der wiederum transkriptionelle Prozesse reguliert. Die meisten der EGFR-abhängigen Signalwege aktivieren Zellwachstumsprozesse. Zur Inaktivierung der EGF-Rezeptoren wird dieser dephosphoryliert und proteolytisch abgebaut.

1.3.2 Die Bedeutung von EGFR im Pankreaskarzinom

Der EGF-Rezeptor steht am Anfang vieler Signal-Transduktions-Kaskaden, die lebenswichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung regulieren (Yarden, 2001). Die Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskaden führt unter anderem zur Aktivierung von inflammatorischen Prozessen. EGFR vermittelt die Expression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-8 und

Einleitung

Cyclooxygenasen, die für die Prostaglandinsynthese unerlässlich sind (Ardito et al., 2012; Monick et al., 2005; Simmons, 2004). Darüber hinaus regulieren EGFR-abhängige Signalwege die GM-CSF-Expression in Keratinozyten (Mascia et al., 2010). Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) forciert die Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen und ist ein elementarer Mediator im Rahmen inflammatorischer Reaktionen (Hamilton & Anderson, 2004). Liegt eine inadäquate EGFR-Aktivierung durch Mutation des Rezeptors oder Überexpression seiner Liganden vor, kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommen. Somit spielt EGFR in der Karzinogenese vieler epithelialer Tumoren eine große Rolle (Ardito et al., 2012; Normanno et al., 2006). Auch in Proben von Patienten mit PDAC und chronischer Pankreatitis fanden sich eine Überexpression und verstärkte Aktivierung des EGF-Rezeptors (Fjallskog et al., 2003; Korc et al., 1994) sowie seiner Liganden (Kobrin et al., 1994; Zhu et al., 2000). Die Überexpression von EGFR und/oder seiner Liganden wird vor allem in fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen detektiert und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Salomon et al., 1995; Yamanaka et al., 1993). Auch in der Pankreaskarzinominitiation und der frühen Karzinogenese spielt die Aktivierung des EGFR-Signalwegs eine bedeutende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass eine Überaktivierung von EGFR-Signalwegen die Entstehung einer azinär-duktalem Metaplasie fördert (Means et al., 2003, 2005), während die genetische oder pharmakologische Inhibition von EGFR die Karzinogenese hemmt. Die Bedeutung von EGFR in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms liegt daher u.a. in der Kontrolle der Transdifferenzierung der Vorläuferläsionen (Ardito et al., 2012; Navas et al., 2012). Bisher ist jedoch ungeklärt, über welche Signalwege EGFR die inflammationsinduzierte azinär-duktalem Transdifferenzierung im Kontext der Pankreaskarzinominitiation reguliert.

2 Zielsetzung

Die Mutation des Protoonkogen Kras gilt als zentrales Ereignis in der Entstehung des Pankreaskarzinoms, ist aber für eine vollständige Progression bis hin zum invasiven Karzinom nicht ausreichend. Eine chronische Entzündung des Pankreas führt u.a. durch Aktivierung des EGFR-Signalwegs zu einer Akzeleration der Kras-abhängigen Pankreaskarzinogenese und -progression.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschreiben eine zentrale Funktion des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NFATc1 in der Pankreaskarzinogenese und -progression. Mit dieser Arbeit sollte nun die Funktion von NFATc1 in der inflammationsgetriggerten Pankreaskarzinomentstehung untersucht werden. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Wirkt NFATc1 als transkriptioneller Mediator EGFR-vermittelter Signalwege?
- Welche Gensignaturen reguliert NFATc1 im Kontext der EGFR-vermittelten ADM und Pankreaskarzinominitiation?
- Welche Partnerproteine kooperieren mit NFATc1 in Abhängigkeit des EGFR-Signalings?
- Welchen Einfluss hat der Verlust von NFATc1 auf die inflammationsgetriggerte Pankreaskarzinomentstehung?

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Stiefenhofer
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific
Brutschrank WTB	Binder Hereaus Instruments
ChemoCam Imager	Intas
Drahtbügel für Färbgestell	Kobe
Eismaschine	Ziegra Eis
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific
Färbegestell	Kobe
Färbekasten	Kobe
Feinwaage Mettler PM400	Mettler-Toledo GmbH
Gefriertruhe	Heraeus Instruments
Geldokumentationssystem	Intas Gel iX Imager
Gelelektrophoresekammer Sub-Cell Midi	Biorad
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Histoturm (Spezialanfertigung)	Kobe
Kryocontainer „Mr. Frosty“	Nalgene Labware
Kühlschrank	Liebherr

Material und Methoden

Kühlzentrifuge Micro 200R	Hettich Zentrifuge
Luminometer Centro LB 960	Berthold Laboratories
Magnetrührer mit Heizplatte MR2002	Heidolph
Messgerät für Bradford	Thermo Scientific
Mikroskop	Zeiss
Mikrotom RM2155	Leica
Mikrowelle	Whirlpool
Mini-Transblot-Kammer	BioRad
Mini-Protean-Tetra-System Gelelektrophoresekammer	Biorad
Mini-Protean-Tetra-System Glasplatten	Biorad
Multipipette	Eppendorf
Photometer	Thermo Scientific
Nano-Drop 1000	NanoDrop Technologies
PCR-Cycler T100	Biorad
pH-Meter 761	Calimatic Knick
Real-time PCR-Maschine	ABI Prism 7000 Applied Biosystems
PipetBoy acu	Integr Biosciences
Pipetten Discovery+	High Tech Lab
Schüttler	Eppendorf
Sonifier W 250-D	G.Heinemann Ultraschall- und Labortechnik

Material und Methoden

Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments
Stickstofftank	Tec-Lab
Thermoblock Dri-Block DB2	Techne AG
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments
UV-Scanner	Kaiser
Voltmeter für Western Blot	Hoefer Scientific Instruments
Vortexer MS1 Minishaker	IKA
Wasserbad	Eppendorf
Western Blot Kammer	BioRad
PicofugeTM	Stratagene
Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Labofuge GL	Heraeus Instruments

Tabelle 1: Laborgeräte

3.2 Materialien

Material	Hersteller
0,2 ml und 0,5ml PCR Tubes	Biorad
96-Well Platte	Applied Biosystem
Blottpapier Whatman	Schleicher & Schüll
Combitips (0,2-12,5 ml)	Eppendorf
Cryoröhrchen 2ml	Greiner Bio-One

Material und Methoden

Deckgläschen	Menzel-Gläser
Einmalinjektionskanülen Sterican	B. Braun
Einwegnadeln, Spritzen	Greiner-Bio-One
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2ml)	Sarstedt, Eppendorf
Fettstift, Dako Pen	Dako
Geltaschenkamm	Thermo Scientific
Glaswaren	Schott
Klammern für Gelelektrophorese	Thermo Scientific
Kultivierungsplatten (6,12,24,96 Vertiefungen)	Thermo Scientific Nunc
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll
Objektträger SuperFrostPlus	Thermo Scientific
Parafilm	Greiner Bio-One
Petrischale 3 cm, 10 cm, 20 cm	Thermo Scientific Nunc
Pipettenspitzen - 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl - 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Eppendorf
Polypropylengefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner-Bio-One
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Thermo Scientific

Material und Methoden

Sterilfilter (0,2 µM/ 0,45 µM)	Schleicher & Schüll
Skalpell CUTFIX	B. Braun
Spritzen BD Plastipak (1 ml, 10 ml)	Becton Dickinson
Zellkulturflasche (50 ml, 250 ml, 500 ml)	Greiner-Bio-One
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb; 74 µm Porengröße	Corning Life sciencing

Tabelle 2: Materialien

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4% Paraformaldehyd	USB Corporation
Aceton	Carl Roth
Acrylamidlösung	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat 10% (APS)	Merck
Amersham™ ECL advanced Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Amersham™ ECL plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Ampicillin	Sigma Aldrich
Aqua dest.	Fresenius Kabi A
BioRad Protein Assay	BioRad

Material und Methoden

Borsäure	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA, 10 mg/ml)	Sigma Aldrich
Calciumchlorid	Carl Roth
Cycloheximid	Biomol
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogene
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma Aldrich
Ethanol	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ethylenglykolbis(aminoethylether)-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biowest
Formaldehyd	Carl Roth
GeneRuler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
Glycerin (87%)	Carl Roth
Glycin	Carl Roth

Material und Methoden

Gluthathion Sepharose™ <i>beads</i>	GE Healthcare
GoTaq Puffer	Promega
HEPES	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kälberserumalbumin	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich
Lithiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Carl Roth
Matrigel	BD Biosciense
Methanol	Carl Roth
Methionin	Sigma Aldrich
Milchpulver	SIGMA
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid	Sigma Aldrich
Natronlauge	Carl Roth
Orthovandat	Sigma Aldrich

Material und Methoden

PageRuler™ Proteinmarker	Fermentas
Passive Lyse Puffer für Reporter Assay	Promega
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roche Molecular Diagnostics
Polyacrylamid	AppliChem
Ponceaurot	Sigma Aldrich
Proteinaseinhibitor-Tablette (complete mini)	Roche Molecular Diagnostics
Protein A-Agarose	Upstate
Protein G-Agarose	Upstate
Proteinase K (20 mg/ml)	Upstate
Rat tail collagen type I (RTC)	Corning
RNase-freies Wasser	Ambion
Salmon Sperm	Invitrogen
Salzsäure	Merck
SiLentFect	BioRad
Stop-and-glow-Puffer	Promega
Stop-and-glow-Substrat	Promega
Streptavidin-Agarose-Beads	Sigma Aldrich
SUPERaseINTM RNase-Inhibitor (30 mg/ml)	Applied Biosystems
SYBR® Green	Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth

Material und Methoden

Transcend™ Chemiluminescent Substrat	Promega
Transfast	Promega
Tris Base (0,2 M, 0,25 M, 1,5 M)	Sigma Aldrich
Triton-X-100	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA	PAA Laboratories
Tween® 20	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid (20%)	Merck
Xylol	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Invitrogen

Tabelle 3: Chemikalien

3.4 Kits

Kit	Hersteller
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories

Tabelle 4: Kits

Material und Methoden

3.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Kollagenase VII	Sigma Aldrich
Oligo-dt-Primer	Applied Biosystems
Proteinkinase K	Applichem
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen
Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase	Abgene

Tabelle 5: Enzyme

3.6 Puffer

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden mit destilliertem und autoklaviertem Wasser hergestellt. Wenn notwendig, wurden die Substanzen steril filtriert oder autoklaviert.

3.6.1 Zelllysepuffer

Pufferlösung für Gesamtzelllysat:

- 50 mM HEPES (pH 7,5)
- 150 M NaCl
- 1 mM EGTA
- 10% Glycerin
- 1% Triton X-100
- 100 mM NaF
- 10 mM Na₄P₂O₇ x 10 H₂O

Lysepuffer für Gesamtzelllysat:

- 500 µl Lysepufferlösung
- 20 µl Complete 25x
- 5 µl PMSF
- 5 µl Orthovandat

Material und Methoden

3.6.2 Puffer für SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer:

- 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,4% SDS

Trenngellösung:

	10% Trenngel	15% Trenngel
AMPUWA	3,67 ml	2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamidlösung	3,33 ml	5 ml
Glycerol	0,5 ml	0,5 ml
APS 10%	25 µl	25 µl
TEMED	25 µl	25 µl

Tabelle 6: Trenngellösung

Sammelgelpuffer:

- 0,5 M Tris-Base (pH 6,8)
- 0,4 % SDS

Sammelgellösung:

- 2,36 ml AMPUWA
- 1 ml Sammelgelpuffer
- 0,64 ml Acrylamidlösung
- 10 µl APS 10%
- 10 µl TEMED

Stoppgellösung (für 2 Gele):

- 1 ml Trenngelpuffer
- 5 µl APS 10 %
- 5 µl TEMED

Material und Methoden

APS 10% und TEMED wurden jeweils erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt .

Laufpuffer (10x):

- 288 g Glycin
- 60,6 g Tris
- 20 g SDS

Der 10x Laufpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 2 l aufgefüllt.

Laufpuffer (1x):

- 100 ml Laufpuffer 10x
- 900 ml destilliertes Wasser

3.6.3 Puffer für Western Blot

10x Transblotpuffer:

- 0,25 M Tris
- 1,92 M Glycin

1x Transblotpuffer:

- 100 ml 10x Transblotpuffer
- 200 ml Methanol
- 700 ml destilliertes Wasser

3.6.4 Waschen und Entwickeln der Nitrocellulosemembran

10x TBST-Puffer:

- 0,2 M Tris
- 1,37 M NaCl

1x TBST-Puffer:

- 100 ml 10x TBST-Puffer
- 900 ml destilliertes Wasser
- 1 ml Tween 20

Material und Methoden

Blocking-Puffer/ Milchpuffer:

- 100 ml 1 x TBST
- 5 g Milchpulver

Bradford Protein Assay:

- 50 ml BioRad Protein Assay
- 200 ml destilliertes Wasser

3.6.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

TBE-Puffer (1x):

- 10,8 g Tris
- 5,5 g Borsäure
- 0,37 g EDTA

Der TBE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

1% Agarose Gel:

- 0,5 g Agarose
- 50 ml TBE Puffer (1x)
- 0,8 µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

3.6.6 Reagenzien für Chromatinimmunpräzipitation

Waschpuffer I:

- 20 mM Tris (pH 8,1)
- 150 mM NaCl
- 2 mM EDTA
- 0,1% SDS
- 0,1% Triton X-100

Waschpuffer II:

- 20 mM Tris (pH 8,1)
- 500 mM NaCl
- 2 mM EDTA

Material und Methoden

- 0,1% SDS
- 0,1% Triton X-100

Waschpuffer III:

- 10 mM Tris (pH 8,1)
- 250 mM LiCl
- 1 mM EDTA
- 1% NP40
- 1% SDS

Lyse-Puffer I:

- 5 mM PIPES (ph 8)
- 85 mM KCl
- 0,5% NP 40

RIPA Puffer :

- 1 M Tris (pH 7,4)
- 5 M NaCl
- 10% Triton X-100
- 5 g Natrium-Deoxycholat
- 0,25 M EDTA
- 0,2 M EGTA (pH 7,2)

TE-Puffer:

- 20 mM Tris (pH 8,0)
- 1 mM EDTA

Elution-Puffer:

- 500 µl 20% SDS
- 1 ml 1 M NaHCO₃

Der Elution-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt.

Reversion-Puffer:

- 5 M NaCl

Material und Methoden

- 1 M Tris (pH 6,5)
- 0,5 M EDTA
- 20 µg Proteinase K
- 10 µg RNase A

3.6.7 Puffer für Immunhistochemie

Citratpuffer (pH 6,0):

- 2,1 g Citronensäure-Monohydrat

Der Citratpuffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

PBS (pH 7,4):

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,765 g Na₂HPO₄ x H₂O

PBS wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

PBST-Puffer:

- 214 ml KH₂PO₄
- 536 ml Na₂HPO₄ x H₂O
- 45 g NaCl
- 5 ml Tween 20

Blockpuffer:

- 2% Milchpulver in PBS

Tris/EDTA- Puffer (TE- Puffer) (10x) pH 9:

- 12,1 g Tris-Base
- 3,7 g EDTA

Material und Methoden

Der TE-Puffer wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.

Diaminobenzidin (DAB):

- 200 mg DAB
- 200 ml TBS
- 100 µl H₂O₂

Wasserstoffperoxid wurde erst unmittelbar vor Benutzung hinzugefügt und im Dunkeln gelagert.

3.6.8 Sonstige Puffer

5x Lämmli:

- 225 mM Tris (pH 6,8)
- 50% Glycerin
- 5% SDS 100 mM DTT
- 0,02% Bromphenolblau

Unmittelbar vor der Anwendung wurde 5x Lämmli nach Bedarf mit destilliertem Wasser auf 2x oder 1x Lämmli verdünnt und dem Ansatz 2-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:20 hinzugefügt.

STE-Puffer:

- 200 mM Tris (pH 7,5)
- 250 mM EDTA
- 1 M NaCl

3.6.9 Lösungen für die Azinuszellisolation

Alle Materialien und Chemikalien wurden unter sterilen Bedingungen verwendet. Die angesetzten Lösungen wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung filtriert.

Lösung 1(40 ml pro Maus):

- McCoy's Medium
- 0,1% BSA

Material und Methoden

- 0,2 mg/ml Soyabean Trypsininhibitor (SBTI)

Lösung 2 (10ml pro Maus):

- McCoy's Medium
- 0,1% BSA
- 0,2 mg/ml SBTI
- 1,2 mg/ml Kollagenase VIII

Lösung 3 :

- Waymouth's Medium
- 0,1% BSA
- 0,2 mg/ml SBTI
- 50 µg/ml BPE
- 1% Penstrep
- 1% Selenix
- 1% Nicotinamide
- 30% oder 0,1% FCS

Kollagen:

- Red Tail Kollagen
- 10X PBS
- H₂O
- NaOH

BSA und SBTI wurden in PBST gelöst.

3.7 Kultivierung von Azinuszellen

3.7.1 Azinuszellextraktion

Mit dieser Methode gelang es, einzelne Azinuszellen durch viele Wasch- und Filtervorgänge aus dem komplexen Gesamtverband des Pankreas zu lösen, um deren Verhalten unabhängig von anderen Zellen des Pankreas zu untersuchen. Um eine Azinuszellextraktion durchzuführen, wurde das Pankreas einer 4 bis 8 Wochen alten Maus benötigt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation geopfert. Sofort nach der Entnahme des Pankreas wurde es in eine Petrischale mit eiskaltem 10X PBS

Material und Methoden

überführt. Die folgenden Schritte sollten zügig und unter der Sterilbank erfolgen, da das Gewebe sehr empfindlich ist. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde das Organ in einer Petrischale mit 5 ml Lösung 2 mithilfe eines Skalpell's zerkleinert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt, die Petrischale 2-mal mit 5 ml Lösung 1 gewaschen, sodass sich insgesamt 15 ml in dem Falcon befanden. Nach der 5-minütigen Zentrifugation bei 300 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 5 ml Lösung 2 in einer Petrischale resuspendiert und erneut inkubiert. Nun wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm Nylonnetz in ein 50 ml Falcon filtriert und der Filter mit 10 ml Lösung 1 gewaschen. Wieder saugte man den Überstand nach dem Zentrifugieren ab, resuspendierte mit 20 ml Lösung 1 und zentrifugierte erneut. Jetzt wurde das Pellet mit Lösung 3 30% FCS resuspendiert und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die 12-Well-Platten mit je 500 µl vorbereitetem Kollagen gefüllt und zum Aushärten ebenfalls in den Inkubator gelegt. Die *Rat tail collagen type I* (RTC)-Lösung wurde aus Lösung 3 mit 0,1% FCS und Kollagen vorbereitet. Nach 60-minütiger Inkubation wurde die Suspension noch einmal zentrifugiert, das Pellet mit der RTC-Lösung resuspendiert und auf die 12-Well-Platten verteilt. Um genügend Material für nachfolgende Experimente ernten zu können, empfiehlt es sich eine Dreifachausführung anzusetzen. Die Zellen können für mehrere Tage in einem Inkubator unter sterilen Bedingungen verwendet werden. Abhängig von der Beschaffenheit der Zellen und der Zielsetzung des Experiments kann die Kultivierung auch ohne Kollagen in Suspension erfolgen. Dafür sollten die Azinuszellen in je 1 ml Lösung 3 mit 0,1% FCS pro Well einer 12-Well-Platte kultiviert werden.

3.7.2 Behandlung der Azini

Wenn das Kollagen fest geworden war, konnten die Zellen behandelt werden. Hier erfolgte die Behandlung mit EGF (20 ng/ml) und CsA (0,5 µmol/l). Die Medikamente wurden in 200 µl Lösung 3 mit 0,1% FCS pro Well gelöst. Wurden die Zellen länger als 48 Stunden inkubiert, musste ein Mediumwechsel mit einer erneuten Behandlung mit EGF erfolgen, da die EGF-Wirkung ansonsten verloren ging.

Material und Methoden

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Verwendete Zelllinien

Name	Abstammung	Herkunft	Medium
266-6	Maus	(Davis, Hammer, Messing & MacDonald, 1992)	DMEM + 10% FCS + 1% Penstrep
Kras ^{G12D} ;p53 ^{KO} ;Egfr ^{KO}	Maus	Jens Siveke TU München	DMEM + 10% FCS + 1% nicht-essentielle Aminosäuren

Tabelle 7: Zelllinien

3.8.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden mit 20 ml des Nährmediums in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid in einem Inkubator kultiviert. Das Nährmedium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt und die Zellen je nach Zellwachstum und -dichte passagiert.

3.8.3 Zellpassage

War eine ausreichend hohe Zellzahl erreicht, konnte die vorhandene Kolonie passagiert werden. Nach Absaugen des noch vorhandenen Nährmediums wurde die Zellkulturflasche mit 10 ml DPBS gewaschen, damit im Folgenden mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung die adhären Zellen von der Flasche gelöst werden konnten. Nach einer 3-minütigen Inkubation wurde die entstandene Suspension in ein 50 ml Falcon überführt und mit zusätzlichen 4 ml des Nährmediums 3 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt, das überbleibende Pellet in Nährstoffmedium resuspendiert und konnte für weitere Experimente verwendet werden.

3.8.4 Zellzahlermittlung

Die in Trypsin/EDTA vereinzelt Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension in den zwischen Deckglas und Zählkammer befindlichen Kapillarspalt pipettiert, sodass der Boden der Zählkammer ausreichend bedeckt war. Nun wurden die Zellen der 4 Eckquadranten (1 mm x 1 mm, Kammertiefe 0,1 mm) mäanderförmig ausgezählt. Der Mittelwert der Eckquadranten

Material und Methoden

ergab die Zellzahl für 0,1 µl und wurde mit 10^4 multipliziert, um die Zellzahl in einem Milliliter zu errechnen.

3.8.5 Langzeitkonservierung

Für die Konservierung der Zellen wurden diese in FCS mit 10% DMSO in einem Kryogefäß in Flüssigstickstoff gelagert.

Um die Zellen aufzutauen, wurden diese im Wasserbad bei 37°C erhitzt und anschließend mit 10 ml Nährmedium in einer Zellkulturflasche aufgenommen. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das DMSO haltige Medium abgesaugt, die Flasche einmalig mit Medium ausgespült und anschließend mit neuem Medium befüllt.

3.8.6 Zelltransfektion

Bei der Transfektion von Fremd-DNA oder -RNA unterscheidet man eine dauerhafte Integration in das Wirtsgenom (stabile Transfektion) von einer nur vorübergehenden Integration des Plasmids oder einer small interferenz RNA (siRNA) (transienten Transfektion). Durch die Transfektion von siRNA kann die Expression eines Genes zeitweise unterdrückt werden, indem die mRNA des Zielgens abgebaut wird.

3.8.7 Zelltransfektion mit Lipofectamin

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag in antibiotikafreies Medium überführt. Für einen Reaktionsansatz in einer 24-Well-Platte wurden pro Well 100 µl serumfreies Medium in einem Polystyrolröhrchen mit 1 µg DNA vermischt. In einem zweiten Reaktionsansatz wurden pro µg DNA 3 µl Lipofectamin 2000 in einem identischen Mediumvolumen für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Reaktionsansätze gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 200 µl dieses Transfektionsansatzes in jedes 24-Well gegeben. Nach 4 bis 6 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Material und Methoden

Name	Konzentration	Herkunft
pSG5-v-ErbB-EGFR	400 ng	M. Privalsky
pFA-c-Fos	200 ng	Stratagene
c-Jun	200 ng	Y. Yamamura
MSCV-caNFATc1	200 ng	N.A. Clipstone
cisNFATc1	200 ng	Stratagene
pCMV	Entsprechend der Gesamtmenge der transfizierten Konstrukte	Stratagene
Renilla Luciferase	15 ng	R. Urrutia

Tabelle 8: Vektoren

3.8.8 Transiente Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von siRNA wurde das Transfektionsreagenz „siLentFect“ verwendet. Die Transfektion der Zellen erfolgte in serumfreiem Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz. Pro zu transfizierendem Ansatz wurden in einem Mikroreaktionsgefäß 150 µl Medium und 7 µl siRNA bzw. Kontroll-siRNA gemischt. In einem zweiten Mikroreaktionsgefäß wurden 150 µl Medium mit 7 µl „siLentFect“ versetzt. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengefügt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

siRNA Konstrukt	Sequenz	Firma
NFATc1	(140 pmol) 5'GCGUUUCACGUGUACCUUCCUtt->3'	Ambion
c-jun	(10µmol) Nicht angegeben	Santa Cruz

Tabelle 9: siRNA Konstrukte

Material und Methoden

3.8.9 Luciferase Reporter Assay

Mit dem Luciferase Reporter Assay wurde die Promotoraktivität eines Gens mittels einer Lichtreaktion indirekt messbar gemacht. Hierfür wurden die Zellen in Dreifachbestimmung mit einem an Luciferase gekoppelten Promotorkonstrukt und Effektorplasmiden nach oben beschriebenem Protokoll transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl des „Passive Lysebuffer“ 15 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Zur Auswertung der Promotoraktivität wurden 30 µl der Zellsuspension mit 30 µl eines Luciferasepuffers vermischt. Daraufhin wurde die Lichtreaktion mit einem Luminometer erfasst. Anschließend erfolgte die Normalisierungsmessung mithilfe der Renilla-Aktivitätsbestimmung. Den bestehenden Ansätzen wurden hierfür 30 µl des „Stop and Glow“ Puffers hinzugefügt und damit die Lichtreaktion der Renilla-Luciferase gemessen. Die Auswertung des Luciferaseassays erfolgte mittels Quotientenbildung aus beiden Messungen (Luciferase-Aktivität/Renilla-Aktivität).

3.8.10 Zellbehandlung

Zellbehandlung mit EGF

Der *Epithelial Growth Factor* (EGF) ist ein Polypeptid, das den EGF-Rezeptor stimulieren kann und mit der Aktivierung der Signal Kaskaden die Wachstumsprozesse in der Zelle stimuliert. In der Zellkultur wird es als Induktor einer Entzündungsreaktion analog zur Caeruleinbehandlung im *in vivo* Mausversuch verwandt.

Zellbehandlung mit CsA

siehe 3.9.3.

Medikament	Lösungsmittel	Konzentration
CsA (Sigma)	Ethanol	1 µmol/ml
EGF	Serumfreies Medium	20 ng/ml

Tabelle 10: Medikamente

Material und Methoden

3.9 Tierversuche

Um die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* zu überprüfen, wurden 3 verschiedene transgene Mauslinien für diese Arbeit verwendet. Die Tiere wurden gemäß der Vorschriften der Tierschutzkommission der Universität Marburg gehalten (Tierversuchsantragsnummern MR115/2011 und MR88/2012). Die Mäuse wurden abhängig von Genotyp und Versuchsprotokoll mit verschiedenen Medikamenten behandelt. Nach Behandlungsende wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation geopfert und deren Organe und Gewebe für weitere Versuche entnommen.

3.9.1 Verwendete transgene Mausmodelle

Cre/loxP System

Bei dem Cre/loxP System handelt es sich um ein Rekombinationssystem. Mithilfe von loxP-DNA-Sequenzen (locus of x-cover P1) wird eine bestimmte DNA-Sequenz an deren Anfang und Ende markiert, „gefloxt“ (flanked by loxP). Die Cre-Rekombinase detektiert diese Flankierungen und katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA. Dadurch können Genorte inaktiviert, deletiert, aktiviert oder auch mutiert werden, ebenso können neue Genorte eingefügt werden.

PDX1-Cre

Um das Cre/loxP-System organabhängig nutzen zu können, ist ein organspezifischer Promotor notwendig. PDX1 (Pancreatic und Duodenum homebox 1) ist ein pankreasspezifischer Transkriptionsfaktor, der vor allem in der Embryogenese des Pankreas und später für die Entwicklung der β -Zellen von Bedeutung ist. Durch Kopplung des Cre/loxP-Systems, auch LSL (lox stop lox)-System genannt, an den Promotor des pankreasspezifischen Transkriptionsfaktors PDX1 können Gene unabhängig von anderen Körperzellen verändert werden.

PDX1-Cre; LSL-Kras^{G12D}

Das transgene Konstrukt LSL-Kras^{G12D} beschreibt eine Punktmutation von G \rightarrow A im Kodon 12 des Exons 2 des Kras-Allels. Anstatt Glycin wird Asparaginsäure exprimiert. In diesem Allel wird auch eine „Stopp-Kassette“ kodiert, die in das LSL-System eingefasst ist. Wird PDX1 und somit konsekutiv die pankreasspezifische Cre-Rekombinase exprimiert, wird die Stopp-Kassette entfernt und das mutierte Kras exprimiert. Es

Material und Methoden

handelt sich um ein oft beschriebenes und etabliertes Mausmodell (Hingorani et al., 2003).

PDX1-Cre; LSL-KrasG12D;NFATc1^{Δ/Δ}

Bei diesem transgenen Mausmodell, das bereits in der AG Ellenrieder etabliert war, wird das oben beschriebene Modell um eine pankreasspezifische Aktivierung einer NFATc1-Deletion ergänzt. Damit wird die Expression von NFATc1 gewebespezifisch verhindert (Aliprantis et al., 2008).

3.9.2 Verpaarung und Haltung

Die Haltung entsprach den Vorschriften und Protokollen der Tierschutzkommission der Universität Marburg. Ein Brutpaar bestand in der Regel aus 2 weiblichen und einer männlichen Maus. Wenn die Jungtiere eines neuen Wurfes 14 Tage alt waren, erhielten sie einen Ohrclip um sie zu individualisieren. Ein ca. 5 mm großes Stück der Schwanzspitze wurde zur Genotypisierung entfernt. Nach weiteren 7 Tagen wurde der Wurf geschlechter- und genotypspezifisch in eigene Käfige umgesetzt, um Platz für einen neuen Wurf zu schaffen. Die Behandlung mit CsA und/ oder Caerulein begann im Alter von 8 Wochen und wurde über 4 Wochen an 5 von 7 Tagen durchgeführt. Bei der anschließenden Opferung durch zervikale Dislokation wurde erneut ein Stück des Schwanzes einbehalten um das vorliegende Genotypisierungsergebnis zu validieren. Das entnommene Pankreas wurde gewogen, vermessen und in 2 Teile für die Verwendung in weiterführenden Experimenten getrennt. Eine Hälfte wurde in Formalin fixiert und für die Immunhistologie vorbereitet, die andere in flüssigem Stickstoff konserviert. Außerdem wurde die Leber entnommen.

3.9.3 Genotypisierung

Lysierung

Das gewonnene Stück des Schwanzes wurde zunächst in ein Mikroreaktionsgefäß, beschriftet mit der laufenden Nummer der Maus, überführt. Um das Gewebe rund um die DNA aufzulösen, wurde 200 µl PBD mit 1,5% Proteinkinase K (20 mg/ml) hinzugefügt. Für die folgenden 8 bis 12 Stunden inkubierten die Proben bei 55°C auf dem Schüttler. Um anschließend die Reaktion der Proteinkinase K zu stoppen, wurden

Material und Methoden

sie 5 Minuten bei 95°C gekocht und anschließend sofort genotypisiert oder bei -20°C aufbewahrt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) dient zur Vervielfältigung von DNA. Dabei werden 3 verschiedene Teilreaktionen in vorgegebener Häufigkeit wiederholt. Zunächst wurde die DNA bei 94 bis 96°C denaturiert. Anschließend erfolgte bei 50 bis 72°C die Anlagerung der Primer, die die DNA-Sequenz bestimmen, die im dritten Schritt bei 72°C durch DNA-Polymerase vervielfältigt wurde. Im vierten Polymerisierungszyklus war die DNA-Sequenz auf die jeweiligen Primer beschränkt und nur dieses Stück wurde nun vervielfältigt. Für die Genotypisierung wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus 2 µl der vorher lysierten Mausschwanzprobe und 23 µl des Mastermixes in einem 0,2 ml PCR-Tube zusammengefügt.

Mastermix:

1x MM

- 15,25 µl H₂O
- 5 µl GoTaq Puffer (5x)
- 1 µl Primer for (10 pmol/µl)
- 1 µl Primer rev (10 pmol/µl)
- 0,5 µl dNTPs
- 0,25 µl GoTaq

Als Negativkontrolle diente sterilisiertes Wasser und DNA einer zuvor schon als Wildtyp getesteten Maus, als Positivkontrolle DNA einer zuvor schon als positiv getesteten Maus. Dieser Ansatz wurde in einem Thermocycler nach folgenden Protokollen amplifiziert:

Wiederholung	Temperatur	Zeit
KRAS		
1 Zyklus	95°C	2 min
29 Zyklen	95°C	30 sec

Material und Methoden

29 Zyklen	60°C	30 sec
29 Zyklen	72°C	1 min
1 Zyklus	72°C	5 min
NFAT-KO		
1 Zyklus	94°C	2 min
35 Zyklen	94°C	30 sec
35 Zyklen	66°C	30 sec
35 Zyklen	72°C	40 sec
1 Zyklus	72°C	5 min
Cre		
1 Zyklus	95°C	4 min
35 Zyklen	95°C	30 sec
35 Zyklen	59°C	30 sec
35 Zyklen	72°C	1 min
1 Zyklus	72°C	5 min

Tabelle 11: PCR Zyklen

Material und Methoden

Dafür wurden folgende Primer verwendet:

Primer	Sequenz
Kras mut for	5'-agc tag cca cca tgg ctt gag taa gtc tgc g-3'
Kras uni rev	5'-cct tta caa gcg cac gca gac tgt aga -3'
Cre 001	5'-acc agc cag cta tca act cg-3'
Cre 002	5'-tta cat tgg tcc agc cac c-3'
INT2S-5	5'-aag gaa tta ctg gga agc ctg gca -3'
INT3s-2	5'-agg gac tat cat ttg gca ggg aca -3'
INT3AS-2	5'-aca gga aac agc tct gtt cca cac -3'

Tabelle 12: Genotypisierungs-PCR-Primer

Um zu überprüfen, ob der mit den jeweiligen Primern zu amplifizierende Genort in den Proben enthalten ist, schloss sich die Agarosegelelektrophorese an, wobei Cre bei ≈ 220 bp, KRAS bei ≈ 550 bp, NFAT-KO Flox ≈ 410 bp und NFAT-KO ≈ 370 bp lief. Sind bei der NFAT-KO PCR beide Banden vorhanden, handelt es sich um einen heterogenen Genotyp.

3.9.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihres Ladungs-Masse-Verhältnisses aufgetrennt. Für das Agarosegel wurden 50 ml 1% Agarose-TBE-Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 3 μ l Midori Green versetzt. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit 1x TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer überführt und je 10 μ l der mit 5x Ladepuffer ergänzten DNA-Probe in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde in einer der Geldaschen ein Marker geladen, anhand dessen die Größe der DNA-Fragmente bestimmt wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 120 V. Abschließend wurde das in der DNA interkalierende Midori Green mit UV-Licht angefärbt und somit die Größe der DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

Material und Methoden

Je nach Genotypisierungsergebnis erfolgte die Einordnung der Versuchstiere in verschiedene Gruppen.

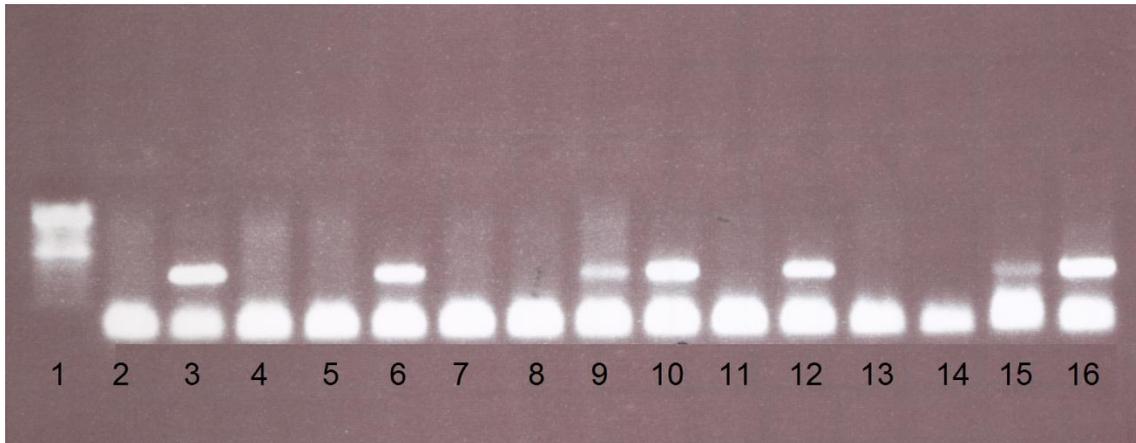


Abbildung 5: Beispiel eines Agarosegels nach einer Kras-PCR. 1-Marker, 15,16-Positivkontrollen, 14-Negativkontrolle, 3,6,9,10,12-Positivproben, 2,4,5,7,8,11,13-Negativproben

3.9.5 Behandlung

Gemäß dem Versuchsaufbau wurden die 8 Wochen alten Tiere in der Behandlungsgruppe mit Caerulein und CsA oder nur mit Caerulein behandelt. Die Medikamente lagen in folgenden Lösungen und Konzentrationen vor.

Medikament	Lösungsmittel	Konzentration
CsA	DMSO	5 mg/kg KG (5x/Woche)
Caerulein	NaCl	0,2 mg/kg KG (3x/Woche)

Tabelle 13: Medikamente für *in vivo* Experimente

Den Kontrolltieren wurde ein äquivalentes Volumen des Lösungsmittels injiziert. Die Injektion erfolgte unter sterilen Bedingungen intraperitoneal in einem zuvor desinfizierten Areal im rechten unteren Quadranten des Abdomens. Die Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 4 Wochen an 3 (Caerulein) bzw. 5 (CsA) von 7 Tagen. Anschließend oder bei plötzlicher Verschlechterung des Gesundheitszustandes wurden die Tiere durch zervikale Dislokation geopfert.

Caerulein

Caerulein ist ein Analogon des Hormons Cholezystokinin, das die physiologisch glatte Muskulatur des Magens, der Gallenblase und des Pankreas zur Kontraktion anregt und

Material und Methoden

somit die Sekretion von Verdauungsssekreten bewirkt. In experimentellen Tierversuchen induziert in supraphysiologischen Dosen eingesetztes Caerulein eine akute bzw. bei längerem Einsatz auch eine chronische Pankreatitis. Dabei aktiviert ein erhöhtes intrazelluläres Calciumlevel die Proteasenaktivität und Autodigestion der Azinuszellen, die dadurch Schaden nehmen (Guerra et al., 2007; Willemer et al., 1992).

Cyclosporin A (CsA)

Das vor allem in der Transplantationsmedizin eingesetzte Peptid Cyclosporin supprimiert die Immunantwort und verhindert damit eine potentielle Abstoßungsreaktion. Ein aus Cyclosporin A und dessen intrazellulärem Rezeptor, Immunophilin, gebildeter Komplex bindet an die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin und verhindert die Bindung von Calcineurin an NFAT. Ist Calcineurin ungehemmt, wird der Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert, der daraufhin in den Zellkern transloziert und die Transkription verschiedener Zielgene startet (Crabtree, 1999).

3.10 Molekularbiologische Methoden

3.10.1 RNA-Analysen

RNA-Extraktion aus Zelllinien

Bevor die RNA der Zellen extrahiert werden konnte, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Mittels RLT-Lysepuffer wurden die Zellen vom Boden des Wells gelöst. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits und dessen Protokoll.

RNA-Extraktion aus Geweben

Von tiefgefrorenem Pankreasgewebe wurden auf Trockeneis mithilfe eines Skalpellstecknadelkopfs große Gewebstücke aus verschiedenen Regionen des Pankreas entnommen und in einem mit RLT-Puffer gefüllten Eppendorfgefäß mithilfe eines Homogenisators zerkleinert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits.

Material und Methoden

RNA-Extraktion aus Azinuszellen

Wurden die Azinuszellen in Kollagen fixiert, musste dieses durch Zugabe von 500 μ l Kollagenase pro Well zunächst gelöst werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Azinuszellen, die in Suspension kultiviert wurden, wurden ebenfalls zentrifugiert. In beiden Fällen wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Lysepuffer versetzt. Die RNA Isolation erfolgte anschließend mithilfe des RNeasy-Mini-Kits.

3.10.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch das messbare Extinktionsmaximum der Nukleinsäure bei 260 nm und durch Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ (Extinktion= Extinktionskoeffizient x molare Konzentration x Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit) konnte die Konzentration von RNA oder DNA ermittelt werden. Dafür wurde die Absorption einer 1 μ l Probe bei 260 nm gemessen. Um eine signifikante Kontamination der Probe auszuschließen, wurde zusätzlich der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieser sollte bei DNA über 1,8 und bei RNA über 2,0 liegen, um eine ausreichende Reinheit der Probe zu gewährleisten.

3.10.3 c-DNA-Transkription

Um in einer Zelle transkriptionelle Prozesse untersuchen zu können, wird die isolierte RNA für die anschließende Amplifikation in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies gelang mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase. Oligo-dt-Primer banden an den Poly-A-Sequenzen am 3'-Ende eukaryotischer mRNA und erlaubten die Bindung der reversen Transkriptase, die einen komplementären Strang synthetisierte. Der Versuchsaufbau erfolgte mit den Materialien und nach dem Protokoll des Omniscript Reverse Transkriptase Kits. Pro Probe wurde der Mastermix wie folgt angesetzt:

- 2 μ l 10x Buffer RT
- 2 μ l dNTP Mix
- 0,4 μ l Oligo dt Primer
- 0,5 μ l RNase-Inhibitor
- 1 μ l Omniscript RT

Material und Methoden

Der Mastermix wurde zu 2 µg RNA hinzugefügt und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C war die cDNA Synthese abgeschlossen.

3.10.4 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Wie bereits erläutert, besteht eine Polymerasekettenreaktion aus 3 Schritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgen: Denaturierung für die Auftrennung der Doppelstränge, Annealing mit der Hybridisierung der Primer an die DNA, sowie Elongation der DNA. In einer qRT-PCR wird nach jedem Zyklus die synthetisierte DNA Menge über ein Fluoreszenzsignal ermittelt. Dieses Fluoreszenzsignal entsteht durch Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in doppelsträngige DNA.

Für die Durchführung einer qRT-PCR wurde die cDNA im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und gemeinsam mit SYBR-Green und Primern in eine 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well wurde benötigt:

- 10 µl 2 x SYBR Green
- 0,1 µl Primer forward
- 0,1 µl Primer reverse
- 7,8 µl RNase-freies H₂O

Die qRT-PCR erfolgte in Dreifachbestimmung

Primer	Sequenz
NFATc1	For: gcctttgcgagcagtat Rev: gctgccttccgtctcata
Cytokeratin 19	For: cctcccgcgattacaaccact Rev: ggcgagcattgtcaatctgt
Sox9	For: cgtgcagcacaagaaagacca Rev: gcagcgccttgaagatagcat
XS-13	For: gtcggaggagtcggacgag Rev: gcctttatttcctgttttgcaaa

Cytokeratin 7	For: cacgaacaaggtggagtggga Rev: tgtctgagatctgcgactgca
E-cadherin	For: agaaaatgctggccgatttaa Rev: cctgagtgctgggcttaaagg

Tabelle 14: qRT-PCR-Primer

3.11 Proteinbiochemische Methoden

Proteinbiochemische Untersuchungen werden u.a. für Interaktionsstudien oder für Expressionsanalysen in verschiedenen Zellkompartimenten verwendet. Um die Proteine von Interesse untersuchen zu können, müssen diese aus der Zelle isoliert werden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Gesamtzelllysate angefertigt.

3.11.1 Proteinisolation

Proteinisolation aus Zelllinien

Nachdem das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden, wurde abhängig von der Zellkonfluenz 70 bis 150 µl Lysepuffer hinzugegeben. Mit einem Zellschaber konnten die Zellen in dem Lysepuffer mobilisiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt werden. Anschließendes Vortexen förderte den Lyseprozess. Unlösliche Zelltrümmer wurden bei 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm von den Proteinen getrennt. Der Überstand enthielt die isolierten Proteine. Wurden Gesamtzelllysate aus Azinuszellen gewonnen, die in Kollagen kultiviert wurden, wurde die Zellsuspension zunächst durch Zugabe von 500 µl Kollagenase verflüssigt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden wie oben beschrieben Zelltrümmer durch Zentrifugation von den Proteinen getrennt.

Proteinisolation aus Gewebe

Nach der Opferung der Maus wurden Teile des steril entnommenen Pankreas in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Zum Erstellen eines Gesamtzelllysats konnte ein Teil dieses eingefrorenen Organs in ein Reaktionsgefäß mit Lysepuffer überführt und mit einem Mörser zerkleinert werden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C wurde das Gesamtzelllysate durch 20-minütiges

Material und Methoden

Zentrifugieren bei 4°C und 14000 rpm von Geweberesten getrennt. Das Pellet konnte verworfen werden und der Überstand erneut bei -20°C eingefroren oder sofort genutzt werden.

3.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um in anschließenden Western Blot-Analysen Proteinexpressionen untereinander vergleichen zu können, wurden die Proteine hinsichtlich ihrer Konzentration quantifiziert. Hierfür wurde die Bradford-Methode verwendet. In Anwesenheit von Proteinen geht der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 Komplexbildungen ein. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Die Zunahme des Absorptionsmaximums kann photometrisch bestimmt werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Hierfür wurden in einer 96-Well-Platte pro Reaktionsansatz 200 µl der 1:5 verdünnten Bradford-Lösung vorgelegt und 2 µl des Zellysats hinzugefügt und die Proteinkonzentration bestimmt. Um möglichst große Genauigkeit zu erreichen, wurde der Mittelwert aus einer Zweifachbestimmung errechnet. Um eine Kalibrierungskurve zu erstellen, wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

3.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um die höheren Proteinstrukturen im Zellysat zu zerstören und die Eigenladung der linearisierten Proteine zu neutralisieren, wurde dem Zellysat SDS-haltiges 5x Lämmli+ β-Mercaptoethanol hinzugefügt und die Proben 5 Minuten bei 95°C gekocht.

Um 2 Gele gießen zu können, wurden zunächst je 2 mit 70%igem Alkohol gereinigte Glasplatten mittels 2er Spacer aneinander befestigt. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus Stoppgel, Trenngel und Sammelgel.

Mithilfe eines Kammes wurden Taschen im Sammelgel fixiert. Nach etwa 60 Minuten ist das Gel polymerisiert und konnte beladen werden. In einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer liefen die Proteine bei anfangs 120 V. War der Marker aufgetrennt, wurde die Spannung auf 160 V erhöht.

Material und Methoden

3.11.4 Western Blot

Bei dem sich an die Gelelektrophorese anschließenden Western Blot wurden die Proteine ebenfalls mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen, auf der sie anschließend durch einen indirekten Antikörpernachweis sichtbar gemacht werden konnten. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektro-Tank-Blotting, wobei folgende Reihenfolge der Materialien in der Transferkassette gewährleistet sein musste: Kathode-Schwamm-Filter-Gel-Nitrocellulosemembran-Filter-Schwamm-Anode. In der mit Blotting-Puffer gefüllten Mini-Trans-Blot-Kammer erfolgte die Übertragung bei 400 mA für 90 Minuten bei 4°C. Anschließend wurden die übertragenen Proteine mit Ponceau-Lösung auf der Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht. Nach einmaligem Waschen mit TBST-Puffer inkubierte die Membran für 60 Minuten in 5%igen Milchpuffer auf dem Kippschüttler, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Die erwünschten spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen wurden durch die Zugabe des entsprechenden Primärantikörpers in seiner entsprechenden Verdünnung und der Inkubation bei 4°C über Nacht erzeugt. Am darauffolgenden Tag wurde, nach 3-maligem Waschen mit TBST, der Sekundärantikörper in 5%igem Milchpuffer dazugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler wurde die Membran erneut 3-mal mit TBST gewaschen. Die verwendeten speziesspezifischen Sekundärantikörper waren mit einer Meerrettichoxidase gekoppelt, welche die Chemolumineszenzreaktion von Luminol katalysierte, die mit einer Entwicklermaschine detektiert werden konnte.

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
EGF	Maus	1:500	Santa Cruz
pEGFR	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
pErk	Kaninchen	1:1000	CellSignaling
NFATc1	Maus	1:500	Santa Cruz
β-aktin	Maus	1:10000	Sigma
E-cadherin	Maus	1:1000	BD

Material und Methoden

Cytokeratin 19	Kaninchen	1:1000	Abcam
p-c-Jun	Kaninchen	1:1000	CellSignaling
p-c-Fos	Kaninchen	1:1000	CellSignaling
Sox9	Kaninchen	1:1000	Abcam
Erk1/2	Kaninchen	1:1000	CellSignaling

Tabelle 15: Western Blot Primärantikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	Pferd	1:10000	Cell Signalling
Anti-Kaninchen	Ziege	1:10000	Cell Signalling

Tabelle 16: Western Blot Sekundärantikörper

3.11.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erlaubt die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers wird ein Protein zunächst aus einem Proteingemisch präzipitiert und anschließend die dort gebundenen Proteine im Western Blot identifiziert.

Abhängig von der Isoform des zu verwendenden Antikörpers wurden Agarose A- oder G-Beads 2-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 400 bis 600 µg Gesamtzelllysat mit einem Proteininhibitor versetztem PBS auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und 20 µl der gewaschenen Agarosebeads hinzugefügt. Das Preclearing erfolgte für 30 Minuten auf einem Überkoprotator bei 4°C und diente der Minimierung unspezifischer Bindungen der Proteine an den Agarosebeads.

Anschließend wurden die Proben bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des Antikörpers bzw. von IgG als Negativkontrolle wurden die Proben bei 4°C über Nacht auf einem Überkoprotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz um 50 µl gewaschener und 1:1 mit DPBS verdünnter Agarosebeads ergänzt und 2 Stunden bei 4°C rotiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C befanden sich die

Material und Methoden

unlöslichen Antikörper-Protein-Komplexe im Pellet und der Überstand konnte verworfen werden. Die Komplexe wurden 3-mal mit 500 µl DPBS gewaschen und anschließend 65 µl 1x Lämmli hinzugefügt. Durch Erhitzen bei 95°C für 5 Minuten wurden Proteinkomplexe aus den Agarosebeads freigesetzt und konnten für eine Gelelektrophorese verwendet werden.

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
NFATc1	Maus	1:500	Santa Cruz
c-Jun	Kaninchen	4 µg	Millipore
IgG	Maus	1:500	Roche
IgG	Kaninchen	1:500	Roche

Tabelle 17: IP-Antikörper

3.11.6 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP erlaubt die Analyse von Protein-DNA-Interaktionen und lässt somit Rückschlüsse auf die transkriptionelle Genregulation zu. Proteine, deren DNA-Bindungsverhältnis untersucht werden soll, werden präzipitiert und gebundene DNA-Fragmente in der abschließenden qRT-PCR quantifiziert.

Chromatinisolierung

Für den Versuch wurden pro Kondition Zellen aus 3 20 cm Kulturschalen benötigt. War eine Konfluenz von 90% erreicht, konnte mit der Isolation begonnen werden. Zunächst mussten die Protein-DNA-Bindungen fixiert werden. Dieses erreichte man durch Zufügen von 274 µl 37%igen Formaldehyd in das Kulturmedium, um Amino- und Iminogruppen bei ausreichender räumlicher Nähe kovalent miteinander zu verknüpfen. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 550 µl 2,5M-Glycin gestoppt. Waren weitere 5 Minuten Inkubation vergangen, wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen 2-mal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in DPBS mit einem Zellschaber mobilisiert und die Suspension in ein 15 ml Falcon überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und

Material und Methoden

das Pellet mit 3 ml 25x Complete haltigem Lysepuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C wurde das Pellet in dem gleichen Volumen an Proteaseinhibitoren enthaltendem RIPA-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Fragmentierung des Chromatins auf eine Größe von 200 bis 1000 bp. Hierfür wurden die nukleären Lysate in einem Ethanoleisbad sonifiziert (20% Amplitude, 120, 140 Pulse). Danach wurde das Chromatin bei 4°C und 13000 rpm 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für den weiteren Versuchsablauf verwendet.

50 µl des Chromatins wurden von jeder Probe abgenommen, um eine Reversion der Formaldehydfixierung durchzuführen. Hierfür wurde das Chromatin mit RNase A und Proteinase K versetzt und 3 Stunden bei 55°C und anschließend bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA auf ein Agarosegel geladen und die Chromatingröße bestimmt. Überschritten die Fragmente eine Größe von 1000 bp, erfolgte erneut ein Sonifizierungsschritt. Andernfalls konnte mit dem Preclear fortgefahren werden.

Um für die sich später anschließende Immunpräzipitation gleiche Konzentrationen einsetzen zu können, wurden 40 µl der sonifizierten und mit RNase A und Proteinase K verdauten DNA mithilfe des Qiagen Purification Kits aufgereinigt und anschließend in ihrer Konzentration bestimmt.

Preclearing

Agarose A- und G-Beads wurden über Nacht bei 4°C mit BSA (20 mg/ml) und 400 µl Proteinaseinhibitor in 10 ml RIPA-Puffer geblockt. Am nächsten Tag wurden die geblockten Beads zentrifugiert, mithilfe von RIPA-Puffer 50 verdünnt und jeder Chromatinprobe 100 µl der geblockten Beads hinzugefügt. Die Zugabe von IgG erhöhte die Effizienz des Preclearings, das für 2 Stunden auf einem Überkopffrotator erfolgte.

Immunpräzipitation

Nach dem Preclear wurden die Proben erneut 5 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und 30- 40 µg Chromatin aus dem Überstand für die Immunpräzipitation in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des Antikörpers erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Überkopffrotator. Das restliche Chromatin wurde für die Inputkontrolle benötigt. Am nächsten Tag wurden den

Material und Methoden

Immunpräzipitationsproben 50 µl Agarosebeads hinzugefügt und diese für weitere 2 Stunden bei 4°C rotiert.

Waschen

Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C wurde der Überstand vorsichtig mittels einer Spritze mit einer 0,45 x 25 mm Kanüle abgesaugt. Das Pellet wurde nun mit 1 ml der folgenden Waschpuffer gewaschen: Waschpuffer I 1x, Waschpuffer II 1x, Waschpuffer III 2x, TE-Puffer 2x. Zwischen den einzelnen Waschschritten erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm und 4°C.

Reversion

Im Anschluss an die Waschschriffe wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten mit 30 µg/ml RNase bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 10%SDS und 2,5 µl Proteinase K hinzugefügt und die Temperatur des Heizblocks nach vierstündiger Inkubation bei 37°C über Nacht auf 65°C erhöht. Analog zu den IP-Proben wird wurde auch mit den Input- Proben verfahren.

Purification

Bevor die DNA endgültig verwendet werden konnte, erfolgte die Aufreinigung der Proben mithilfe des Qiaquick PCR Purification Kits und dem Protokoll des Herstellers. Für die qRT-PCR wurden 2 µl DNA verwendet. Um die Ergebnisse zu normalisieren, wurde der Input-Wert von den Werten der IP-Proben abgezogen.

Name	Herkunft	Konzentration	Hersteller
NFATc1	Kaninchen	4 µg	Santa Cruz
c-Jun	Kaninchen	4 µg	Millipore
RNA-Polymerase II	Maus	2 µg	Millipore
H3K4me3	Kaninchen	1:100	Cell Signalling
IgG	Maus	2 µg	Santa Cruz

Material und Methoden

IgG	Kaninchen	2 µg	Santa Cruz
-----	-----------	------	------------

Tabelle 18: ChIP-Antikörper

Primer	Sequenz
Sox9 +370bp	For: cgcgtatgaatctcctggac Rev: ggtgttctccgtgtccg

Tabelle 19: ChIP-Primer

3.12 Histologie

Fixierung des Gewebes

Nach der Opferung der jeweiligen Maus wurde ein Teil des Pankreas bei Raumtemperatur in Formaldehyd fixiert, um danach bei 4°C in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert zu werden. Anschließend wurde das aufbereitete Pankreas in einem Paraffinblock konserviert und nach dessen Aushärtung mit dem Mikrotom auf 4 µm geschnitten und auf Objektträgern fixiert

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese in der Medizin oft eingesetzte Übersichtsfärbung basiert auf der Nutzung 2er verschiedener Farbstoffe. Einerseits färbt Hämatoxylin als basisches Hämalan sauer bzw. basophile Strukturen wie z.B. DNA, Zellkern blau. Andererseits werden eosinophile bzw. basische Zellbestandteile wie z.B. Proteine des Zytoplasmas und Mitochondrien von dem sauren Farbstoff Eosin rot eingefärbt. Zur Entparaffinisierung legte man die eingebetteten Gewebeschnitte 2-mal für 5 Minuten in Xylol ein. Anschließend wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 90%, 80%, 70%, 50%) rehydriert und 2-mal 2 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation im basischen Hämalan mit anschließendem Spülen unter fließendem Leitungswasser. Hiernach wurden die Schnitte mit einer 0,5% Alkohol enthaltenden Eosinlösung für 30 Sekunden gegengefärbt und erneut unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Um die gefärbten Gewebeschnitte wieder zu dehydrieren, durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%,

Material und Methoden

99%) für jeweils 2 Minuten und wurden danach in Xylol inkubiert. Die abschließende Einbettung erfolgte in DePeX-Einbettmedium.

Immunhistochemie

Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion in Gewebeschnitten detektiert und lokalisiert werden können. Hierfür wurden sowohl humane Pankreasgewebe (Institut für Pathologie, Philipps-Universität Marburg) als auch murine Paraffinschnitte verwendet. Dadurch gelang die Zuordnung verschiedener Struktur- oder Funktionsproteinen zu deren zugehörigen Zellkompartimenten. Die Färbungen wurden mit dem Vectastain®ABC Kit durchgeführt.

Die eingebetteten Gewebeschnitte mussten zunächst 2-mal 5 Minuten in Xylol entparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (99%-50%) rehydriert werden. Um die Fixierung mit Formaldehyd aufzuheben, wurden die Schnitte 10 Minuten in Citratpuffer oder Tris/EDTA-Puffer gekocht, danach auf Eis wieder herunter gekühlt und in destilliertem Wasser gewaschen. Durch 10-minütige Inkubation mit 3%igem H₂O₂ wurde die endogene Peroxidase blockiert und damit Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen verhindert. Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu umgehen, wurden die Schnitte nach erneutem Waschen mit PBST eine Stunde bei Raumtemperatur in 10%igem BSA inkubiert. Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in PBST mit 10%igem BSA bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag erfolgte nach 3-maligem Waschen in PBST die einstündige Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach erneutem mehrmaligem Spülen mit PBST wurde das Gewebe für eine Stunde mit dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Methode) inkubiert. Durch die irreversible Bindung der ABC-Lösung zu dem Sekundärantikörper wurde folglich der Primärantikörper und somit auch das Zielprotein identifiziert. Dieses wurde durch eine Inkubation mit Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), welches durch eine Reaktion mit H₂O₂ positive Areale braun anfärbt, visualisiert.

Material und Methoden

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
pErk	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling
pEGFR	Kaninchen	1:100	Santa Cruz
NFATc1	Kaninchen	1:100	Abcam
Cytokeratin19	Kaninchen	1:50	Santa Cruz
Amylase	Maus	1:600	Santa Cruz
c-Jun	Kaninchen	1:100	Santa Cruz
Phospho-c-Jun	Maus	1:400	Santa Cruz
Sox9	Kaninchen	1:6000 1:500	Abcam

Tabelle 20: Immunhistologie Primärantikörper

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti Maus	Pferd	1:200	Vector Labs
Anti Kaninchen	Ziege	1:200	Vector Labs

Tabelle 21: Immunhistologie Sekundärantikörper

Quantifizierung der ADM

Um die azinär-duktales Metaplasien quantifizieren zu können, wurde die akkumulierte Fläche der ADM in einem Pankreas bestimmt und in Relation zur gesamten Fläche des Pankreas für jedes Tier erfasst.

3.13 Statistische Auswertung

Für alle numerischen Ergebnisse wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD), bzw. Standardfehler (SE) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 NFATc1-Expression in der entzündungsgetriggerten ADM des Pankreas

Wie schon in Vorarbeiten beschrieben, kooperiert die Aktivierung des EGFR-Signalweges mit onkogenem Kras in der Entstehung des Pankreaskarzinoms (Ardito et al., 2012; Navas et al., 2012). Untersuchungen in transgenen Mausmodellen zeigen, dass eine konstitutive Aktivierung des Protoonkogen Kras nur mit einer langen Latenzzeit zur Entstehung eines PDAC führt, dass dieser Prozess aber durch eine zusätzliche chronische Entzündungsreaktion des Pankreas akzeleriert werden kann (Guerra et al., 2007). Im Rahmen einer chronischen Pankreatitis werden inflammatorische Signalwege wie der EGFR-Signalweg aktiviert (Baumgart et al., 2014; Friedlander et al., 2009; Hruban et al., 2008). Ebenso wurde in Vorarbeiten die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc1 in der entzündungsgetriggerten Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms beschrieben (Baumgart, 2014; Buchholz et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von NFATc1 mit der entzündungsgetriggerten Induktion des EGFR-Signalwegs in der frühen Karzinogenese des Pankreas kooperiert. Um die Bedeutung des inflammationsabhängig aktivierten EGFR-Signalwegs für die humane Pankreaskarzinogenese darzustellen, wurde humanes Pankreasgewebe von Patienten mit einer chronischen Pankreatitis untersucht. In der H&E Färbung (Abb. 6) ließen sich die mit einem * gekennzeichneten metaplastische Strukturen erkennen. Im Gegensatz zu im gesunden Pankreasgewebe vorkommenden proteinsezernierenden, basophilen Drüsenzellen mit viel Sekretgranula konnte man hier irreguläre duktale Strukturen mit iso- bis hochprismatischem Epithel mit verminderten Granula erkennen. Die intakte Struktur des exokrinen Pankreas verlor seine Integrität zugunsten einer azinär-duktalem Metaplasie bei simultaner Zunahme von fibrotischen Strukturen. Es zeigte sich eine hohe Expressionsrate von phosphoryliertem und damit aktiviertem EGFR im Zytoplasma metaplastischer Zellen. Die Aktivität des EGFR-Signalwegs ließ sich darüber hinaus durch hohe Expressionslevel an phosphorylierter mitogenaktivierter Kinase Erk (pErk) nachweisen. Die immunhistochemischen Analysen zeigten außerdem eine hohe Expressionsrate des Transkriptionsfaktors NFATc1. Die stärkste NFATc1-Expression fand sich in den Arealen der azinär-duktalem Transdifferenzierung, während die nicht

Ergebnisse

metaplastischen azinären Zellen nur in einem sehr geringen Maße NFATc1 exprimierten. Das vorwiegend nukleäre NFATc1-Expressionsmuster innerhalb der ADM sprach für das Vorhandensein von dephosphorliertem, also aktivem NFATc1.

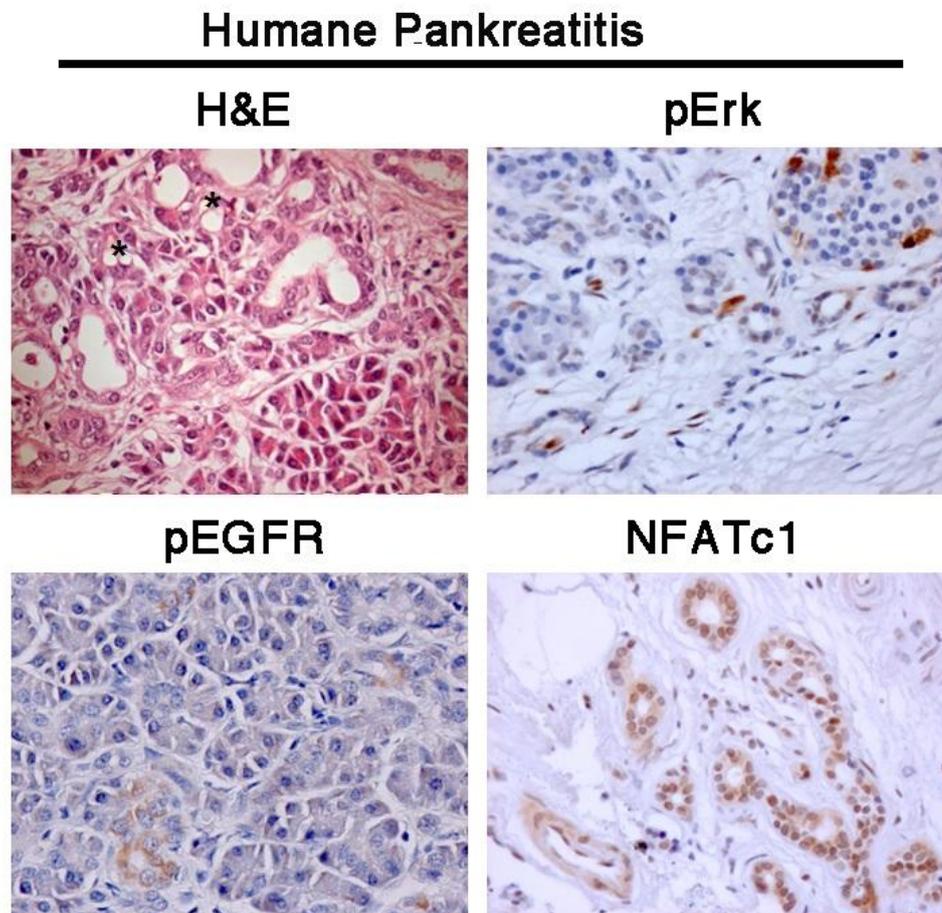
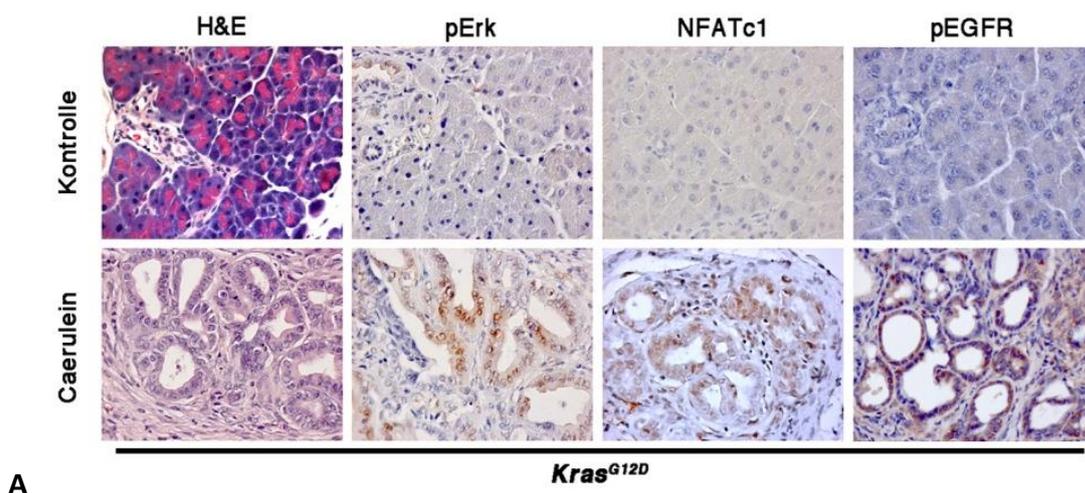


Abbildung 6: H&E und immunohistochemische Färbung im humanen Pankreasgewebe. Humane Pankreasschnitte von Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden mit NFATc1-, pErk- und pEGFR-Antikörpern inkubiert. Mit einem * wurden in der H&E Färbung Areale der azinär-duktaalen Transdifferenzierung gezeigt.

Um die Funktion von NFATc1 in der inflammationsgetriggerten Pankreaskarzinogenese zu untersuchen, wurden transgene PDX1-Cre;LSL-Kras^{G12D} (fortan Kras^{G12D})-Mäuse mit einer konditionalen onkogenen Aktivierung von Kras verwendet. Die 8 Wochen alten Tiere wurden für eine Dauer von 4 Wochen entweder mit Caerulein oder mit DMSO behandelt, um eine chronische Pankreatitis zu induzieren (Guerra et al., 2011). Caerulein, ein Cholezystokininanalogon, induziert in supraphysiologischen Dosen durch elevierte Calciumlevel die azinäre Proteasenaktivität und erzeugt durch den entstehenden Selbstverdau eine Entzündungsreaktion. Die Nutzung von Caerulein zur

Ergebnisse

Induktion einer Pankreatitis ist in der Arbeit mit genetisch veränderten Mausmodellen weit verbreitet und gut etabliert (Guerra et al., 2007; Willemer et al., 1992). Im Vergleich zur Kontrollkohorte zeigten die mit Caerulein behandelten Mäuse eine deutliche Veränderung der exokrinen Pankreasstrukturen (Abb. 7A). Nach 4-wöchiger Caeruleinbehandlung waren stromareiche Areale und azinär-duktales Metaplasien entstanden. Weiterhin zeigte sich in Analogie zur humanen chronischen Pankreatitis eine vermehrte Aktivierung des EGFR-Signalweges nach Entzündungsinduktion. Wie in Abbildung 7B zu erkennen, konnten die Ergebnisse der Immunhistochemie auch in einer weiteren Proteinanalyse des Gesamtzelllysats des murinen Pankreas bestätigt werden. Auch hier stieg die Expression des Wachstumsfaktors EGF, dessen aktivierten Rezeptors und des phosphorylierten Erks nach Inflammationsinduktion deutlich an. Immunhistochemische Färbungen im Pankreas von Kontrollmäusen zeigten keine bzw. nur eine sehr geringe zytoplasmatische NFATc1-Expression. Im Gegensatz dazu präsentierten die metaplastischen Strukturen der Mäuse nach Caerulein-Behandlung vor allem in den Kernen der transdifferenzierten Zellen eine robuste Expression von NFATc1. Dies spricht sowohl für eine Expressionszunahme des Transkriptionsfaktors nach Induktion der inflammatorischen Signalwege, als auch für eine gesteigerte Aktivität von NFATc1 (Okamura et al., 2000).



Ergebnisse

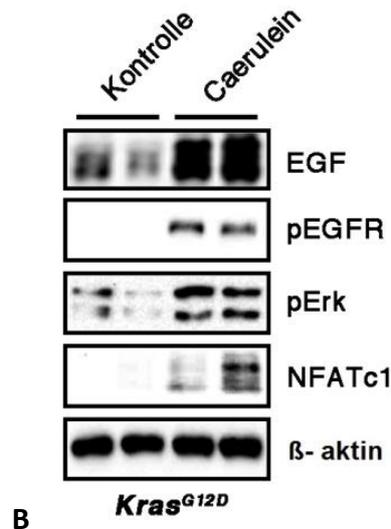


Abbildung 7: Expressionsanalysen in Pankreata von *Kras^{G12D}*-Mäusen. *Kras^{G12D}*-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt und 4 Wochen mit Caerulein/DMSO behandelt. **(A)** Repräsentative Ausschnitte von H&E und immunhistochemischen Färbungen. **(B)** Western Blot-Analyse von Pankreaslysat. β -aktin diente als Ladekontrolle.

Um die Rolle von NFATc1 in der Induktion der azinär-duktalen Metaplasie zu untersuchen, wurde in den folgenden Experimenten mit extrahierten Azinuszellen des *Kras^{G12D}*-Mausmodells gearbeitet. Diese Methode erlaubt es, den azinär-duktalen Transdifferenzierungsprozess unabhängig von dem umgebenden Stroma oder dem Einfluss des Immunsystems zu untersuchen. Die extrahierten Zellen in der Behandlungsgruppe wurden mit 20 ng/ μ l des EGFR-Liganden EGF behandelt, um den EGFR-Signalweg zu aktivieren. Die Kontrollzellen wurden in EGF-freiem Medium kultiviert. Wenn isolierte Azini in Kollagen kultiviert werden, lässt sich lichtmikroskopisch die Konfiguration der Zellen erkennen. Vergleich man die Azinuszellmorphologie 48 Stunden nach sowie ohne Behandlung zeigten sich deutliche Strukturänderungen der Zellen (Abb. 8A, 9A). Ohne Behandlung stellten sich Zellverbände bestehend aus kleinen granulohaltigen Drüsenzellen dar. 48 Stunden nach EGF-Behandlung führte die Aktivierung des EGFR-Signalwegs zur Entstehung epithelialer, duktalähnlicher Zellen mit wenig Zytoplasma (Abb. 8A). Aus den extrahierten Azinuszellen wurden zusätzlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten Zellen für Expressionsanalysen auf mRNA bzw. Proteinebene entnommen. Zunächst zeigte sich nach EGF-Behandlung eine robuste Expressionszunahme von NFATc1 (Abb. 8B). Darüber hinaus erschloss sich, dass sich die Expression relevanter duktaler

Ergebnisse

Differenzierungsmarker wie E-cadherin, Cytokeratin 19, Cytokeratin 7 48 Stunden nach EGF-Behandlung vervielfachte (Abb. 8B, 9D). E-cadherin, Cytokeratin 7 und Cytokeratin 19 sind duktale Differenzierungsmarker (Almoguera et al., 1988; Bouwens, 1998; Geiger & Ayalon, 1992; Ramaekers et al., 1990) und gelten somit als Surrogatparameter für den Differenzierungsverlust der Azini und deren Transdifferenzierung zu dukталen Zellen. In einer mRNA-Expressionsanalyse war nach Induktion der ADM durch EGF eine Verdoppelung der Cytokeratin 19-Expression zu sehen (Abb. 9D). In Zusammenschau mit den morphologischen Veränderungen nach EGF-Behandlung sprechen die veränderten Gensignaturen für eine Transdifferenzierung der azinären in duktalähnliche Zellen. Außerdem erfolgte nach 24-stündiger EGF-Behandlung eine mRNA-Analyse (Abb. 8C) des Transkriptionsfaktors NFATc1, bei der sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine 7-fache Zunahme der NFATc1-Expression nach EGF-Behandlung zeigte. Zusammenfassend bestätigen die Untersuchungen in Azinuszelllexplantaten die *in vivo* Studien im $Kras^{G12D}$ -Mausmodell und die Untersuchungen in humanen chronischen Pankreatitisproben und bestärken somit die These einer EGFR-abhängigen Aktivierung von NFATc1 in der azinär-dukталen Metaplasie des Pankreas.

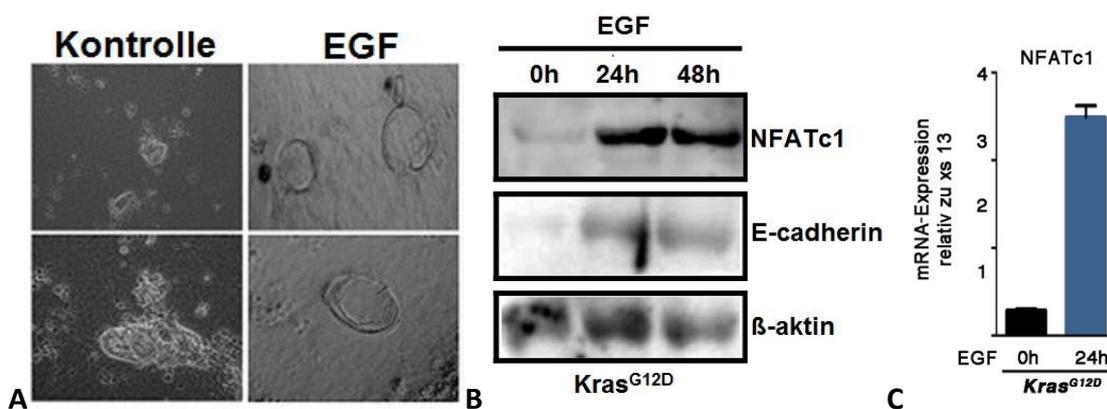
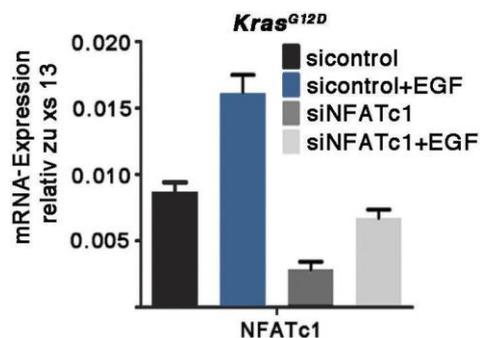
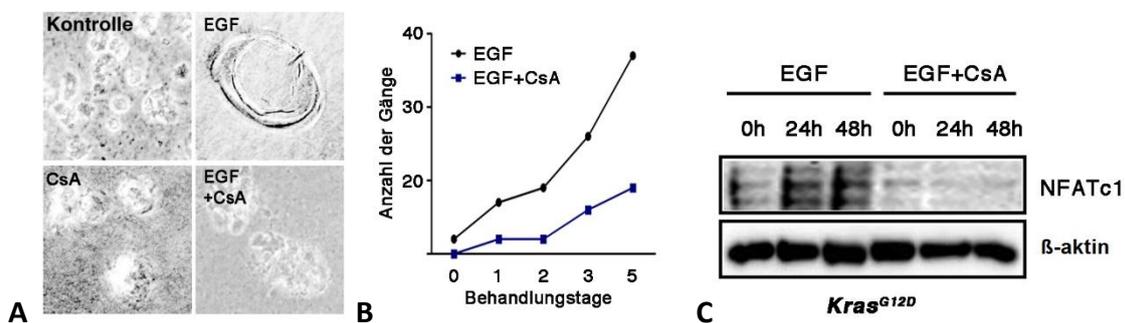


Abbildung 8: Induktion von ADM und NFATc1 in vitro durch EGF-Behandlung. Für alle hier aufgeführten Experimente wurden extrahierte Azinuszellen von $Kras^{G12D}$ -Mäusen genutzt. **(A)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Azinuszelllexplantate 48 h nach Azinuszellextraktion und deren Kultivierung in Kollagen ohne bzw. mit EGF-Behandlung. **(B)** Das Western Blot-Verfahren zeigt die NFATc1-Expression nach den angezeigten Zeitpunkten. β -aktin diente als Ladekontrolle. **(C)** mRNA-Expression von NFATc1 mit und ohne EGF-Behandlung nach Durchführung einer qRT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression des Haushaltsgens xs13. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

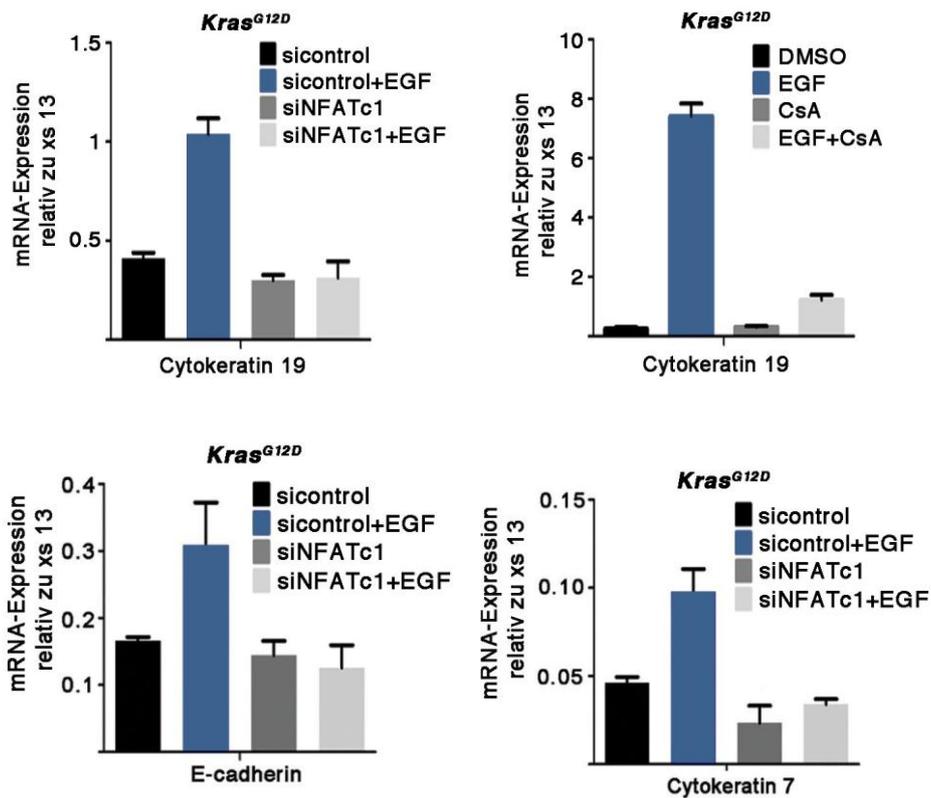
Ergebnisse

4.2 Die Hemmung von NFATc1 vermindert die EGFR-induzierte ADM *in vitro* und *in vivo*

Um die Relevanz der NFATc1-Aktivierung in der EGFR-induzierten Transdifferenzierung azinärer Zellen zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit isolierten Azinuszellen durchgeführt und die Aktivierung des Calcineurin-NFATc1-Signalwegs durch Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A (CsA) gehemmt. Im Western Blot bestätigte sich die erfolgreiche Inhibition von NFATc1 (Abb. 9C). Bedeutsamer Weise führte die Inhibition des Calcineurin-NFATc1-Signalwegs zu einer signifikanten Reduktion der EGFR-vermittelten azinären Metaplasie (Abb. 9A und 9B) sowie zu einer reduzierten Zunahme der Expressionen der dukталen Markerproteine Cytokeratin 19, Cytokeratin 7 sowie E-cadherin nach EGF-Behandlung (Abb. 9D). In Analogie zu der pharmakologischen Inhibition des Calcineurin-NFATc1-Signalwegs verminderte auch die siRNA-vermittelte genetische Depletion des Transkriptionsfaktors den EGFR-induzierten Anstieg der Cytokeratin 19-mRNA-Expression (Abb. 9D).



Ergebnisse



D

Abbildung 9: Einfluss der pharmakologischen oder genetischen Depletion auf die ADM-Entstehung *in vitro*. Für alle hier aufgeführten Experimente wurden isolierte Azinuszellen von *Kras^{G12D}*-Mäusen genutzt. **(A)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Azinuszelllexplantate 48 h nach Azinuszelleextraktion und deren Kultivierung in Kollagen mit EGF-Behandlung. **(B)** Quantifizierung der ADM-Areale nach den dargestellten Behandlungen. **(C)** Darstellung der NFATc1-Expression im Western Blot nach Behandlung mit EGF und EGF+CsA. Als Ladekontrolle dient β -aktin. **(D)** Auf mRNA-Ebene ist mittels der qRT-PCR die Expression von NFATc1 sowie der Duktalmarker Cytokeratin 19, E-cadherin und Cytokeratin 7 48 h nach genetischer Depletion mittels siRNA oder pharmakologischer Inhibition mittels CsA (0,5 μ mol/l) von NFATc1 mit und ohne EGF-Behandlung dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression des Haushaltgens *xs13*. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Diese Daten zeigen, dass die Hemmung von NFATc1 die EGFR-induzierte azinär-duktales Transdifferenzierung behindert.

Um die Bedeutung von NFATc1 in der inflammationsgetriggerten Pankreaskarzinomentstehung zu untersuchen, wurde ein konditionales NFATc1-Knockout-Mausmodell etabliert (*NFATc1^{Δ/Δ}*) und mit den bereits beschriebenen PDX1-Cre;LSL-*Kras^{G12D}*-Tieren gekreuzt, um transgene Tiere mit dem Genotyp *NFATc1^{Δ/Δ};PDX1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* zu erhalten (desweiteren als *Kras^{G12D};NFATc1^{Δ/Δ}*-

Ergebnisse

Mäuse bezeichnet). Die $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse zeigten keine Einschränkungen bei der embryonalen Entwicklung und das Pankreas dieser Tiere wies im Vergleich zu $Kras^{G12D}$ -Mäusen keine morphologischen und funktionalen Unterschiede auf (Baumgart et al., 2014 und Chen et al., 2015). 8 Wochen alte $Kras^{G12D}$ - sowie $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse wurden 5-mal pro Woche für eine Dauer von 4 Wochen intraperitoneal mit Caerulein, DMSO und die $Kras^{G12D}$ -Mäuse zusätzlich mit CsA behandelt. Die erfolgreiche genetische Depletion von NFATc1 bzw. dessen pharmakologische Inhibition wurde in immunhistochemischen Analysen und mittels Western Blot bestätigt (Abb. 10A, 10B). Histologische Analysen der Pankreata der verschiedenen transgenen Modelle zeigten eine starke Reduktion des metaplastischen Phänotyps der Caerulein behandelten $Kras^{G12D}$ -Mäuse nach pharmakologischer oder genetischer NFATc1-Inhibition (Abb. 10A). Die Quantifizierung metaplastischer Areale in den verschiedenen Modellen bestätigte eine Reduktion der Pankreasmetaplasie von 40% der gesamten Pankreasfläche in Caerulein behandelten $Kras^{G12D}$ -Mäusen auf 7% bzw. 5% in CsA-behandelten $Kras^{G12D}$ -Tieren oder $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Tieren (Abb. 10C). Bemerkenswerter Weise ließen sich in der H&E Färbung bei vorliegender NFATc1-Inhibition trotz Caerulein-Behandlung nur wenige Veränderungen erkennen. Im Vergleich zu den mit Caerulein behandelten $Kras^{G12D}$ -Tieren zeigte sich eine reduzierte Entzündungsreaktion mit verminderter Stromabildung und Fibrosierung. Darüber hinaus waren kaum azinär-duktales Metaplasien zu erkennen. Äquivalent dazu fand sich in CsA behandelten $Kras^{G12D}$ -Mäusen sowie in $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Tieren eine verminderte Expression des duktales Markers Cytokeratin 19 nach Caerulein-Behandlung (Abb. 10A, 10B). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach NFATc1-Inhibition eine konstante Amylase-Expression. Amylase ist ein Polysaccharid spaltendes Enzym, das als Marker für die funktionelle Integrität des exokrinen Pankreas genutzt werden kann. So zeigte sich bei ungehemmter NFATc1-Expression und Caerulein-Behandlung eine deutlich reduzierte Amylase-Expression. Diese Daten bestätigen die Bedeutung der Aktivierung von NFATc1 für die inflammationsgetriggerte ADM des Pankreas und beschreiben eine essentielle Funktion des Transkriptionsfaktors in der Pankreaskarzinominitiation.

Ergebnisse

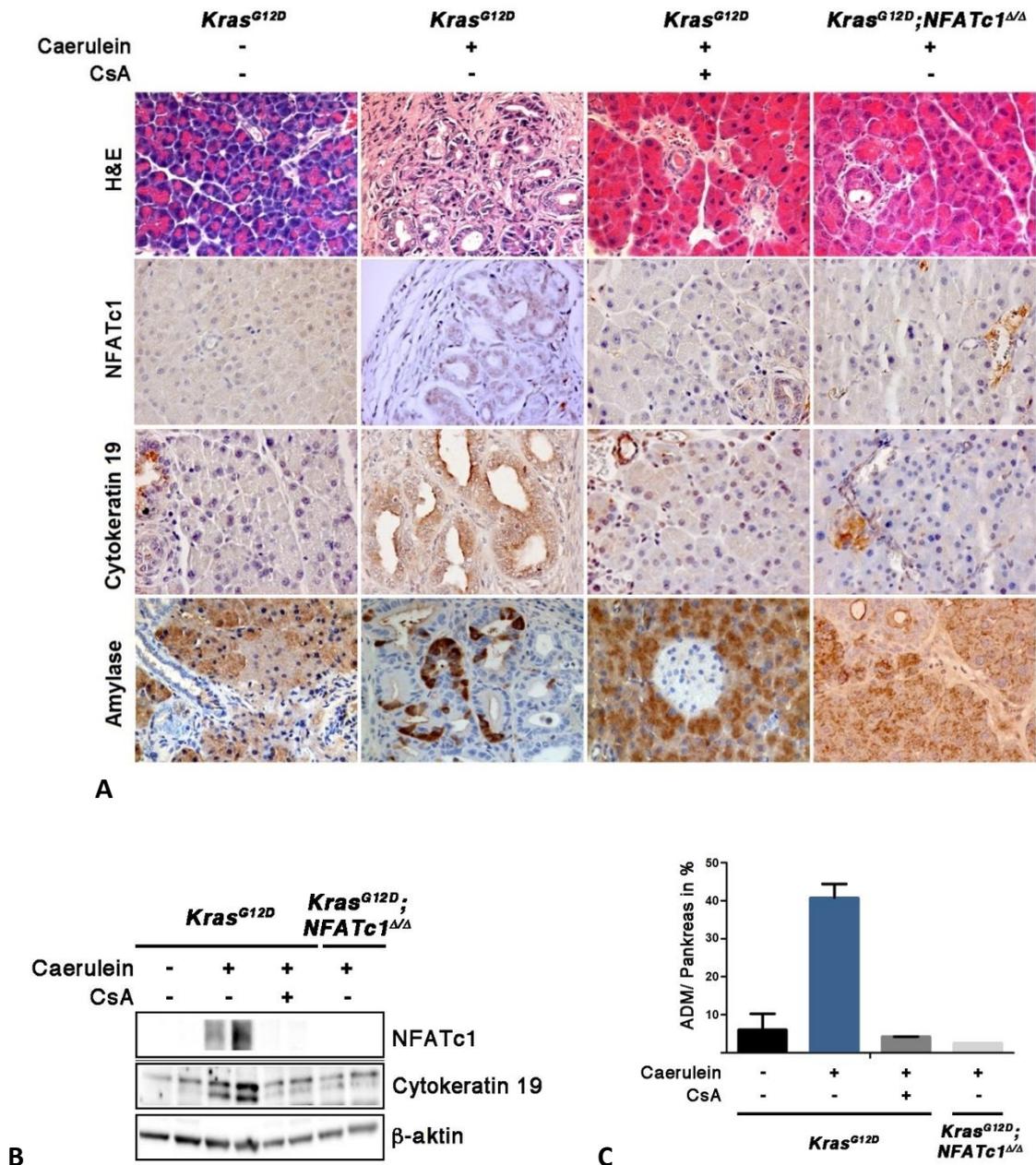


Abbildung 10: Einfluss von NFATc1 auf die inflammationsgetriggerte ADM *in vivo*. (A) *Kras*^{G12D}- oder *Kras*^{G12D};*NFATc1*^{Δ/Δ}-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt und 4 Wochen mit Caerulein/DMSO/CsA behandelt. Es erfolgte eine H&E-Färbung sowie eine IHC-Analyse mit NFATc1-, Cytokeratin 19- und Amylase-Antikörpern. (B) Im Western Blot-Verfahren wird die Expression von NFATc1 und Cytokeratin 19 in Abhängigkeit der genetischen oder pharmakologischen Inhibition von NFATc1 dargestellt. Als Ladekontrolle dient β-aktin. (C) Quantifizierung der ADM in Abhängigkeit der NFATc1-Expression.

Ergebnisse

4.3 Die EGFR-abhängige Aktivierung von AP-1-Proteinen in der ADM des Pankreas

Für die Regulation seiner Zielgene interagiert NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren, die die Spezifität der Zielgenauswahl bestimmen. Ein wichtiger NFAT-Interaktionspartner in der Regulation von Zelladaptation und Wachstum ist die heterogene Familie der Activating Protein-1 (AP-1)-Transkriptionsfaktoren. Bisher war die gemeinsame Bindung an und Regulation von Zielgenen beider Transkriptionsfaktorfamilien vor allem für Zellen des Immunsystems bekannt (Macián et al., 2000). Darüber hinaus zeigten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte genomweite ChIP-Seq-Analysen in primären murinen Pankreaskarzinomzellen, dass in 47,3% der NFATc1-Bindungs-Peaks AP-1-Konsensussequenzen zu finden waren (Baumgart et al., 2014; Chen et al., 2015) (Abb. 11). Dies lässt auf eine zentrale Rolle von AP-1-Proteinen für die transkriptionellen Funktionen von NFATc1 im Pankreaskarzinom schließen.

AP-1-Bindungsstellen in NFATc1-Bindungsstellen

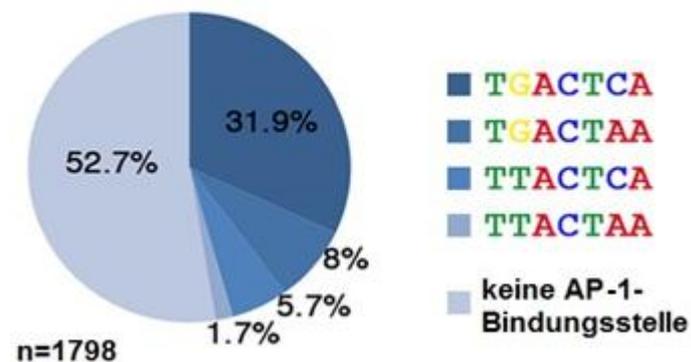


Abbildung 11: AP-1-Bindungsstellen innerhalb von NFATc1-Bindungsstellen. Das Diagramm zeigt den Anteil verschiedener AP-1-Bindungsstellen im Bereich von NFATc1-Peaks, die in einer ChIP-Seq untersucht wurden. Die Motiv-Analyse wurde mithilfe von *Regulatory sequence analysis Tools* (RSAT) durchgeführt (Sandra Baumgart et al., 2014; Chen et al., 2015).

Um nachvollziehen zu können, ob die Aktivierung der AP-1-Proteine mit NFATc1 in der EGFR-induzierten ADM kooperiert, wurden zunächst *in vitro* Zellen der Zelllinie 266-6 mit EGF behandelt. Bei 266-6-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie immortalisierter, azinärer Zellen, die murinem Pankreaskarzinomgewebe entnommen wurden und eine onkogene Kras-Mutation aufweisen (Davis et al., 1992). In Analogie zu den Azinuszell-explantaten zeigten sich nach 3- bzw. 6-stündiger EGF-Behandlung eine

Ergebnisse

Induktion der NFATc1-Expression, sowie eine Aktivierung des MAP-Kinasewegs. Ebenso nahm die Expression der aktiven AP-1-Proteine p-c-Fos und p-c-Jun zu (Abb. 12A). Die Proteinexpressions-Analysen der Pankreata der mit Caerulein behandelten Mäuse des $Kras^{G12D}$ -Mausmodells bestätigten diese Beobachtung (Abb. 12B).

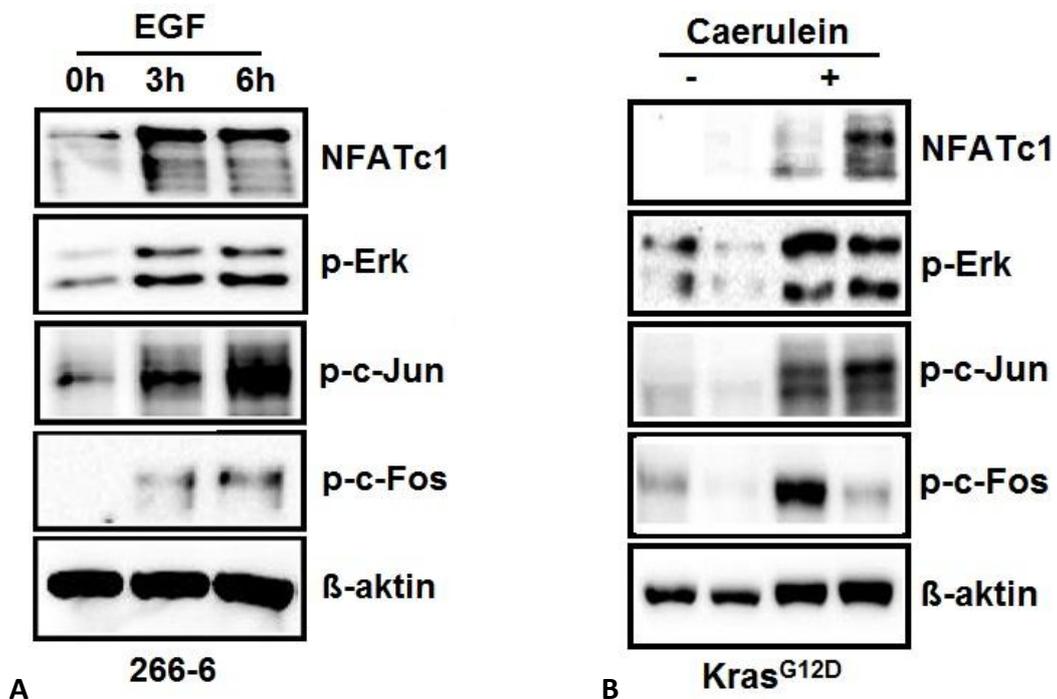


Abbildung 12: Darstellung der Proteinexpression der AP-1-Proteine p-c-Jun, p-c-Fos, sowie von p-Erk und NFATc1. (A) Zellen der 266-6-Zelllinie mit und ohne EGF-Behandlung. **(B)** Proteinexpression im Gewebe von $Kras^{G12D}$ -Mäusen in Abhängigkeit der Entzündungsinduktion im Western Blot. β-aktin diente als Ladekontrolle.

Abschließend belegten immunhistochemische Analysen (Abb. 13) die Expressionszunahme von c-Jun und p-c-Jun im Kontext der chronischen Pankreatitis: nach 4-wöchiger Caerulein-Behandlung von $Kras^{G12D}$ -Mäusen konnte eine deutliche Expressionszunahme von c-Jun und p-c-Jun vor allem in den metaplastischen Pankreasarealen gezeigt werden.

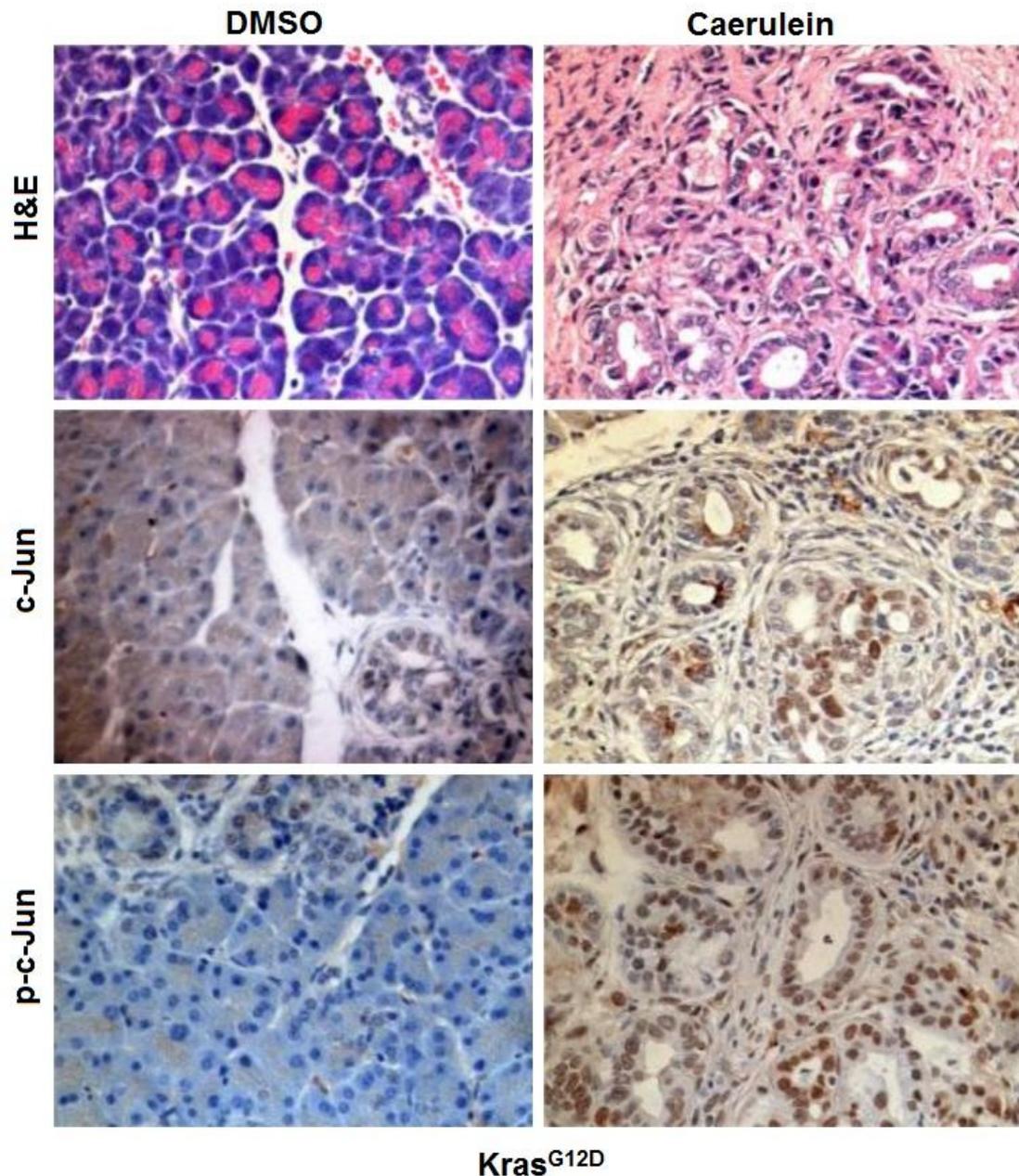


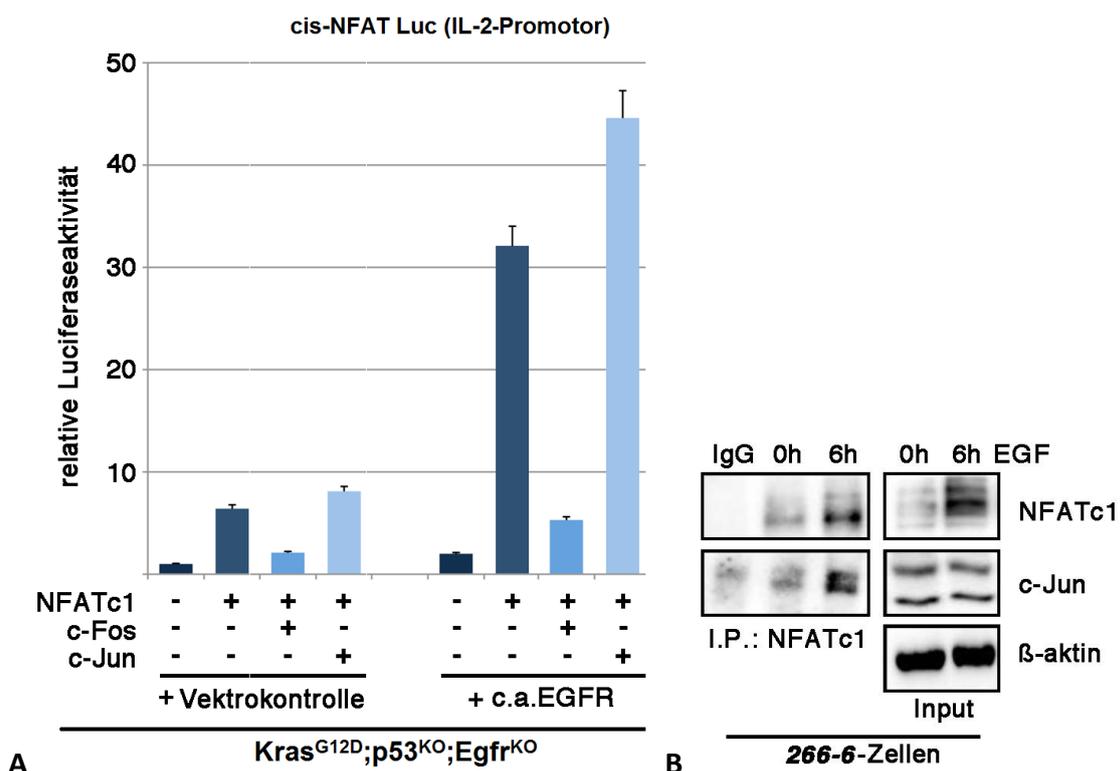
Abbildung 13: H&E Färbung und immunhistochemische Färbungen in Pankreasgewebe von $Kras^{G12D}$ -Mäusen. $Kras^{G12D}$ -Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen in Kontroll- bzw. Behandlungsgruppe randomisiert und für 4 Wochen mit DMSO bzw. Caerulein behandelt. Die Pankreasgewebsschnitte wurden mit c-Jun- und p-c-Jun-Antikörpern inkubiert.

4.4 Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun

Um die Relevanz der AP-1-Proteine c-Jun und c-Fos auf die EGFR-abhängige transkriptionelle Aktivität von NFATc1 zu untersuchen, wurde ein NFAT-responsiver IL-2-Promotor in primäre Pankreaskarzinomzellen aus $Kras^{G12D};p53^{wt/\Delta};Egfr^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen mit einer monoallelischen Deletion von p53 und einer Deletion von EGFR transfiziert.

Ergebnisse

Dieses Promotor-Konstrukt umfasst 3 hintereinandergeschaltete NFAT-/ GGAAA-Bindungsstellen. Die Transaktivierung des NFAT-responsiven Promotors wurde nach transienter Transfektion der Effektorplasmide NFATc1, c-Jun, c-Fos in der Anwesenheit und Abwesenheit von EGFR mithilfe eines Luciferase-Assays untersucht. Als Zielstruktur wurde hierfür der Interleukin-2-Promoter ausgewählt, der eine kosekutiv Aneinanderschaltung der NFAT Konsensussequenz GGAAA aufweist. In der EGFR-defizienten Situation konnte durch die Überexpression von NFATc1 sowie der AP-1-Proteine nur eine leichte Zunahme der Transaktivierung des IL-2-Promotors beobachtet werden (Abb. 14A). Durch Re-Expression des EGF-Rezeptors stieg die Luciferaseaktivität nach Überexpression von NFATc1 um mehr als das 3-fache an. Wurde nun zusätzlich zu dem NFATc1- und EGFR-Konstrukt ein c-Jun-Konstrukt überexprimiert, war die Luciferaseaktivität des cis-NFAT-Konstrukts am höchsten. Interessanterweise ließ sich durch die Überexpression des AP-1-Proteins c-Fos keine vergleichbare Zunahme der Transaktivierung des cis-NFAT-Promotors erreichen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Spezifität der NFATc1-Partnerauswahl in der EGFR-abhängigen azinär-duktalem Transdifferenzierung. Eine in 266-6-Zellen durchgeführte Co-Immunopräzipitation bestätigte die EGFR-induzierte Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun (Abb. 14B).



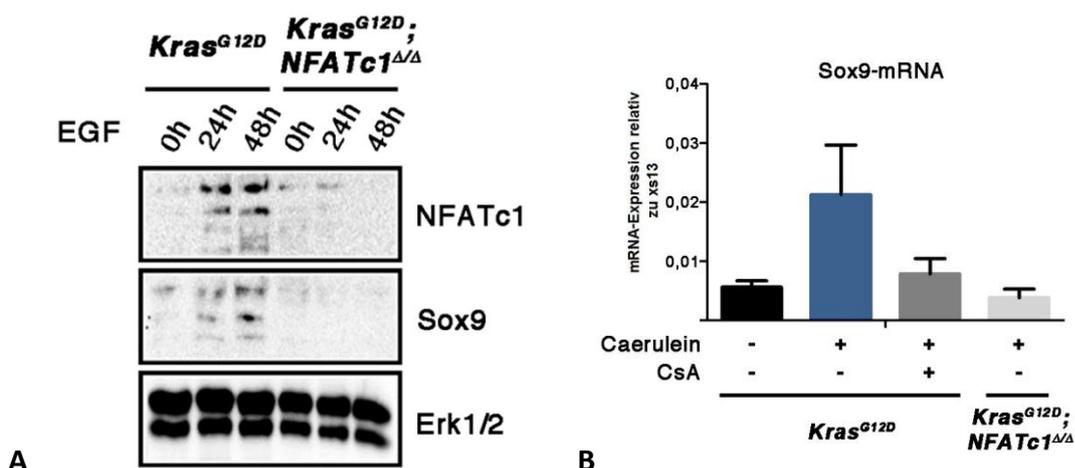
Ergebnisse

Abbildung 14: Interaktion von NFATc1 und c-Jun. (A) Luciferase-Reporter-Assay: in Zellen der $Kras^{G12D};p53^{wt/\Delta};Egfr^{\Delta/\Delta}$ -Zelllinie wird die Transaktivierbarkeit des IL-2-Promotors nach Transfektion von konstitutiv aktivem EGFR-, NFATc1-, c-Fos- und c-Jun-Konstrukten analysiert. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Angegeben ist die x-fache Induktion der Luciferaseaktivität \pm SD normalisiert auf die Renilla-Luciferaseaktivität. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (B) Immunpräzipitation in Zellen der 266-6-Zelllinie nach EGF-Behandlung. IgG diente als Negativkontrolle. β -aktin diente als Ladekontrolle.

Diese Daten identifizieren c-Jun als zentrales NFATc1-Partnerprotein in der entzündungsinduzierten ADM des Pankreas.

4.5 Die EGFR-vermittelte NFATc1;c-Jun-Interaktion reguliert die Expression von Sox9

Aktuellen Forschungsergebnissen zufolge beruht die azinäre-duktales Metaplasie auf der vermehrten Expression des duktales Gens Sox9 in den prämaligen Läsionen (Kopp et al., 2012). In Übereinstimmung damit führte die Induktion des EGFR-Signalwegs in Azinuszellexplantaten aus $Kras^{G12D}$ -Mäusen zu einer deutlichen Zunahme der Sox9-Expression (Abb. 15A). Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene im Pankreasgewebe von $Kras^{G12D}$ -Mäusen nach 4-wöchiger Behandlung mit Caerulein ergaben eine Zunahme der Sox9-Expression, was auf eine transkriptionelle Regulation der Sox9-Expression während der azinär-duktales Transdifferenzierung schließen lässt (Abb. 15B). Interessanter Weise unterblieb der Anstieg der Sox9-Expression trotz EGF- bzw. Caerulein-Behandlung, wenn die Aktivierung von NFATc1 pharmakologisch oder genetisch unterbunden wird (Abb. 15A, 15B). Diese Daten identifizieren Sox9 als transkriptionelles NFATc1-Targetgen.



Ergebnisse

Abbildung 15: Sox9-Expression in Abhängigkeit von EGF- bzw. Caerulein-Behandlung und vorliegender bzw. gehemmter NFATc1-Expression. (A) Western Blot-Analysen zeigen NFATc1- und Sox9-Expression in isolierten Azini der $Kras^{G12D}$ - oder $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse nach EGF-Behandlung. Erk 1/2 diente als Ladekontrolle. **(B)** Die Durchführung einer qRT-PCR zeigt die Sox9-mRNA-Expression in Pankreata der $Kras^{G12D}$ - oder $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse nach 4-wöchiger Caerulein- bzw. CsA-Behandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD relativ zur Expression des Haushaltgens *xs13*. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente

In detaillierten Sequenzanalysen des murinen Sox9-Promotors, also der Transkriptionsfaktor bindenden und Expression regulierenden Region des Sox9-Gens, zeigten sich 3 NFAT-Bindungsstellen mit unmittelbar benachbarten Bindungsstellen für AP-1-Proteine (Abb. 16A). Um die Auswirkung der Aktivierung der EGFR-vermittelten NFATc1;c-Jun-Interaktion auf die Expressionsaktivität von Sox9 zu untersuchen, wurde zunächst die Bindung der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und c-Jun 370 Basenpaare upstream des Sox9 Promotors untersucht (Abb. 16B). In einer Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) zeigte sich in 266-6-Zellen eine EGFR-abhängige Induktion sowohl der NFATc1-Bindung, als auch c-Jun-Bindung (Abb. 16B, 16C). Weiterhin zeigte sich nach EGF-Behandlung eine vermehrte Bindung der RNA-Polymerase II und eine Verdreifachung der Trimethylierung des Lysins 4 des Histons 3 (H3K4me3). Diese beiden Parameter zeigen die transkriptionelle Aktivität des Sox9-Gens an. Im Folgenden wurde die NFATc1-Aktivierung mit CsA gehemmt. Trotz EGF-Behandlung zeigte sich nach CsA-Behandlung eine Reduktion der NFATc1-Bindung und eine deutliche Abnahme der RNA-Polymerase II-Bindung und H3K4-Trimethylierung am Sox9-Promotor (Abb. 16B). Auch eine erfolgreiche Depletion von c-Jun mittels siRNA (Abb. 16C) zog bei simultaner EGF-Behandlung eine Reduktion der NFATc1 Bindung um das 5-fache und der Polymerase II-Bindung um die Hälfte nach sich (Abb. 16C). Die Zusammenschau der Sox9-Expressionsanalysen und der DNA-Bindungsstudien erlaubt die Identifikation von Sox9 als direktes NFATc1-Targetgen und verdeutlicht die Relevanz der NFATc1;cJun-Interaktion für die transkriptionelle Aktivierung von Sox9.

Ergebnisse

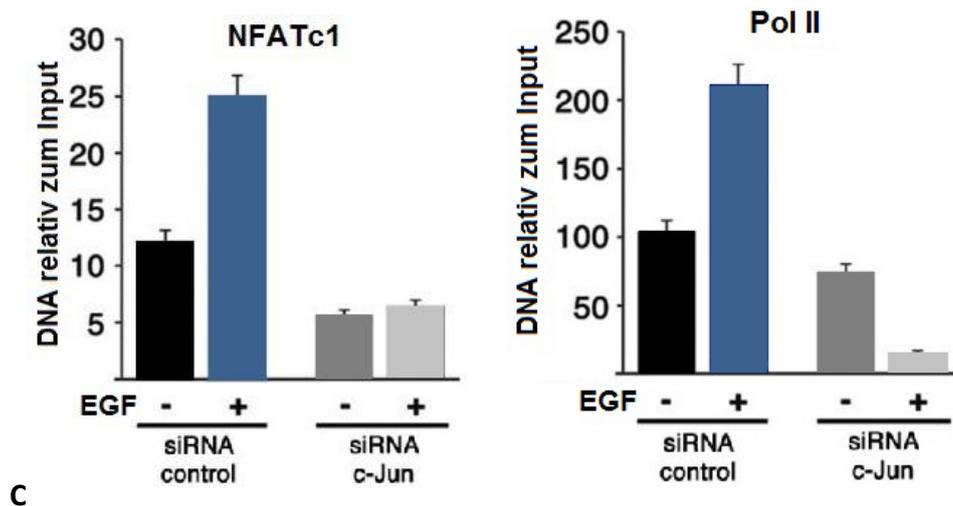


Abbildung 16: Bindung von NFATc1, c-Jun, Polymerase II, H3K4m3 am Sox9-Promotor +370bp. (A) Darstellung des murinen Sox9-Promotors mit darin liegenden NFATc1-Bindungsstellen mit benachbarten AP-1-Bindungsstellen. **(B)** Für alle folgenden gezeigten Daten wurden Zellen der 266-6-Zelllinie verwendet und jeweils 3 Stunden mit EGF bzw. EGF und CsA behandelt. Dargestellt ist die Bindung von NFATc1, c-Jun, Polymerase II und H3K4me3 am Sox9-Promotor nach Induktion des EGFR- NFATc1-Signalweges durch Behandlung mit EGF bzw. nach Inhibition von NFATc1 durch CsA. Angegeben ist die Bindung am Sox9-Promotor relativ zur Inputbindung und normalisiert auf IgG \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. **(C)** Bindung von c-Jun, NFATc1 und Polymerase II am Sox9-Promotor +370 bp in 266-6-Zellen mit c-Jun-Depletion nach EGF-Behandlung. Die Bindung ist relativ zur Inputbindung und wurde normalisiert auf IgG (\pm SD).

Abschließend wurde die Bedeutung der EGFR-induzierten NFATc1;c-Jun-Interaktion und der damit verbundenen Sox9-Expression noch einmal anhand immunhistochemischer Analysen *in vivo* verdeutlicht. Dafür wurden $Kras^{G12D}$ - und $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse über einen Zeitraum von 4 Wochen mit Caerulein, CsA, Caerulein und CsA oder in der Kontrollgruppe mit DMSO behandelt (Abb. 17). Die Azinuszellen des intakten exokrinen Pankreasgewebes zeigten keine signifikante Sox9-Expression. Infolge der EGFR-induzierten NFATc1;c-Jun-Komplexbildung (Abb. 14A, 14B) hingegen wurde der Duktalmarker Sox9 vor allem in den Arealen der azinär-duktaalen Metaplasie vermehrt exprimiert. Wird NFATc1 durch genetische Depletion nicht exprimiert oder durch pharmakologische Inhibition gehemmt, unterbleibt trotz Caerulein-Behandlung und damit Aktivierung des EGFR-Signalweges die Sox9-Expression auch *in vivo*. Demnach erfolgt die Sox9-Expression innerhalb der azinär-duktaalen Metaplasie NFATc1-abhängig.

Ergebnisse

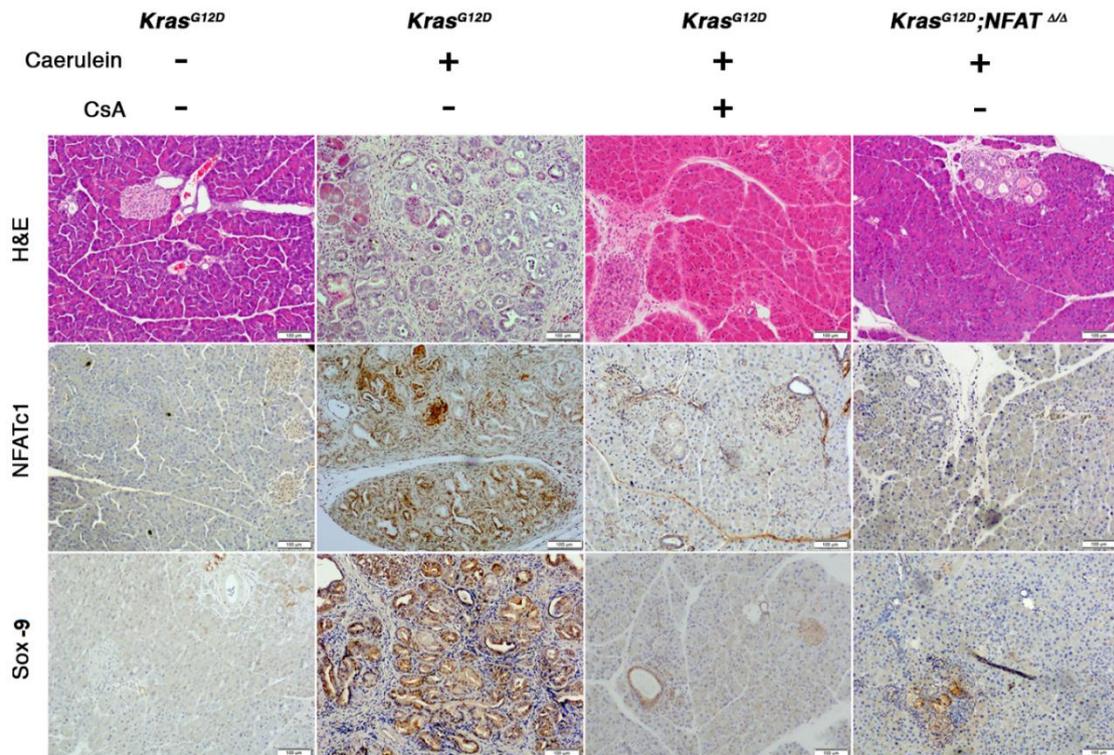


Abbildung 17: H&E und immunohistochemische Färbung im Pankreasgewebe von *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D};*NFATc1*^{Δ/Δ}-Mäusen. *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D};*NFATc1*^{Δ/Δ}-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt und 4 Wochen mit Caerulein/DMSO/CsA behandelt. Die Pankreasschnitte wurden mit NFATc1- und Sox9-Antikörpern inkubiert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Abhängigkeit der EGFR-induzierten azinären-duktalem Metaplasie von einer funktionellen Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun. Die Aktivierung des EGFR-Signals führt durch NFATc1-Induktion sowie dessen Interaktion mit c-Jun zur transkriptionellen Aktivierung von Sox9 innerhalb der ADM. Somit identifizieren diese Daten NFATc1 als zentralen Mediator der entzündungsassoziierten Pankreaskarzinominitiation.

5 Diskussion

5.1 Der Verlust von NFATc1 verhindert die EGFR-abhängige azinär- duktale Transdifferenzierung in der inflammationsassoziierten Pankreaskarzinomentstehung

Die konstitutive Aktivierung von Kras findet sich als Schlüsselmutation in nahezu allen invasiven Pankreaskarzinomen (Almoguera et al., 1988). Guerra und Kollegen zeigten allerdings in transgenen Pankreaskarzinom-Mausmodellen, dass eine alleinige Kras-Mutation nur selten und erst in sehr hohem Alter der Mäuse zu einer Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms aus prämaligen Vorläuferläsionen führt (Guerra et al., 2007). Vielmehr bedarf es des Vorhandenseins zusätzlicher Reize, um die Pankreaskarzinogenese zu beschleunigen und über die Stadien der Präinvasivität hinaus zu akzelerieren (Guerra et al., 2007). Eines der zentralen additiven Ereignisse der Kras-basierten Pankreaskarzinogenese ist die chronische Pankreatitis (Yadav & Lowenfels, 2013). Eine Begleitentzündung des Pankreas findet sich bei nahezu allen Pankreaskarzinompatienten und darüber hinaus wird die chronische Pankreatitis als bedeutsamer Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms angesehen (Yadav & Lowenfels, 2013).

Um die Bedeutung der chronischen Inflammation für die Pankreaskarzinogenese und Progression experimentell zu untersuchen, wurde ein Caerulein basiertes Mausmodell entwickelt, das auch in dieser Arbeit Anwendung findet (Guerra et al., 2007). Durch die Applikation supraphysiologischer Dosen des Cholezystokininanalogons Caerulein wird die Proteaseaktivität der exokrinen Pankreaszellen angeregt und eine milde Pankreatitis induziert (Willemer et al., 1992). Als Reaktion auf den Caerulein induzierten azinären Zellschaden geht die Azinuszelle entweder in Apoptose oder transdifferenziert zu einer duktalähnlichen Zelle (ADM), die morphologisch durch zystische Strukturen gesäumt von kubischen und squamösen Epithelien charakterisiert wird (Means et al., 2005). In der Abwesenheit onkogener Signale ermöglicht die azinäre Redifferenzierung eine Wiederherstellung der Pankreasintegrität und -funktion (Mallen-St Clair et al., 2012). Bei Vorliegen einer onkogenen Mutation von Kras hingegen handelt es sich bei der ADM um einen irreversiblen Prozess, der der Entstehung von PanIN-Läsionen vorausgeht (Jensen et al., 2005; Morris et al., 2010).

Diskussion

Aus diesem Grund wird die azinär-duktales Metaplasie als erster Schritt der Pankreaskarzinogenese definiert (Parsa et al., 1985).

Eine inflammationsbedingte Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege wurde bereits in vielen Arbeiten als molekulare Grundlage der entzündungsabhängigen Pankreaskarzinogenese diskutiert (Friedlander et al., 2009; Hruban et al., 2008; Korc et al., 1992; Navas et al., 2012). So blockiert der Verlust des EGF-Rezeptors die Kras-abhängige Pankreaskarzinogenese *in vivo* (Ardito et al., 2012; Navas et al., 2012). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Ardito et al., 2012; Korc et al., 1992; Means et al., 2003; Tobita et al., 2003) führte die Induktion einer chronischen Pankreatitis in Kras^{G12D}-Mäusen innerhalb der ADMs zu einer Aktivierung des EGFR-Signalwegs *in vivo*. Darüber hinaus resultierte die Stimulation von Azinuszellplantaten mit EGFR-Liganden in einer morphologisch sichtbaren und durch die Expressionszunahme duktales Marker quantifizierbaren ADM-Bildung. Ziel dieser Arbeit war es nunmehr, die EGFR-abhängigen Signalwege und transkriptionellen Mechanismen sowie deren responsive Aktivierung von Transdifferenzierungsprogrammen während der Pankreaskarzinominitiation zu untersuchen. Wir fokussierten unsere Arbeiten dabei auf NFATc1, einen inflammatorischen Transkriptionsfaktor mit Schlüsselfunktionen in der entzündungsassoziierten Karzinogenese zahlreicher Tumorentitäten. So wurde im Kolonkarzinom eine zentrale Bedeutung der NFAT-Familie in der EGFR-induzierten Expression der Cyclooxygenase 2 (Cox2) beschrieben (Wang et al., 2012). Im Pankreaskarzinom aktiviert NFATc1 im Komplex mit dem inflammatorischen Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3 die Transkription von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und fördert so die Tumorprogression (Baumgart et al., 2014). Eine deutliche NFATc1-Expressions- und Aktivitätszunahme in metaplastischen Arealen unserer *in vitro* und *in vivo* Modelle sowie im Pankreasgewebe chronischer Pankreatitispatienten implizierte eine gleichsam bedeutende Funktion von NFATc1 in der frühen inflammationsassoziierten Pankreaskarzinogenese.

Um die Relevanz der NFATc1-Aktivierung für die EGFR-abhängige Induktion der azinär-duktales Transdifferenzierung zu untersuchen, wurde die Aktivierung von NFATc1 *in vitro* und *in vivo* sowohl pharmakologisch (CsA) als auch genetisch (NFATc1-spezifische

Diskussion

siRNA sowie pankreasspezifische transgene NFATc1-Inaktivierung in $Kras^{G12D};NFATc1^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen) inhibiert (Aliprantis et al., 2008). Nach Verlust von NFATc1 zeigte sich eine deutliche Abnahme der EGFR-vermittelten duktaalen Transdifferenzierung von Azinuszell-explantaten. Auch *in vivo* führte die pharmakologische oder genetische Depletion von NFATc1 im $Kras^{G12D}$ -Tiermodell zu einer signifikanten Abnahme der entzündungsvermittelten Metaplasie, was durch eine Expressionsabnahme duktaaler Proteine und eine Zunahme der Amylase-Expression begleitet wurde.

Zusammenfassend charakterisieren diese Daten NFATc1 als essentiellen Mediator der entzündungstriggeren azinär-duktaalen Transdifferenzierung und zeigen, dass die onkogenen Funktionen des Transkriptionsfaktors nicht auf die Tumorprogression beschränkt sind, sondern bereits in der Pankreaskarzinominitiation von entscheidender Relevanz sind.

5.2 Die EGFR-Aktivierung in der ADM des Pankreas induziert die Komplexbildung von NFATc1 und c-Jun

NFAT bindet nur mit sehr schwacher Affinität an die DNA. Für eine effektive Kontrolle der Transkription interagiert NFAT mit Partnerproteinen, die die Auswahl der regulierten Gensignatur und die Funktion der NFAT-abhängigen Transkription bestimmen (Baumgart et al., 2011). Die Mitglieder der Aktivator Proteine-1 (AP-1)-Familie gelten als wichtige NFAT-Interaktionspartner in verschiedenen zellulären Systemen und physiologischen sowie pathologischen Prozessen, u.a. im Rahmen der transkriptionellen Induktion von Interleukin-2 während der T-Zell-Aktivierung (Macián et al., 2000; Rao et al., 1997; Walters, Drullinger et al., 2013). Bei der Familie von AP-1-Proteinen handelt es sich um *basic region-leucine zipper proteins* (bZIP), die von einer Vielzahl von Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder bakteriellen und viralen Infekten aktiviert werden und eine Fülle von zellulären Prozessen inklusive Proliferation, Zelltod, Survival und Differenzierung beeinflussen. Ein zentrales Mitglied der AP-1-Familie ist c-Jun, das als Homo- oder Heterodimer proliferations- und wachstumsregulierende Zielgene kontrolliert (Ryseck & Bravo, 1991). So weisen murine Embryo-Fibroblasten von c-Jun-depletierten Embryonen im Vergleich zu Zellen mit einer Wildtyp-Expression von c-Jun eine geringere Proliferationsgeschwindigkeit

Diskussion

auf (Schreiber et al., 1999). Werden c-Jun-defiziente Fibroblasten UV-Strahlung ausgesetzt, verbleiben diese im Vergleich zu Wildtyp-Zellen aufgrund fehlender Proliferationswiederaufnahme länger im Zellzyklusarrest. Im Gegensatz dazu umgeht die konstitutive Aktivierung von c-Jun in UV-Strahlungs exponierten Fibroblasten den Zellzyklusarrest und bedingt eine dauerhafte Proliferation der Zellen (Shaulian et al., 2000). Somit gilt c-Jun als wichtiger Promotor der Karzinogenese und Progression verschiedener maligner Erkrankungen (Galardi et al., 2011; Joseph, 2001; Zoumpourlis et al., 2000).

C-Jun und andere AP-1-Proteine bilden Komplexe an regulatorischen Elementen im Promotor oder Enhancer von Zielgenen (Ryseck & Bravo, 1991). Die höchste Bindungsaffinität der AP-1-Proteine besteht zu den DNA-Konsensus-Sequenzen TGA(C/G)TCA und TGACGTCA (Curran & Fianza, 1988; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher et al., 1988). Allerdings lässt sich diese Sequenz nicht in allen AP-1-Zielgenen finden. Deshalb wird vermutet, dass die AP-1-Proteine mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagieren (Chinenov & Kerppola, 2001; McBride & Nemer, 1998). Eine biochemische Interaktion und funktionelle Kooperation auch im Kontext onkogener Prozesse ist für NFATc1/AP-1-Komplexe bereits gezeigt worden (Wu et al., 2010). Ein erster Anhalt für eine NFATc1/AP-1-Komplexbildung im Pankreaskarzinom konnte durch genomweite ChIP-Seq-Analysen in primären Pankreaskarzinomzellen gewonnen werden, die bei 47,3% der Gene mit einer Anreicherung von NFATc1 mindestens eine AP-1-Bindungsstelle identifizierten (Chen et al., 2015). *Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool* (GREAT)-Analysen (Chen et al., 2015) offenbarten eine signifikante Korrelation der genomweiten NFATc1-Bindungen im Bereich von AP-1-Bindungsstellen mit der Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege und wiesen somit auf eine enge funktionale Kooperation von NFATc1 und AP-1-Proteinen in der Vermittlung EGFR-induzierter Effekte hin. Übereinstimmend mit diesen Daten konnten wir eine EGFR-abhängige Zunahme der AP-1-Aktivierung, insbesondere von c-Jun, beobachten. Weiterhin offenbarten Immunpräzipitationen im Pankreasgewebe Caerulein behandelter Mäuse sowie in Azinuszellen eine robuste biochemische EGFR-abhängige NFATc1;c-Jun-Interaktion. Weitere Evidenz für die funktionelle Kooperation von NFATc1 und c-Jun in der EGFR-abhängigen Transdifferenzierung wurde mithilfe eines Luciferase-Reporter-Assays in primären

Diskussion

Pankreaskarzinomzellen von $Kras^{G12D};p53^{wt/\Delta};Egfr^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen gewonnen. Hier zeigte sich eine NFATc1-abhängige Transaktivierung des NFATc1-responsiven Interleukin-2-Promotors ausschließlich nach Re-Expression von konstitutiv aktivem EGFR. Darüber hinaus führte die Co-Transfektion von c-Jun zu einer zusätzlichen Transaktivierungszunahme des NFATc1-responsiven Promotors, was auf eine c-Jun abhängige Zunahme der transkriptionellen Aktivität von NFATc1 schließen lässt. Im Gegensatz dazu konnte nach Überexpression des AP-1-Proteins c-Fos keine Steigerung der Promotoraktivität nachgewiesen werden. Dies ist kongruent mit Daten anderer Gruppen, die synergistische Effekte von NFAT und AP-1-Proteinen auf die Transaktivierung des Interleukin-2-Promotors ausschließlich bei NFATc1 und c-Jun beschrieben (Nguyen et al., 2010). Weitere Reporter- und ChIP-Analysen suggerierten sogar einen negativen Effekt von c-Fos auf die transkriptionelle Aktivität von NFATc1, sodass postuliert werden kann, dass c-Fos mit der Komplexbildung zwischen NFATc1 und c-Jun interferiert und somit die NFATc1-Bindung an Zielpromotoren behindert (Chen et al., 2015). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Untersuchungen, in denen Fos als Bestandteil eines Heterodimers in Verbindung mit Jun die Transaktivität des IL-2-Promotors steigern konnte (Chen et al., 1998). Die Zell-Kontext abhängigen Funktionen von c-Fos und dessen Einfluss auf die Transkription von Zielgenen sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.3 Die Interaktion zwischen NFATc1 und c-Jun vermittelt die Sox9-Expression während der EGFR-Signalweg-induzierten ADM

Transdifferenzierungsprozesse im Pankreas setzen die Aktivierung duktaler Signaturen voraus. So beobachtet man in transdifferenzierenden Pankreasepithelzellen hohe Expressionslevel von Transkriptionsfaktoren, die als duktale bzw. epitheliale Marker gelten, wie z.B. Sox9 oder das Strukturprotein Cytokeratin 19 (Bouwens, 1998; Morris et al., 2010; Zhu et al., 2007). Sox9 gehört zu der Genfamilie der *SRY-related box* (SOX)-Gene, die eine DNA-Bindungsdomäne in Form einer HMG-Box besitzen, und beim Menschen für Transkriptionsfaktoren im fetalen Gehirn, Leber, Hoden und im Skelett kodieren (Wagner et al., 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sox9 auch im intrahepatischen und intrapankreatischen Gangsystem exprimiert wird und wichtig für die Entwicklung des hepatopankreatischen Gangsystems ist (Antoniou et al., 2009; Furuyama et al., 2011; Seymour et al., 2007). Neben der Funktion als

Diskussion

Strukturprotein für die Aufrechterhaltung der jeweiligen spezifischen Funktionalität verschiedener Gewebe nimmt die Sox9-Expression auch eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese verschiedener epithelialer Tumoren ein. Es konnte gezeigt werden, dass Sox9 als Konsequenz einer Aktivierung des EGFR-Signalwegs, verursacht durch eine chronische Schädigung, Einfluss auf die Zellmigration und -invasivität innerhalb der Karzinogenese des Blasenkarzinoms nimmt (Ling et al., 2011). In der Pathogenese des Glioblastoms führt die EGFR-Mutation zu einer Sox9-vermittelten elevierten Expression des Onkogens c-Myc (Liu et al., 2015). Zudem konnte die transkriptionelle Aktivierung von Sox9 kürzlich als essentieller Mechanismus der ADM-Entstehung und PanIN-Progression identifiziert werden (Fukuda & Chiba, 2013; Kopp et al., 2012). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte in Analogie zu NFATc1 in unseren *in vitro* und *in vivo* Modellen in transdifferenzierenden Zellen eine EGFR-abhängige Expressionssteigerung von Sox9 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene beobachtet werden. Detaillierte Sequenzanalysen des Sox9-Gens führten zur Identifizierung von 3 benachbarten NFATc1;c-Jun-Bindungsstellen (Chen et al., 2015). In sequenziellen CHIP-Analysen bestätigte sich die Bindung von c-Jun und NFATc1 am Sox9-Promotor, wobei die Bindung beider Transkriptionsfaktoren durch eine Aktivierung des EGFR-Signalweges deutlich gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu verminderte der Verlust von NFATc1 oder c-Jun die Bindung des jeweiligen Partnerproteins am Sox9-Promotor und reduzierte dessen Aktivität, dargestellt durch die Rekrutierung von RNA-Polymerase II und Anreicherung von H3K4me3 als Chromatinmarker der Promotoraktivierung. Übereinstimmend mit unseren DNA-Bindungsstudien zeigte sich eine signifikante Abnahme der Sox9-Expression nach genetischer oder pharmakologischer Inhibition von NFATc1 *in vitro* und *in vivo*. Somit identifizieren diese Ergebnisse Sox9 als transkriptionelles NFATc1-Targetgen innerhalb der azinär-duktaalen Transdifferenzierung während der Pankreaskarzinominitiation.

5.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit können wir NFATc1 als Schlüsselmediator der EGFR-abhängigen azinär-duktaalen Metaplasie in der Initiation des Pankreaskarzinoms identifizieren. Wir bestätigen die Bedeutung der Inflammation für die Transdifferenzierung von azinären zu duktaalen Zellen bei vorliegender konstitutiver Aktivierung von Kras und zeigen, dass die Aktivierung von NFATc1 und dessen Komplexbildung mit c-Jun mit

Diskussion

nachgeschalteter transkriptioneller Aktivierung von Sox9 eine Voraussetzung für die EGFR-vermittelte azinär-duktales Transdifferenzierung darstellt (Abb. 18). Der hier beschriebene Mechanismus verdeutlicht, dass die inflammationsbasierte Aktivierung von EGFR in der transkriptionellen Aktivierung duktaler Signaturen mündet und charakterisiert NFATc1 als herausragenden transkriptionellen Mediator der inflammationsgetriggerten Pankreaskarzinogenese. In Ergänzung zu weiteren Untersuchungen unserer Gruppe (Baumgart et al., 2012, 2014; Singh et al., 2015) beschreibt diese Arbeit erstmalig die Bedeutung NFATc1-abhängiger transkriptioneller Regulation während der inflammationsabhängigen Pankreaskarzinomentstehung und betont somit die translationale Relevanz der NFATc1-Inhibition. Pharmakologische Strategien, die eine Azinuszell spezifische Inhibition von NFATc1 ermöglichen, könnten daher einen signifikanten Beitrag für die Prävention inflammationsbasierter Pankreaskarzinome darstellen.

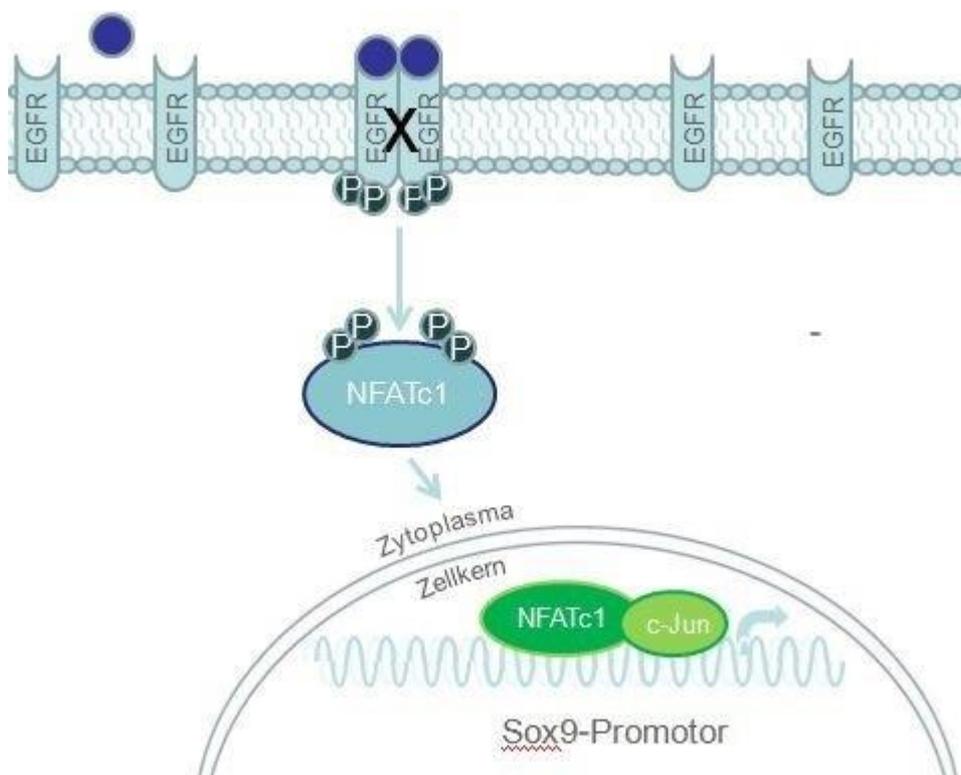


Abbildung 18: Schematische Darstellung des EGFR-induzierten Signalwegs. Durch Bindung eines Liganden (z.B. EGF) wird der EGF-Rezeptor aktiviert und es folgt die Dephosphorylierung von NFATc1. Nach nukleärer Translokation interagiert NFATc1 mit c-Jun und induziert durch direkte Promotorbindung die transkriptionelle Aktivierung von Sox9. Damit wird die azinär duktales Metaplasie eingeleitet.

6 Literaturverzeichnis

- Aliprantis A.O., Ueki, Y., Sulyanto, R., Park, A., Sigrist, K.S., Sharma, S.M.,... Glimcher, L.H. (2008). NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest*, (118), 3775–89
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4), 549–554
- Antoniou, A., Raynaud, P., Cordi, S., Zong, Y., Tronche, F., Stanger, B. Z., ... Lemaigre, F. P. (2009). Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology*, 136(7), 2325–33
- Ardito, C. M., Grüner, B. M., Takeuchi, K. K., Lubeseder-Martellato, C., Teichmann, N., Mazur, P. K., ... Siveke, J. T. (2012). EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 22(3), 304–317
- Baumgart, S., Chen, N.-M., Siveke, J. T., König, A., Zhang, J.-S., Singh, S. K., ... Ellenrieder, V. (2014). Inflammation-induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. *Cancer Discovery*, 4(6), 688–701
- Baumgart, S., Ellenrieder, V., & Fernandez-Zapico, M. E. (2011). Oncogenic transcription factors: cornerstones of inflammation-linked pancreatic carcinogenesis. *Gut*, 310–316
- Baumgart, S., Glesel, E., Singh, G., Chen, N., Reutlinger, K., Zhang, J., ... Ellenrieder, V. (2012). Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 142(2), 388–398
- Beals, C. R. (1997). Nuclear Export of NF-ATc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3. *Science*, 275(5308), 1930–33
- Bouwens, L. (1998). Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *The Journal*

of Pathology, 184(3), 234–239

Buchholz, M., & Ellenrieder, V. (2007). An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle*, 6(1), 16–19

Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., ... Ellenrieder, V. (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO Journal*, 25(15), 3714–24

Caladas, C., & Kern, S. E. (1995). K-ras Mutation and Pancreatic Adenocarcinoma. *International Journal of Pancreatology*, 18(15), 1–6

Chen, L., Glover, J. N. M., Hogan, P. G., Rao, A. & Harrison, S. C. (1998). Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA, 392(6671), 42–48

Chen, N.-M., Singh, G., Koenig, A., Liou, G.-Y., Storz, P., Zhang, J.-S., ... Hessmann, E. (2015). NFATC1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar-Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. *Gastroenterology*, 148(5), 1024-34

Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 20(19), 2438–52

Choo, M. K., Yeo, H. & Zayzafoon, M. (2009). NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone*, 45(3), 579–589

Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J.-C., Galbán, S., Galbán, C. J., ... Pasca di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 639–653

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn Y., ...Dicreux, M. (2011) FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N*

Literaturverzeichnis

Engl J Med, (364), 1817-25

Coughlin, S. S., Calle, E. E., Patel, A. V. & Thun, M. J. (n.d.). Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes & Control, 11(10), 915–923*

Crabtree, G. R. (1999). Generic Signals and Specific Outcomes. *Cell, 96(5), 611–614*

Curran, T. & Franza, B. R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell, 55(3), 395–397*

Davis, B. P., Hammer, R. E., Messing, A. & MacDonald, R. J. (1992). Selective expression of trypsin fusion genes in acinar cells of the pancreas and stomach of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry, 267(36), 26070–77.*

De La O, J.-P., Emerson, L. L., Goodman, J. L., Froebe, S. C., Illum, B. E., Curtis, A. B. & Murtaugh, L. C. (2008). Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(48), 18907–12*

Douville, E. & Downward, J. (1997). EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene, 15(4), 373–383*

Fjallskog, M.-L. H., Lejonklou, M. H., Oberg, K. E., Eriksson, B. K. & Janson, E. T. (2003). Expression of Molecular Targets for Tyrosine Kinase Receptor Antagonists in Malignant Endocrine Pancreatic Tumors. *Clin. Cancer Res., 9(4), 1469–73*

Friedlander, S. Y. G., Chu, G. C., Snyder, E. L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., ... Jacks, T. (2009). Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras. *Cancer Cell, 16(5), 379–389*

Fukuda, A. & Chiba, T. (2013). Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming is critical for pancreatic intraepithelial neoplasia formation. *Gastroenterology, 145(4), 904–907*

Fürstenau, U., Schwaninger, M., Blume, R., Kennerknecht, I., & Knepel, W. (1997). Characterization of a novel protein kinase C response element in the glucagon gene. *Molecular and Cellular Biology, 17(9), 1805–16.*

Literaturverzeichnis

- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., ... Uemoto, S. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics*, *43*(1), 34–41
- Galardi, S., Mercatelli, N., Farace, M. G. & Ciafrè, S. A. (2011). NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Research*, *39*(9), 3892–902
- Geiger, B. & Ayalon, O. (1992). Benjamin Geiger and Oran Ayalon. *Signal Transduction*.
- Graef, I. a., Chen, F., Chen, L., Kuo, A. & Crabtree, G. R. (2001). Signals transduced by Ca²⁺/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, *105*, 863–875
- Grippo, P. J., Nowlin, P. S., Demeure, M. J., Longnecker, D. S. & Sandgren, E. P. (2003). Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Research*, *63*(9), 2016–19
- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernández-Porras, I., Cañamero, M., ... Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, *19*(6), 728–739
- Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., ... Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell*, *11*(3), 291–302
- Habbe, N., Shi, G., Meguid, R. A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., ... Maitra, A. (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(48), 18913–18
- Hamilton, J. A. & Anderson, G. P. (2004). GM-CSF Biology. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, *22*(4), 225–231
- Hernández, G. L., Volpert, O. V., Iñiguez, M. A., Lorenzo, E., Martínez-Martínez, S.,

Literaturverzeichnis

- Grau, R., ... Redondo, J. M. (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(5), 607–620
- Hingorani, S. R., Ili, E. F. P., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., ... Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse, 4(December), 437–450.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., ... Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437–450
- Hingorani, S. R., & Tuveson, D. a. (2003). Ras redux: Rethinking how and where Ras acts. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13, 6–13
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., ... Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469–483
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin. *And NFAT. Genes Dev.*, 17(617), 2205–32
- Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990). Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Mol. Cell. Biol.*, 10(8), 4035–44
- Horsley, V. & Pavlath, G. K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The Journal of Cell Biology*, 156(5), 771–774
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer 1, 6(August), 2969–72.
- Hruban, R. H., Maitra, A. & Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1, 306–316.

Literaturverzeichnis

- Hunter, T. & Cooper, J. A. (1981). Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell*, 24(3), 741–752.
- Imamura, R., Masuda, E. S., Naito, Y., Imai, S., Fujino, T., Takano, T., ... Arai, N. (1998). Carboxyl-terminal 15-amino acid sequence of NFATx1 is possibly created by tissue-specific splicing and is essential for transactivation activity in T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 3455–63.
- Jain, J., Burgeon, E., Badalian, T. M., Hogan, P. G., & Rao, A. (1995). A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 4138-45
- Jauliac, S., López-Rodríguez, C., Shaw, L. M., Brown, L. F., Rao, A. & Toker, A. (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology*, 4(7), 540–544
- Jensen, J. N., Cameron, E., Garay, M. V. R., Starkey, T. W., Gianani, R., & Jensen, J. (2005). Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology*, 128(3), 728–741
- Joseph, P. (2001). Cadmium-Induced Cell Transformation and Tumorigenesis Are Associated with Transcriptional Activation of c-fos, c-jun, and c-myc Proto-Oncogenes: Role of Cellular Calcium and Reactive Oxygen Species. *Toxicological Sciences*, 61(2), 295–303
- Kaatsch, P., Spix, C. & Hentschel, S. (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*
- Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 13367–70
- Kobrin, M. S., Funatomi, H., Friess, H., Buchler, M. W., Stathis, P. & Korc, M. (1994). Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202(3), 1705–09
- König, A., Linhart, T., Schlengemann, K., Reutlinger, K., Wegele, J., Adler, G., ...

Literaturverzeichnis

- Ellenrieder, V. (2010). NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology*, *138*(3), 1189–99
- König, A., Fernandez-Zapico, M. E. & Ellenrieder, V. (2010). Primers on molecular pathways-the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. *Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et Al.]*, *10*(4), 416–422
- Kopp, J. L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.-F., Dubois, C. L., Morris, J. P., ... Sander, M. (2012). Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, *22*(6), 737–750
- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M. & Beger, H. G. (1992). Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *The Journal of Clinical Investigation*, *90*(4), 1352–60
- Korc, M., Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, M. S., Buchler, M. & Beger, H. G. (1994). Chronic pancreatitis is associated with increased concentrations of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and phospholipase C gamma. *Gut*, *35*(10), 1468–73
- Larsson, S. C., Permert, J., Håkansson, N., Näslund, I., Bergkvist, L. & Wolk, A. (2005). Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *British Journal of Cancer*, *93*(11), 1310–15
- Lawrence, M. C., Bhatt, H. S. & Easom, R. a. (2014). NFAT Regulates Insulin Gene Promoter Activity in Response to Synergistic Pathways Induced by Glucose and Glucagon-Like Peptide-1, *51*(3), 691-698
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., ... Yarden, Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie

Literaturverzeichnis

- suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular Cell*, 4(6), 1029–40
- Ling, S., Chang, X., Schultz, L., Lee, T. K., Chaux, A., Marchionni, L., ... Berman, D. M. (2011). An EGFR-ERK-SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer. *Cancer Research*, 71(11), 3812–21
- Liu, F., Hon, G. C., Villa, G. R., Turner, K. M., Ikegami, S., Yang, H., ... Mischel, P. S. (2015). EGFR Mutation Promotes Glioblastoma through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling. *Molecular Cell*, 60(2), 307–318
- Lopez-Rodríguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A. S. & Rao, a. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(June), 7214–19
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews. Immunology*, 5(June), 472–484
- Macián, F., García-Rodríguez, C. & Rao, A. (2000). Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *The EMBO Journal*, 19(17), 4783–95
- Maitra, A. & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic cancer. *Annual Review of Pathology*, 3, 157–188
- Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., Hruban, R. (2005). Precursors to Invasive Pancreatic Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 12(2), 81-91
- Malka, D. (2002). Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51(6), 849–852
- Mallen-St Clair, J., Soydaner-Azeloglu, R., Lee, K. E., Taylor, L., Livanos, A., Pylayeva-Gupta, Y., ... Bar-Sagi, D. (2012). EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes & Development*, 26(5), 439–444
- Mancini, M. & Toker, A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer*, 9, 810–820

Literaturverzeichnis

- Mascia, F., Cataisson, C., Lee, T.-C., Threadgill, D., Mariani, V., Amerio, P., ... Pastore, S. (2010). EGFR regulates the expression of keratinocyte-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in vitro and in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*, *130*(3), 682–693
- McBride, K., & Nemer, M. (1998). The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(9), 5073–81
- Means, A. L., Meszoely, I. M., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Rustgi, A. K., Coffey, R. J., ... Leach, S. D. (2005). Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development (Cambridge, England)*, *132*(16), 3767–76
- Means, A. L., Ray, K. C., Singh, A. B., Washington, M. K., Whitehead, R. H., Harris, R. C., ... Leach, S. D. (2003). Overexpression of Heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology*, *124*(4), 1020–1036
- Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E. R. & McKeon, F. (1994). The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell*, *79*(3), 437–447
- Monick, M. M., Cameron, K., Staber, J., Powers, L. S., Yarovinsky, T. O., Koland, J. G. & Hunninghake, G. W. (2005). Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(3), 2147–58
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(15), 1960–66
- Morris, J. P., Cano, D. A., Sekine, S., Wang, S. C. & Hebrok, M. (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor

- lesions in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 508–520
- Nakabeppu, Y., Ryder, K., & Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell*, 55(5), 907–915
- Navas, C., Hernández-Porras, I., Schuhmacher, A. J., Sibilía, M., Guerra, C. & Barbacid, M. (2012). EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22(3), 318–330
- Neal, J. W. & Clipstone, N. a. (2003). A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17246–54
- Nguyen, T. N., Kim, L. J., Walters, R. D., Drullinger, L. F., Lively, T. N., Kugel, J. F. & Goodrich, J. A. (2010). The C-terminal region of human NFATc2 binds cJun to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Molecular Immunology*, 47(14), 2314–22
- Nilsen, T. I. L. & Vatten, L. J. (n.d.). A prospective study of lifestyle factors and the risk of pancreatic cancer in Nord-Trøndelag, Norway. *Cancer Causes & Control*, 11(7), 645–652
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366(1), 2–16
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology*, 1, 1-17
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., ... Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell*, 6, 539–550
- Parsa, I., Longnecker, D. S., Scarpelli, D. G., Pour, P., Reddy, J. K. & Lefkowitz, M. (1985). Ductal Metaplasia of Human Exocrine Pancreas and Its Association with

Carcinoma. *Cancer Res.*, 45(3), 1285–90

Poplin, E., Feng, Y., Berlin, J., Rothenberg, M. L., Hochster, H., Mitchell, E., ... Benson, A. B. (2009). Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(23), 3778–85

Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P. & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 24(3), 349–358

Ramaekers, F., van Niekerk, C., Poels, L., Schaafsma, E., Huijsmans, A., Robben, H., ... Vooijs, P. (1990). Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *The American Journal of Pathology*, 136(3), 641–655

Ranger, M., Gerstenfeld, L. C., Wang, J., Kon, T., Bae, H., Gravalles, E. M., ... Glimcher, L. H. (2000). The nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor NFATp (NFATc2) is a repressor of chondrogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(1), 9–22

Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology*, 15, 707–747

Rauscher, F. J., Voulalas, P. J., Franza, B. R. & Curran, T. (1988). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development*, 2(12B), 1687–99

Ravid, T., Heidinger, J. M., Gee, P., Khan, E. M. & Goldkorn, T. (2004). c-Cbl-mediated ubiquitylation is required for epidermal growth factor receptor exit from the early endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 37153–62

Robbs, B. K., Cruz, A. L. S., Werneck, M. B. F., Mognol, G. P. & Viola, J. P. B. (2008). Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7168–81

Literaturverzeichnis

- Rozakis-Adcock, M., van der Geer, P., Mbamalu, G. & Pawson, T. (1995). MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene*, *11*(7), 1417–26
- Ryseck, R. P. & Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene*, *6*(4), 533–542
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, *19*(3), 183–232
- Santini, M. P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L. & Dotto, G. P. (2001). Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(17), 9575–80
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., ... Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes & Development*, *13*(5), 607–619
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., ... Yekebas, E. (2013). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, *51*, 1395–40
- Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., ... Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(6), 1865–70
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F. & Karin, M. (2000). The Mammalian UV Response. *Cell*, *103*(6), 897–908
- Shaw, J. P., Utz, P. J., Durand, D. B., Toole, J. J., Emmel, E. A. & Crabtree, G. R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science (New York, N.Y.)*, *241*(11), 202–205

Literaturverzeichnis

- Simmons, D. L. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387–437
- Singh, G., Singh, S. K., König, A., Reutlinger, K., Nye, M. D., Adhikary, T., ... Ellenrieder, V. (2010). Sequential activation of NFAT and c-Myc transcription factors mediates the TGF- β switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27241–50
- Singh, S. K., Chen, N.-M., Hessmann, E., Siveke, J., Lahmann, M., Singh, G., ... Ellenrieder, V. (2015). Antithetical NFATc1-Sox2 and p53-miR200 signaling networks govern pancreatic cancer cell plasticity. *The EMBO Journal*, 34(4), 517–530
- Spalding, D. & Williamson, R. C. N. (2007). Pancreatic cancer. *Medicine*, 35(6), 325–329
- Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis) (2013)
- Talamini, G., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E., ... Cavallini, G. (1999). Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(5), 1253–60
- Tobita, K., Kijima, H., Dowaki, S., Kashiwagi, H., Ohtani, Y., Oida, Y., ... Makuuchi, H. (2003). Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *International Journal of Molecular Medicine*, 11(3), 305–309
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61(2), 203–212
- Ushiro, H. & Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 255(18), 8363–65
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791), 607–620
- Von Hoff, D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., ... Renschler,

Literaturverzeichnis

- M.F. (2013) Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med*, (369), 1691-03
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., ... Scherer, G. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, 79(6), 1111–20
- Walters, R. D., Drullinger, L. F., Kugel, J. F. & Goodrich, J. A. (2013). NFATc2 recruits cJun homodimers to an NFAT site to synergistically activate interleukin-2 transcription. *Molecular Immunology*, 56(1-2), 48–56
- Wang, J.-Y., Chen, B.-K., Wang, Y.-S., Tsai, Y.-T., Chen, W.-C., Chang, W.-C., ... Chang, W.-C. (2012). Involvement of store-operated calcium signaling in EGF-mediated COX-2 gene activation in cancer cells. *Cellular Signalling*, 24(1), 162–169
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6), 637–643
- Willemer, S., Elsässer, H.-P. & Adler, G. (1992). Hormone-Induced Pancreatitis. *European Surgical Research*, 24(1), 29–39
- Wu, A., Ericson, K., Chao, W., & Low, W. C. (2010). NFAT and AP1 are essential for the expression of a glioblastoma multiforme related IL-13Ra2 transcript. *Cellular Oncology*, 32, 313–329
- Yadav, D. & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252–61
- Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M. S., Buchler, M., Beger, H. G. & Korc, M. (1993). Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Research*, 13(3), 565–569
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37 Suppl 4, S3–S8
- Yarden, Y. & Kelman, Z. (1991). Transmembrane signalling receptors for cytokines and

- growth factors. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(4), 582–589
- Yarden, Y. & Schlessinger, J. (1987). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry*, 26(5), 1434–42
- Yi, T., Tan, K., Cho, S. G., Wang, Y., Luo, J., Zhang, W., ... Liu, M. (2010). Regulation of embryonic kidney branching morphogenesis and glomerular development by KISS1 receptor (Gpr54) through NFAT2- and Sp1-mediated Bmp7 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17811–20
- Yiu, G. K. & Toker, A. (2006). NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12210–17
- Yokouchi, M. (1999). Ligand-induced Ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING Finger and Ubch7. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), 31707–12
- Zhu, H., Guariglia, S., Li, W., Brancho, D., Wang, Z. V., Scherer, P. E., & Chow, C.-W. (2014). Role of Extracellular Signal-regulated Kinase 5 in Adipocyte Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6311–22
- Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C. M., Hruban, R. H. & Konieczny, S. F. (2007). Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology*, 171(1), 263–273
- Zhu, Z., Kleeff, J., Friess, H., Wang, L., Zimmermann, A., Yarden, Y., ... Korc, M. (2000). Epiregulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(3), 1019–24
- Zoumpourlis, V., Papassava, P., Linardopoulos, S., Gillespie, D., Balmain, A., & Pintzas, A. (2000). High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene*, 19(35), 4011–21

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progressionsmodell gesunder Anzinuszellen zu Zellen eines invasiven duktales Pankreaskarzinoms.....	4
Abbildung 2: Darstellung der NFAT-Struktur	6
Abbildung 3: Aktivierung von NFATc2 durch den Calcium-Calcineurin-Signalweg.	8
Abbildung 4: Aktivierung und Degradation des EGF-Rezeptors	11
Abbildung 5: Beispiel eines Agarosegels nach einer Kras-PCR	41
Abbildung 6: H&E und immunhistochemische Färbung im humanen Pankreasgewebe	56
Abbildung 7: Expressionsanalysen in Pankreata von Kras ^{G12D} -Mäusen	58
Abbildung 8: Induktion von ADM und NFATc1 in vitro durch EGF-Behandlung	59
Abbildung 9: Einfluss der pharmakologischen oder genetischen Depletion auf die ADM-Entstehung in vitro	61
Abbildung 10: Einfluss von NFATc1 auf die inflammationsgetriggerte ADM in vivo.....	63
Abbildung 11: AP-1-Bindungsstellen innerhalb von NFATc1-Bindungsstellen.....	64
Abbildung 12: Darstellung der Proteinexpression der AP-1-Proteine p-c-Jun, p-c-Fos, sowie von p-Erk und NFATc1.....	65
Abbildung 13: H&E Färbung und immunhistochemische Färbungen in Pankreasgewebe von Kras ^{G12D} -Mäusen.....	66
Abbildung 14: Interaktion von NFATc1 und c-Jun.	68
Abbildung 15: Sox9-Expression in Abhängigkeit von EGF- bzw. Caerulein-Behandlung und vorliegender bzw. gehemmter NFATc1-Expression	69
Abbildung 16: Bindung von NFATc1, c-Jun, Polymerase II, H3K4m3 am Sox9-Promotor +370bp.....	71
Abbildung 17: H&E und immunhistochemische Färbung im Pankreasgewebe von Kras ^{G12D} - und Kras ^{G12D} ;NFATc1 ^{Δ/Δ} -Mäusen.....	72
Abbildung 18: Schematische Darstellung des EGFR-induzierten Signalwegs.....	79

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte.....	16
Tabelle 2: Materialien	18
Tabelle 3: Chemikalien	22
Tabelle 4: Kits	22
Tabelle 5: Enzyme	23
Tabelle 6: Trenngellösung	24
Tabelle 7: Zelllinien	32
Tabelle 8: Vektoren	34
Tabelle 9: siRNA Konstrukte.....	34
Tabelle 10: Medikamente	35
Tabelle 11: PCR Zyklen	39
Tabelle 12: Genotypisierungs-PCR-Primer	40
Tabelle 13: Medikamente für <i>in vivo</i> Experimente.....	41
Tabelle 14: qRT-PCR-Primer	45
Tabelle 15: Western Blot Primärantikörper	48
Tabelle 16: Western Blot Sekundärantikörper.....	48
Tabelle 17: IP Antikörper.....	49
Tabelle 18: ChIP-Antikörper	52
Tabelle 19: ChIP-Primer.....	52
Tabelle 20: Immunhistologie Primärantikörper	54
Tabelle 21: Immunhistologie Sekundärantikörper	54

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ADM	Azinär-duktales Metaplasie
AP- 1	Activator protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BRCA	Breast Cancer
BSA	Bovine serum albumingene
bZIP	basic region-leucine zipper proteins
c- myc	Myc (myelocytomatosis viral oncogene homologue)

Anhang

Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurim
C-cbl	Casitas B-lineage lymphoma
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation-Sequencing
CK	Casein-Kinase
Cox	Cyclooxygenase
CRAC	Ca ²⁺ release activated channels
Cre	cAMP response element
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
DYRK	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
Et al.	Et alii
FCS	Fetal calf serum
FK506	Tacrolimus
for	Forward-5'-triphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GREAT	Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3

Anhang

HDAC	Histonedecacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonsäure
HER-2/ neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
H&E	Hämatoxylin und Eosin Färbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
InsP3	Inositol-1, 4, 5- trisphosphat
IP	Immunpräzipitation
IPMN	Intraduktal Papillär Muzinöse Neoplasie
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
Kras	Kirsten rat sarcoma (viral oncogene homolog)
LoxP	locus of x-cover P1
LSL	lox stop lox
M	Mol
MAPK	Mitogenactivated protein-kinase
MCN	Mucinous cystic Neoplasia
Mmp	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NFAT	Nuclear factor of activitated T-cells
NFκB	Nuclear factor kappa B
NHR	NFAT homologe Region
P	phospho
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasias
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDX	Pancreatic und Duodenum homebox 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

Anhang

PKA	Proteinkinase A
PLC γ	Phospholipase γ
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma Protein
Rcan1	Regulator of Calcineurin 1
Rev	Reverse
RHR	Rel homologe Region
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RSAT	Regulatory sequence analysis tools
RTC	Rat tail collagen type I
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	Small- interferenz RNA
SOS	Son of sevenless
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SPR	Serin-Prolin-reiche Region
SSR	Serin-Serin-reiche Region
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
STIM1	stromal interaction molecule 1
T- Zellen	Thymus-abhängige Zellen/ Lymphozyten
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered Saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Transforming growth factor beta
TIE	TGF- β inhibitory element
Tris	Tris-hydroxyl- methyl- aminomethan
Triton X 100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan- monolaurat
wt	Wildtyp

Anhang

7.4 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Albert, Arabin, Baarlink, Bals, Barth, Bartsch, Baumann, Brehm, Burchert, Cetin, Christiansen, Cordes, Czubayko, Daut, Del Rey, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Ellenrieder, Enzensberger, Fendrich, Fensterer, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Gerdes, Giebing, Görg, Gress, Hadji, Hertl, Hielscher, Hoffmann, Hofmann, Horn Hoyer, Jacke, Jackisch, Jackowski-Dohrmann, Jeck, Jerrentrup, Kaminskj, Kann, Kerzel, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirn, Klose, Koczulla, Koolman, Köhler, Kösters, Kraft, Krieg, Kroll, Kuhnen, Kühnert, Leonhardt, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lübbe, Lüehrs, Maisner, Mandrek, Martin, Meier, Meißner, Metz, Metzelder, Michl, Mittag, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumann, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schütz, Seifart, Seitz, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiewe, Stiller, Sure, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Weske, Westerman, Wrocklage, Wulf, Zemlin

Meine akademischen Lehrer an der Universitätsklinik Dresden waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Abraham, Aschoff, Bauer, Beissert, Boashie, Kuske, Laske, Lotz, Maschke, Meier, Meisterfeld, Munzer, Günther, Proske, Rauschenberg, Spornraft-Ragaller, Triebe, Wöhlke

Meine akademischen Lehrer am Sana Klinikum Lichtenberg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Bunse, Dizer, Federlein, Gellert, Grogro, Hollerbuhl, Kleist, Klink, Lewin, Machemehl, Rückbeil, Seidelsohn

Meine akademischen Lehrer an der Universitätsklinik Leipzig waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Backhaus, Bräunlich Deterding, Krupnik, Münch, Papra, Pönisch, Ramdohr, Schulze, Seyfarth

7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Volker Ellenrieder für die Ideengebung und exzellente Betreuung bedanken. Er verstand zu jeder Zeit, Motivation und Begeisterung für Forschung und Klinik auf dem höchsten Level zu halten. Seine soziale und fachliche Kompetenz ermöglichte wissenschaftliches Arbeiten auf höchstem Niveau bei stets warmer und herzlicher Atmosphäre.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gress bedanken, der mir die Möglichkeit gab, die Doktorarbeit in der Gastroenterologie zu schreiben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern der praktischen Arbeit Herrn Dr. Naiming Chen und Frau Dr. Garima Singh. Sie hatten stets offene Ohren und viel Geduld. Mit ihnen war jedes Problem zu lösen und die Zusammenarbeit, mit viel Coffeetime, brachte mich persönlich und fachlich weiter.

Frau Dr. Elisabeth Heßmann, der Betreuerin des theoretischen Anteils, danke ich laut und herzlich für das Nichtreißen ihres Geduldsfadens und ihre aufopferungsvolle Zusammenarbeit. Sie war und ist die arbeitsamste und gleichzeitig gute Seele der Arbeitsgruppe. Vielen Dank Lissy.

Vielen Dank auch an Frau Kristina Reutlinger, die uns Doktoranden ebenfalls mit viel Geduld in die Struktur und Ordnung des Labors einführte und stets Worte zur Aufmunterung oder Verbesserungsvorschläge parat hatte.

Frau Dr. Sandra Baumgart und Herrn Dr. Shiv Singh komplettierten die Laborgemeinschaft und gaben mit Anregungen und Vorschlägen Hilfestellung in aussichtslos erscheinenden Situationen. Danke.

Außerdem danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Buchholz und Michl, vor allem Herrn Dr. Benjamin Kühnemuth und Frau Leonie Mühlberg für die gute Zusammenarbeit und unterhaltsame Pausengestaltung.

Marius Brunner, Moritz Dyck und Fabian Becker, ohne euch hätte ich die Arbeit in der Arbeitsgruppe vermutlich gar nicht begonnen. Danke dafür und für die Versüßung der schönen, aber manchmal auch strapaziösen Zeit. Mit euch wurde das Labor fast wie zu einem Zuhause. Wenn das Labor voll war, waren am Glaskopf sowieso die Lichter aus.

Den Korrekturlesern Anke Gapsch, André Matthei, Simone Regul und Heike Seyboth gilt für die Vervollständigung der Arbeit ebenfalls ein großes und herzliches

Anhang

Dankeschön. Ich hoffe die Krimis und Thriller standen nicht zu lange in der Warteschleife.

Das Beste kommt zum Schluss. Der größte Dank gilt meiner Familie. Sie unterstützten mich zu jeder Zeit, gaben mir Wurzeln und Flügel. André Matthei, danke für deine Photoshopkünste und andere technische Hilfe, aber vor allem für die Zeit, die wir zusammen verbrachten. Auf die folgende.

