

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Einfluss der Histondeacetylase 2 (HDAC2) auf die Pathogenese des
Pankreaskarzinoms

Petra Fritsche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.
2. Priv.-Doz. Dr. G. Schneider

Die Dissertation wurde am 28.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.10.2011 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	1
1.2. Das Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms	1
1.3. Mausmodelle des Pankreaskarzinoms	3
1.4. Epigenetische Regulationsmechanismen durch Histon-Modifikationen	3
1.5. Histondeacetylasen (HDACs).....	5
1.6. HDAC2.....	7
1.7. HDAC-Inhibitoren (HDACi)	8
1.8. Apoptose.....	10
1.9. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material	13
2.1. Geräte	13
2.2. Verbrauchsmaterialien	14
2.3. Allgemeine Reagenzien und Enzyme	15
2.4. Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur	17
2.5. Reagenzien für die Histochemie.....	18
2.6. Kommerziell erhältliche Kits	18
2.7. Puffer	18
2.8. Antikörper.....	20
2.9. Oligonukleotide	21
2.10. Plasmide und Bakterienstämme.....	22
3. Methoden	23
3.1. Zellbiologische Methoden.....	23
3.1.1. Kultivierung und Aussaat der Zellen	23
3.1.2. siRNA-Transfektionen.....	23
3.1.3. Behandlung der Zellen mit Valproinsäure (VPA).....	24
3.1.4. Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika	24
3.1.5. Poly(I:C)-Transfektionen.....	24
3.1.6. Hoechst-Färbung.....	25
3.1.7. MTT-Assay	25
3.1.8. Bromodeoxyuridin (BrdU)-Assay	26

3.1.9.	Caspase-Assay	26
3.1.10.	Luciferase-Assay	26
3.2.	Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1.	Ganzzellextrakte.....	27
3.2.2.	Western Blot.....	28
3.2.3.	Agarosegelelektrophorese.....	29
3.2.4.	RNA-Extraktion.....	29
3.2.5.	cDNA-Synthese durch reverse Transkription.....	30
3.2.6.	Quantitative Echtzeit-PCR	30
3.2.7.	Affymetrix-Microarray.....	33
3.2.8.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	34
3.3.	<i>In vivo</i> -Methoden.....	37
3.3.1.	Haltung der Mäuse	37
3.3.2.	Mauslinien	37
3.3.3.	Genotypisierung	39
3.3.4.	Töten der Tiere und Organentnahme.....	40
3.3.5.	Zellisolation aus Pankreastumoren.....	40
3.3.6.	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	41
3.3.7.	HE-Färbung.....	41
3.3.8.	Immunhistochemie (IHC).....	41
3.4.	Statistische Analysen	42
4.	Ergebnisse	43
4.1.	HDAC2 wird im duktalem Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert.....	43
4.2.	HDAC2 wird für Viabilität und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nicht benötigt.....	44
4.3.	Die HDAC2-Herunterregulation sensitiviert gegenüber Etoposid.....	45
4.4.	VPA sensitiviert gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose.....	48
4.5.	HDAC2-Herunterregulation und -Inhibition führen nicht zu einer Sensitivierung gegenüber Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin	50
4.6.	HDAC2 kontrolliert die NOXA-Genexpression.....	53
4.7.	NOXA ist essentiell für die HDAC2-abhängige Sensitivierung gegenüber Etoposid.....	56
4.8.	Interferonantwort-Gene werden nach HDAC2-Depletion hochreguliert.....	58
4.9.	HDAC2 wird im murinen Pankreaskarzinom stark exprimiert.....	60
4.10.	Überleben und Phänotypen HDAC2-defizienter Tumormäuse.....	61
5.	Diskussion.....	62
5.1.	Essentielle Rolle von HDAC2 im Pankreaskarzinom.....	62

5.2.	Kompensation des HDAC2-Verlusts.....	62
5.3.	Synergie von HDAC2-Depletion und Etoposid-Behandlung – eine nicht-redundante Funktion von HDAC2.....	63
5.4.	Molekularer Wirkmechanismus der VPA/Etoposid-Kombination in Pankreaskarzinomzellen	64
5.5.	Induktion von Interferonantwortgenen durch HDAC2-Depletion	67
5.6.	Bedeutung von HDAC2 im murinen Pankreaskarzinommodell	68
5.7.	Mögliche Therapieansätze	68
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	72
8.	Eigene Veröffentlichungen.....	80
9.	Danksagung	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.	2
Abbildung 1-2: Deacetylierung und Acetylierung der Histon-Arme durch HDACs und HATs.	5
Abbildung 1-3: HDACs der Klassen I, II und IV.	6
Abbildung 1-4: Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg.	11
Abbildung 4-1: HDAC2 wird im duktales Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert.	43
Abbildung 4-2: HDAC2 wird für die Viabilität und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nicht benötigt.	45
Abbildung 4-3: HDAC2-Herunterregulation sensitiviert gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose.	46
Abbildung 4-4: In HDAC2-depletierten Zellen führt die Behandlung mit Etoposid zu einer gesteigerten Aktivierung von Caspasen.	47
Abbildung 4-5: Die HDAC2-Herunterregulation in DanG- und BxPc3-Zellen führt zu einer Sensitivierung gegenüber Etoposid.	47
Abbildung 4-6: Die Herunterregulation von HDAC1 hat keinen sensitivierenden Effekt gegenüber Etoposid.	48
Abbildung 4-7: Die VPA-Behandlung von Pankreaskarzinomzellen beeinträchtigt nicht Proliferation oder Viabilität.	49
Abbildung 4-8: Die gleichzeitige Behandlung mit VPA und Etoposid führt zur erhöhten Induktion von Apoptose in Pankreaskarzinomzellen.	50
Abbildung 4-9: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber Gemcitabin-vermittelter Apoptose.	51
Abbildung 4-10: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber 5-FU-vermittelter Apoptose.	52
Abbildung 4-11: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber Oxaliplatin-vermittelter Apoptose.	53
Abbildung 4-12: HDAC2 reprimiert das <i>NOXA</i> -Gen.	55
Abbildung 4-13: siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC1 führt zu einem marginalen Anstieg der <i>NOXA</i> -mRNA-Expression.	56
Abbildung 4-14: <i>NOXA</i> ist essentiell für die Sensitivierung gegenüber Etoposid nach HDAC2-Depletion.	57
Abbildung 4-15: <i>DDX58</i> und <i>IFIH1</i> werden nach HDAC2-Inhibition hochreguliert.	59
Abbildung 4-16: Poly(I:C) führt in Verbindung mit VPA nicht zu einer verminderten Viabilität.	60

Abbildung 4-17: Relative Expression von HDACs der Klassen I, II und IV in 53 murinen Pankreaskarzinomzelllinien.	60
Abbildung 4-18: HDAC2-Expression in den verschiedenen Stadien der Pankreastumorigenese.....	61
Abbildung 5-1: Vereinfachtes Schema des Wirkmechanismus der HDACi/Etoposid-Kombination in Pankreaskarzinomzellen.	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Laborgeräte.	13
Tabelle 2-2: Übersicht über Verbrauchsmaterialien.	14
Tabelle 2-3: Allgemeine Reagenzien und Enzyme.	15
Tabelle 2-4: Verwendete Pankreaskarzinomzelllinien.	17
Tabelle 2-5: Verwendete Reagenzien für die Zellkultur.	17
Tabelle 2-6: Medienzusammensetzung für die Zellkultur.	17
Tabelle 2-7: Reagenzien für die Histochemie.	18
Tabelle 2-8: Verwendete Kits.	18
Tabelle 2-9: Verwendete Puffer.	18
Tabelle 2-10: Verwendete Antikörper.	20
Tabelle 2-11: Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.	21
Tabelle 2-12: Verwendete Plasmide.	22
Tabelle 3-1: Ansätze zur Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit siRNA.	24
Tabelle 3-2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.	28
Tabelle 3-3: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.	30
Tabelle 3-4: PCR-Ansatz und -Bedingungen zur Generierung des PCR-Produkts zur Verwendung im <i>TOPO TA Cloning</i> Kit.	31
Tabelle 3-5: PCR-Ansätze und –Bedingungen der <i>Screen-PCRs</i> zur Überprüfung der erhaltenen Kolonien durch das <i>TOPO TA Cloning</i> Kit.	32
Tabelle 3-6: Ansatz und Bedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR.	33
Tabelle 3-7: Genotypisierungs-PCRs – Ansätze, Bedingungen und erwartete Bandengrößen.	39
Tabelle 4-1: Regulation von Apoptose beteiligten Genen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2.	53
Tabelle 4-2: Nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 werden Gene für die Interferonantwort stark exprimiert.	58
Tabelle 4-3: Überleben und Phänotypen der HDAC2-defizienten Tumormäuse im <i>Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i> -Modell.	61

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
µl	Mikroliter	DNase	Desoxyribonuklease
µm	Mikrometer	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
µM	Mikromolar	DPC4	<i>SMAD family member 4 (SMAD4)</i>
5-FU	5-Fluorouracil	dsRNA	Doppelsträngige RNA
APAF1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>	E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ATP	Adenosintriphosphat	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
BAK	<i>BCL2-antagonist/killer 1 (BAK1)</i>	et al.	Et alii (lateinisch „und andere“)
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>	FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>
BCL-2	<i>B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/lymphoma 2</i>	FAS	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
BCL-X _L	<i>Apoptosis Regulator BCL-X, lange Isoform</i>	FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
BH3	<i>BCL-2-homology 3</i>	g	Gramm
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
BIM	<i>BCL-2 interacting mediator of cell death</i>	h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
bp	Basenpaare	HAT	Histon-Acetyltransferase
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>	HDAC	Histondeacetylase
BrdU	Bromodeoxyuridin	HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
BSA	Bovines Serumalbumin	HE	Hämatoxylin-Eosin
Caspase	Cysteinyl-Aspartat spezifische Protease	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)	IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
cm	Zentimeter	IFIH1	<i>Interferon induced with helicase C domain 1</i>
c-Myc	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
cRNA	Komplementäre RNA (<i>complementary RNA</i>)	IHC	Immunhistochemie
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser	IP	Immunpräzipitation
DDX58	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58</i>	kb	Kilobasenpaare
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>		
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>		
DMSO	Dimethylsulfoxid		

kD	Kilodalton		(polymerase chain reaction)
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	pDNA	Plasmid-DNA
LB	<i>Lysogeny broth/Luria-Bertani</i>	Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
LSL	LoxP-Stop-loxP	Ptf1a	<i>Pancreas specific transcription factor, 1a</i>
M	Molar	PVDF	Polyvinylidenfluorid
mA	Milliampere	RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor</i>
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
MEF	Murine embryonische Fibroblasten	RNase	Ribonuklease
mg	Milligramm	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
min	Minute(n)	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ml	Milliliter	RT	Reverse Transkription
mm	Millimeter	SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamat
mM	Millimolar	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>	sec	Sekunde(n) (<i>second</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
Mut	Mutiertes Allel	siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
n	Anzahl	SIRT	Sirtuin
NF-κB	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1)</i>	STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
ng	Nanogramm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
nm	Nanometer	TK	Transkriptionsfaktor
nM	Nanomolar	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
NOXA	Lateinisch „Schaden“, auch <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)</i>	TP53	<i>Tumor protein p53</i>
OAS2	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2</i>	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing factor</i>
OASL	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase-like</i>	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
OD	Optische Dichte	tRNA	Transfer-RNA
p.a.	<i>Per analysis</i>	Trp53	<i>Transformation related protein 53</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	TsA	Trichostatin A
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie	Tva	<i>Tumor virus A</i>
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase	U	<i>Unit</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)	UV	Ultraviolett
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	V	Volt
		v/v	<i>Volume per volume</i>
		VPA	Valproinsäure (<i>valproic acid</i>)
		w/v	<i>Weight per volume</i>
		WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist zwar nicht eine der häufigsten, aber eine der tödlichsten Krebserkrankungen des Menschen. Nur etwa zehn von 10^5 Menschen erkranken am Pankreaskarzinom, so dass im Jahr 2010 in den Vereinigten Staaten ca. 43.000 Neupatienten registriert wurden, was einem Anteil von lediglich 3% an der Gesamtzahl aller neuen Krebserkrankungen entsprach (Jemal et al, 2010). Dagegen war das Pankreaskarzinom mit etwa 37.000 Todesfällen bei Männern und Frauen an vierter Stelle der Krebs-assoziierten Todesfälle (Jemal et al, 2010). Trotz großer Anstrengungen, die molekularen Grundlagen des Pankreaskarzinoms zu verstehen und effektive Therapien zu etablieren, sterben fast alle Patienten an der Krankheit, so dass die 5-Jahres-Überlebensrate noch immer bei maximal 6% liegt (Jemal et al, 2010). Die Gründe für die schlechte Prognose liegen u.a. in der Schwierigkeit der frühen Diagnose dieser Tumorerkrankung und letztendlich im Versagen konservativer Therapien (Schneider et al, 2005).

Die operative Entfernung des Tumors ist für die Patienten nach wie vor die einzige Heilungschance, kann jedoch aufgrund einer späten Diagnose nur bei etwa 10% aller Patienten durchgeführt werden (Hamacher et al, 2008; Schneider et al, 2005). Nach Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 25%, nach zehn Jahren sinkt die Überlebensrate jedoch wieder auf unter 10% (Richter et al, 2003).

Chemotherapeutisch werden die Patienten in den meisten Fällen mit Gemcitabin, einem Nukleosid-Analogon, behandelt, das jedoch nur eine limitierte Wirksamkeit aufweist (Schneider et al, 2005). Andere Chemotherapeutika, wie 5-Fluorouracil (5-FU), Capecitabin, Taxane oder Topoisomerase-Inhibitoren wie CPT11 sowie verschiedene Kombinationschemotherapien zeigten bisher in Phase III-Studien noch keinen durchschlagenden Erfolg in der Therapie des Pankreaskarzinoms (Schneider et al, 2005). Lediglich der Einsatz von Erlotinib, einem Inhibitor des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptors, konnte das Überleben eines geringen Anteils der Patienten verlängern (Moore et al, 2007). Es ist daher dringend erforderlich, die molekularen Vorgänge der Tumorigenese genauer zu verstehen und neue Zielstrukturen für die Therapie zu identifizieren.

1.2. Das Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms

In den letzten Jahren wurde ein morphologisches Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms beschrieben (Hruban et al, 2001; Hruban et al, 2000). Hierbei kommt es im Pankreas zunächst zur Entstehung präneoplastischer Vorläuferläsionen, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs), die in die Stufen 1A, 1B, 2 und 3 eingeteilt werden (Abbildung 1-1). Die Stufe PanIN-1A ist gekennzeichnet durch flache

epitheliale Läsionen aus langgestreckten duktalem Zellen mit basal orientierten Nuklei und vermehrtem supranuklearem Mucin. Weisen diese Läsionen eine papilläre Morphologie auf, werden sie PanIN-1B zugeordnet. In PanIN-2 sind strukturelle Veränderungen festzustellen, wie der Verlust der Polarität oder die Ansammlung und die Vergrößerung der Nuklei. PanIN-3-Läsionen zeichnen sich durch luminale Nekrosen sowie durch das Abschnüren von Gruppen epithelialer Zellen in das Lumen aus. Während PanIN-3-Läsionen in <5% nichtkanzeröser Pankreata vorhanden sind, sind sie bei 30-50% der Pankreata mit invasivem Pankreaskarzinom zu beobachten (Schneider et al, 2005). Sie werden daher als Vorstufen des invasivem Pankreaskarzinoms angesehen (Schneider et al, 2005).

Dieses morphologische Progressionsmodell korreliert mit der Anhäufung genetischer Veränderungen. In den frühen Läsionen PanIN-1A, -1B und -2 wurden die Überexpression von *HER-2/neu* sowie Mutationen des Onkogens *KRAS* und des Tumorsuppressorgens *p16/INK4a* nachgewiesen, während in den späten PanIN-3-Läsionen Mutationen der Tumorsuppressorgene *TP53*, *DPC4* und *BRCA2* beobachtet wurden (Hruban et al, 2000; Schneider et al, 2005). *KRAS*, aktiviert durch eine Mutation im Kodon 12, initiiert dabei die Karzinogenese, was in einem genetisch definierten Mausmodell demonstriert wurde, in dem onkogenes *Kras*^{G12D} pankreasspezifisch exprimiert wurde (Hingorani et al, 2003).

Durch Sequenzierungen humaner Pankreaskarzinome fand man weitere Mutationen in zwölf grundlegenden Signalwegen, die in 67 bis 100% der Pankreaskarzinome verändert waren (Jones et al, 2008). Trotzdem sind die relevanten Signalwege im Pankreaskarzinom, die von onkogenem *KRAS* und anderen mutierten Genen beeinflusst werden, bisher unzureichend untersucht (Schneider et al, 2011).

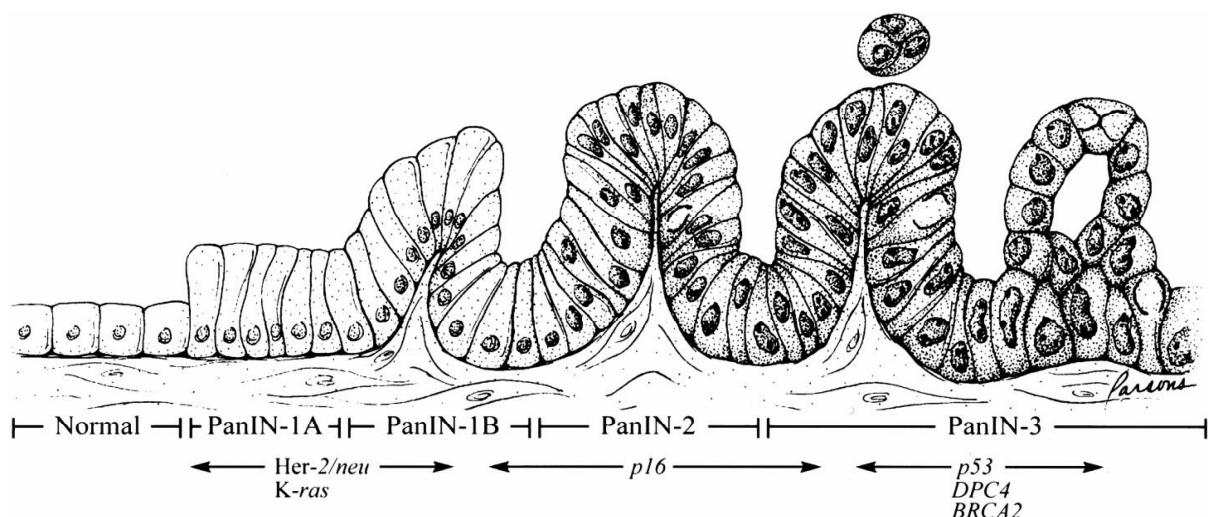


Abbildung 1-1: Progressionsmodell des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas.

Normales Dukt-Epithel wird zu invasivem Karzinomen (von links nach rechts) durch präneoplastische Vorläuferstufen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien, PanINs). Die Überexpression von *HER-2/neu* und Punktmutationen im *KRAS*-Gen geschehen früh, die Inaktivierung von *p16/INK4a* intermediär und die Inaktivierung von *TP53*, *DPC4* und *BRCA2* relativ spät (Hruban et al, 2000).

1.3. Mausmodelle des Pankreaskarzinoms

Seit einigen Jahren sind Mausmodelle etabliert, die prä-maligne PanINs sowie metastasierende duktale Pankreaskarzinome entwickeln, die sich histopathologisch nicht von humanen PanINs bzw. Pankreaskarzinomen unterscheiden (Hingorani et al, 2003). In diesen Mäusen wurde onkogenes *Kras*, welches eine Mutation in Kodon 12 des ersten kodierenden Exons aufweist, mittels homologer Rekombination (*Knock-in*) eingeführt, so dass es im Protein zu einem Austausch von Glycin zu Asparaginsäure kommt (Hingorani et al, 2003). Um eine gewebespezifische Expression zu ermöglichen, wurde im ersten Intron ein transkriptionelles Stop-Element eingefügt, das von loxP-Sequenzen flankiert ist (loxP-Stop-loxP; LSL). Das Stop-Element verhindert die Expression von *Kras*^{G12D}, so dass die Mäuse heterozygot für das Wildtypallel sind. Werden diese *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse mit einer *Knock-in* Mauslinie gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter dem *Ptf1a/p48*-Promotor spezifisch in pankreatischen Vorläuferzellen und im exokrinen und endokrinen Pankreas exprimiert (*Ptf1a/p48*^{Cre/+}), wird in den Nachkommen das Stop-Element in den entsprechenden Zellen des Pankreas deletiert und KRAS^{G12D} somit aktiv.

Bei diesen *Ptf1a/p48*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D}-Mäusen lassen sich ab einem Alter von zwei Wochen präkanzeröse PanIN-Läsionen beobachten, die mit fortschreitendem Alter einen immer höheren Prozentsatz des Pankreasgewebes einnehmen (Hingorani et al, 2003). Ab acht Monaten entwickeln sich außerdem invasive duktale Pankreaskarzinome. Die mediane Überlebenszeit beträgt 16 Monate (unveröffentlichte Daten PD Dr. Dieter Saur) (Seidler et al, 2008).

Eine Beschleunigung der Tumorigenese kann durch Kreuzen der *Ptf1a/p48*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D}-Mäuse mit *LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen erreicht werden. Diese *Knock-in*-Mauslinie exprimiert analog zu *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen nach Deletion des Stop-Elements ein p53-Protein mit einer *missense*-Mutation (Arginin zu Histidin) in Kodon 172, wie sie in vergleichbarer Weise bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom in Kodon 175 auftritt (Olive et al, 2004). Das mutierte p53-Protein hat dominant negative Eigenschaften (de Vries et al, 2002; Liu et al, 2000) und akzeleriert die Tumorigenese erheblich: *Ptf1a/p48*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D}; *LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse entwickeln bereits ab einem Alter von zehn Wochen mit einer Penetranz von 100% invasive, metastasierende duktale Pankreaskarzinome. Das mediane Überleben beträgt 120 Tage (unveröffentlichte Daten PD Dr. Dieter Saur).

1.4. Epigenetische Regulationsmechanismen durch Histon-Modifikationen

Trotz der Erkenntnisse über die morphologische und genetische Progression des Pankreaskarzinoms und der vorhandenen Mausmodelle sind viele Bereiche der Karzinogenese noch nicht ausreichend verstanden. Besonders der Beitrag epigenetischer

Veränderungen wurde bisher nur am Rande untersucht, obwohl bekannt ist, dass diese Regulationsmechanismen entscheidend an der Karzinogenese von Tumoren beteiligt sein können (Lund & van Lohuizen, 2004). Ein grundlegender epigenetischer Mechanismus ist dabei die Öffnung des kondensierten, transkriptionell inaktiven Chromatins (Heterochromatin) zu einer dekondensierten, transkriptionell aktiven Chromatinstruktur (Euchromatin), was als *Chromatin remodeling* bezeichnet wird (Bolden et al, 2006).

Jedes Nukleosom besteht aus etwa 146 bp DNA, die um ein Histon-Oktamer (je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4) gewunden sind (Schneider et al, 2011). Histone sind basische Proteine mit einer globulären Domäne und hervorstehenden, positiv geladenen Histon-Armen (Jenuwein & Allis, 2001). Dadurch besteht eine hohe Affinität zur negativ geladenen DNA, die deshalb nur ineffizient abgelesen werden kann (Mai et al, 2005; Schneider et al, 2011). Beim *Chromatin remodeling* sind post-translationale Modifizierungen der aminoterminalen Histon-Arme wie Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen und Sumoylierungen beteiligt, die in ihrer Gesamtheit als sogenannter *Histon-Code* bezeichnet werden (Jenuwein & Allis, 2001; Nightingale et al, 2006). Obwohl der gesamte Histon-Code bei der Öffnung des Chromatins und der Initiierung der Transkription beteiligt ist, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem Prozess der (De)acetylierung, der im Pankreaskarzinom eine große Rolle zu spielen scheint. Die Acetylierung der Histon-Arme erfolgt nach Stimulation eines aktivierenden Transkriptionsfaktors durch die Rekrutierung von an Co-Aktivator Komplexe gebundene Histon-Acetyltransferasen (HATs), die die ϵ -Aminogruppe der Lysine der Histon-Arme acetylieren und damit die positiven Ladungen neutralisieren (Abbildung 1-2B) (Mai et al, 2005; Schneider et al, 2011). In einem ATP-abhängigen Prozess können die Histone dann von *Chromatin remodeling*-Komplexen verschoben und die DNA für weitere regulatorische Proteine zugänglich gemacht werden (Roth et al, 2001; Schneider et al, 2011).

Die Deacetylierung des Chromatins erfolgt als gegenläufiger Prozess nach Aktivierung eines reprimierenden Transkriptionsfaktors. Dieser rekrutiert einen Co-Repressorkomplex, an den eine Histondeacetylase (HDAC) gebunden ist (Abbildung 1-2A) (Schneider et al, 2011; Thiagalingam et al, 2003). Die HDAC deacetyliert daraufhin die Histon-Arme, wodurch die positiven Ladungen und die geschlossene Chromatinkonformation wiederhergestellt werden, so dass die Transkription reprimiert wird (Mai et al, 2005).

HATs und HDACs können jedoch auch Nicht-Histon-Proteine wie Transkriptionsfaktoren (de)acetylieren (Bolden et al, 2006). Es ist bekannt, dass z.B. Transkriptionsfaktoren wie p53, c-Myc, E2F1, STAT1, STAT3 und NF- κ B durch direkte Acetylierung und Deacetylierung reguliert werden können (Bolden et al, 2006; Buchwald et al, 2009). Dies bedeutet, dass die durch (De)acetylierung herbeigeführten Veränderungen im Transkriptom sowohl durch die Veränderung der Transkriptionsfaktoraktivität als auch durch Änderung der

Chromatinstruktur hervorgerufen werden können (Schneider et al, 2010). So wurde z.B. schon gezeigt, dass HDACs auch als transkriptionelle Aktivatoren wirken können (Krämer, 2009; Zupkovitz et al, 2006).

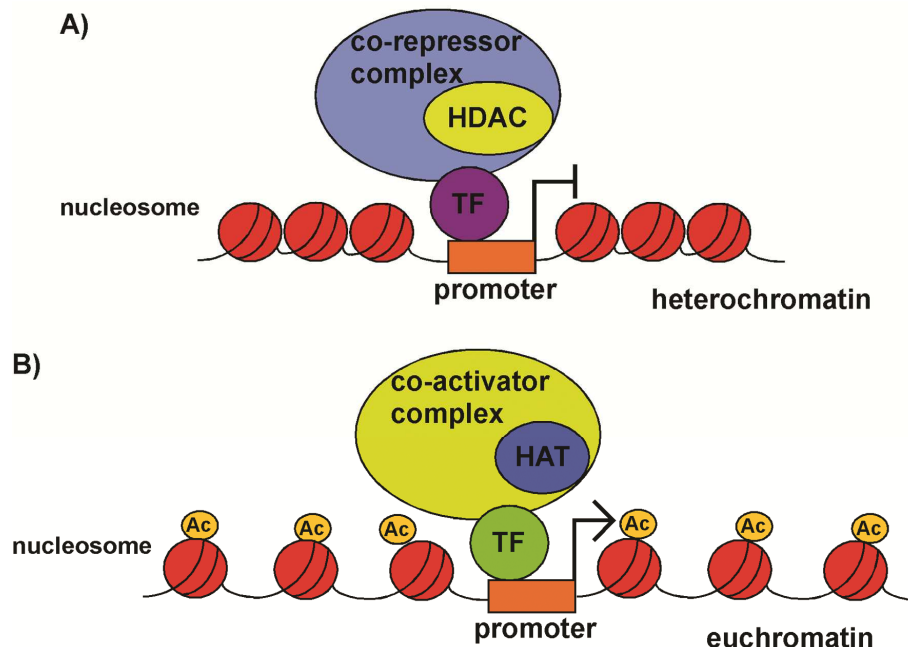


Abbildung 1-2: Deacetylierung und Acetylierung der Histon-Arme durch HDACs und HATs.

A) Reprimierende Transkriptionsfaktoren (TF) rekrutieren Co-Repressorkomplexe mit HDACs zu genspezifischen Promotoren, was zur Deacetylierung der ϵ -Aminogruppen der Lysine an den N-terminalen Histon-Armen führt. Dieser Prozess führt zu einer geschlossenen Chromatinkonformation (Heterochromatin) und zur Suppression der Genexpression. **B)** Aktivierende Transkriptionsfaktoren (TF) rekrutieren einen Co-Aktivator-Komplex mit HATs zu genspezifischen Promotoren, was zur Acetylierung (Ac) der Histon-Arme führt. Die Chromatinstruktur öffnet sich (Euchromatin) und ermöglicht die Transkription (Schneider et al, 2011).

1.5. Histondeacetylasen (HDACs)

Ausgehend von ihren Sequenzhomologien zu Enzymen von *Saccharomyces cerevisiae*, ihrer zellulären Lokalisation und ihrer enzymatischen Aktivität werden 18 humane Histondeacetylasen (HDACs) unterschieden, die in vier Enzymklassen eingeteilt werden (Abbildung 1-3) (Bolden et al, 2006; Haberland et al, 2009; Thiagalingam et al, 2003; Yang & Seto, 2008). Zu den Enzymen der Klasse I gehören HDAC 1, 2, 3 und 8, die homolog zu Rpd3 in *Saccharomyces cerevisiae* sind, ubiquitär exprimiert werden und nuklear lokalisiert sind. Klasse II-Enzyme (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 und 10) sind homolog zu Hda1 und pendeln zwischen Zytoplasma und Nukleus. HDACs der Klasse IIb sind HDAC 6 und 10, die eine zweite Deacetylase-Domäne enthalten. HDAC11 weist im katalytischen Zentrum sowohl zu Klasse I- als auch zu Klasse II-Enzymen Homologien auf und wird deshalb in Klasse IV eingeteilt. Im Gegensatz zur Zink-abhängigen Katalyse der Klassen I, II und IV benutzen die Klasse III-Deacetylasen (die Sirtuine SIRT 1-7) NAD^+ als Co-Faktor und werden nicht von

HDAC-Inhibitoren (HDACi) gehemmt. Sie weisen Homologien zu Sir2 in *Saccharomyces cerevisiae* auf.

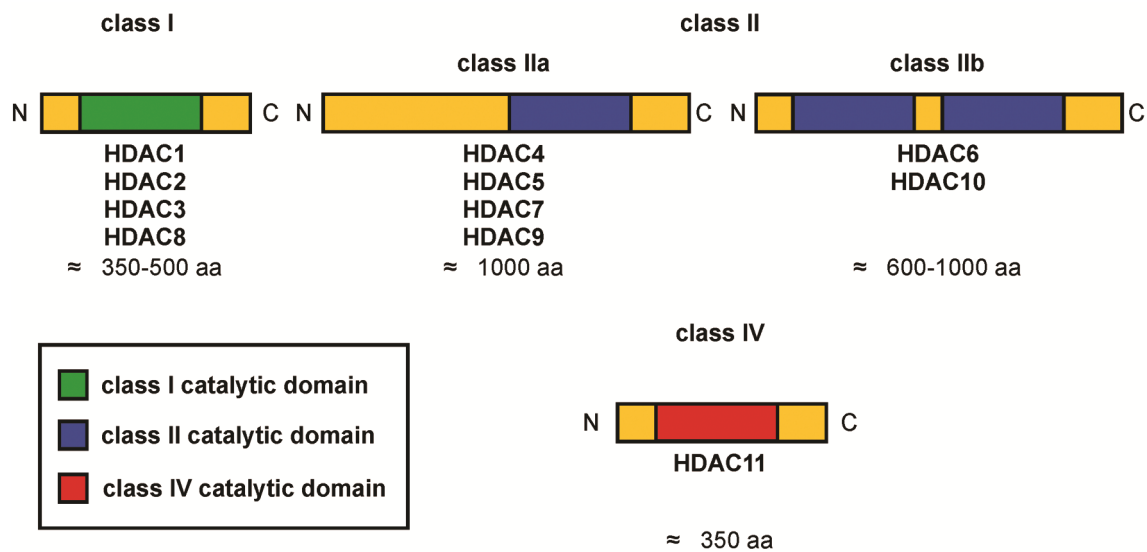


Abbildung 1-3: HDACs der Klassen I, II und IV.

HDACs werden nach ihrer Sequenzhomologie zu Enzymen von *Saccharomyces cerevisiae*, ihrer zellulären Lokalisation und ihrer enzymatischen Aktivität in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Die NAD⁺-abhängigen Sirtuin-Deacetylasen SIRT1-7 der Klasse III sind nicht abgebildet. aa = *amino acids* (Schneider et al, 2011).

Bereits beschrieben wurde die gesteigerte Expression verschiedener HDACs in unterschiedlichen Tumoren. So wurde eine Überexpression von HDAC1 im Prostata-, Magen-, Kolon- und Mammakarzinom gezeigt, während HDAC2 im Kolon-, Magen-, Zervix- und Speiseröhrenkarzinom stark exprimiert wird (Bolden et al, 2006; Langer et al, 2010; Weichert, 2009). HDAC3 wird in kolorektalen Tumoren überexprimiert (Bolden et al, 2006).

Im Pankreaskarzinom werden HDAC1, 2 und 3 stark exprimiert, die Co-Expression von HDAC1 und HIF1 α korreliert mit einer schlechten Prognose (Miyake et al, 2008; Schneider et al, 2011). In 54 humanen Pankreaskarzinomen wurde eine hohe HDAC1-Expression signifikant mit der Proliferationsaktivität, dem Grad der Tumordifferenzierung und einem kürzeren Patientenüberleben korreliert (Wang et al, 2009). In einer Studie mit 81 Patienten konnte eine hohe Expression von HDAC1, HDAC2 und HDAC3 nachgewiesen werden (Lehmann et al, 2009), eine erhöhte Expression von HDAC7 konnte bei einer Studie mit elf gut bis mäßig differenzierten Pankreaskarzinomen demonstriert werden (Ouaisi et al, 2008b).

HDACs tragen zu Krebsinitiation und -progression durch die Regulation des Zellzyklus, der epithelialen Differenzierung, der Angiogenese, der Metastasierung und der Apoptose bei (Glozak & Seto, 2007; Minucci & Pelicci, 2006). Daher sind HDAC-Inhibitoren (HDACi; siehe 1.7) vielversprechende Krebstherapeutika und werden in verschiedenen klinischen Studien untersucht.

1.6. HDAC2

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von HDAC2 auf die Pathogenese des Pankreaskarzinoms, da HDAC2 in gastrointestinalen Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So wird es im Magen-, Kolon- und Pankreaskarzinom überexprimiert (Bolden et al, 2006; Lehmann et al, 2009), und bei Magen- und Kolonkarzinom ohne Mikrosatelliteninstabilität konnte eine hohe HDAC2-Expression sogar mit einem kürzeren Patientenüberleben korreliert werden (Huang et al, 2005; Weichert et al, 2008a; Weichert et al, 2008b; Zhu et al, 2004b). In der Kolonkarzinogenese konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Tumorsuppressors APC (*adenomatous polyposis coli*) zu einer erhöhten Expression von HDAC2 führt, welches vor allem anti-apoptotische Funktionen übernimmt (Zhu et al, 2004a; Zhu et al, 2004b). Dazu passend, war im *APC^{min}*-Mausmodell der Kolonkarzinogenese in HDAC2-defizienten *APC^{min}*-Mäusen eine verminderte Anzahl intestinaler Tumoren festzustellen (Zimmermann et al, 2007).

HDAC2 gehört zu den HDACs der Klasse I und weist eine 86%ige Aminosäuresequenz-Identität zu HDAC1 auf (Jurkin et al, 2011). HDAC1 und HDAC2 sind oft zusammen in Multiprotein-Co-Repressorkomplexen assoziiert, wie dem Sin3- und NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylation*)-Repressorkomplex (Yang & Seto, 2008). Auch eine Assoziation mit SNAIL wurde gezeigt, der SNAIL/HDAC1/HDAC2-Komplex reprimierte die E-Cadherin-Expression in metastasierenden Pankreaskarzinomzellen und trug so zur Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) bei (von Burstin et al, 2009).

Wiederholt konnte demonstriert werden, dass HDAC1 und HDAC2 redundante Funktionen haben und die Deletion einer der beiden HDACs kompensiert werden kann. So führte die Deletion von HDAC1 oder HDAC2 allein in murinen embryonischen Fibroblasten (MEFs), Herzzellen, Glia-Zellen, Neuronen oder B-Zellen von Mäusen zu keinem veränderten Phänotyp (Jurkin et al, 2011; Montgomery et al, 2007; Montgomery et al, 2009; Wilting et al, 2010; Yamaguchi et al, 2010; Ye et al, 2009). Wurden HDAC1 und HDAC2 jedoch zusammen deletiert, zeigten sich im Mausmodell und isolierten MEFs dramatische Effekte in Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen (Jurkin et al, 2011; Montgomery et al, 2007; Montgomery et al, 2009; Wilting et al, 2010).

Trotz dieser redundanten Funktionen und der Kooperation in Repressorkomplexen sind auch erste Isoenzym-spezifische Funktionen von HDAC1 und HDAC2 bekannt (Jurkin et al, 2011). So scheint HDAC1 essentiell für die embryonale Entwicklung zu sein, da die globale Deletion von HDAC1 in Mäusen zu pränataler Lethalität führte (Lagger et al, 2002; Montgomery et al, 2007). Mäuse mit globaler Deletion der Exons 2-4 von HDAC2 dagegen kamen nach Mendel'schen Frequenzen zur Welt, verstarben allerdings nach 24 Stunden aufgrund kardialer Fehlbildungen (Montgomery et al, 2007). Dieser Phänotyp steht im Gegensatz zu *gene trap-Hdac2^{lacZ/lacZ}*-Mäusen, die ein Fusionsprotein aus trunkiertem HDAC2 und β -

Galactosidase exprimieren (Zimmermann et al, 2007). Mäuse dieser Linie zeichnen sich durch ihren deutlich kleineren Wuchs, vor allem in den ersten 30 Tagen aus, der dazu führt, dass innerhalb der ersten 25 Tage mehr als 50% der *Knock-out*-Mäuse aufgrund der Nahrungskonkurrenz mit ihren größeren Geschwistern oder durch Kannibalismus der Muttertiere sterben (eigene Beobachtungen) (Trivedi et al, 2007). Anschließend haben diese Mäuse eine normale Lebenserwartung, obwohl sie subfertil sind und eine deutliche Gewichtsreduktion im Vergleich zu ihren HDAC2-exprimierenden Geschwistern aufweisen (eigene Beobachtungen) (Trivedi et al, 2007). Als Gründe für die Diskrepanz zwischen den beiden Phänotypen werden u.a. funktionelle Spleißvarianten durch die *lacZ*-Insertion, die bisher unbekannte Funktion des trunkierten C-Terminus sowie unterschiedliche genetische Hintergründe der Mäuse diskutiert (Montgomery et al, 2007).

In vivo wurde außerdem festgestellt, dass HDAC2 Gene der Synaptogenese reprimiert, da HDAC2-defiziente Mäuse eine erhöhte Synapsenanzahl, ein besseres Lernverhalten und ein besseres Gedächtnis aufwiesen (Guan et al, 2009).

Weitere nicht-redundante Funktionen von HDAC2 beruhen u.a. auf Experimenten mit siRNA/shRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 in verschiedenen Krebszelllinien (Jurkin et al, 2011). So wurde gezeigt, dass die HDAC2-Depletion in HeLa-Zellen zu einem differenzierteren Phänotyp mit flacheren, mit zahlreichen Zellfortsätzen versehenen Zellen sowie einer verstärkten Apoptose durch p21^{Cip1/WAF1}-Induktion führte (Huang et al, 2005). In Mammakarzinomzelllinien induzierte die HDAC2-Herunterregulation die Bindungsaktivität von p53 und führte zur Inhibition der Proliferation sowie zur Induktion der Seneszenz (Harms & Chen, 2007). Ebenfalls in Mammakarzinomzelllinien konnte durch HDAC2-Depletion eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tamoxifen aufgrund der verminderten Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren gezeigt werden (Bicaku et al, 2008). Auch eine Erhöhung der Sensitivität in Mammakarzinomzelllinien gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren nach HDAC2-Herunterregulation wurde beschrieben (Marchion et al, 2009). Die selektive Inhibition von HDAC2 könnte daher ein wirkungsvoller Ansatz für neue Krebstherapien sein.

1.7. HDAC-Inhibitoren (HDACi)

In den letzten Jahren wurden verschiedene Substanzen entdeckt, die HDACs mehr oder weniger selektiv hemmen können, die sogenannten HDAC-Inhibitoren (HDACi). Die Verwendung von HDACi zeigte bereits in verschiedenen klinischen Studien eine potente anti-neoplastische, tumorspezifische Wirkung (Huang, 2006), da sie in Tumorzellen einen Proliferationsstop bewirken und Apoptose induzieren (Bolden et al, 2006). Nicht-transformierte Zellen werden dagegen nicht im gleichen Maße angegriffen, vermutlich aufgrund der epigenetischen Unterschiede (Bolden et al, 2006).

HDACi werden nach ihrer chemischen Struktur in folgende Klassen eingeteilt (Bolden et al, 2006):

- Kurzkettige Fettsäuren (z.B. Valproinsäure)
- Hydroxamate (z.B. Trichostatin A)
- Benzamide (z.B. MS-275)
- Zyklische Tetrapeptide (z.B. Apicidin)
- Elektrophile Ketone (z.B. Trifluoromethylketon)
- Sonstige Verbindungen (z.B. MGCD-0103)

HDACi wirken nicht auf alle HDACs gleich, sondern spezifisch auf mehrere Klassen oder einzelne HDACs. So haben z.B. Trichostatin A (TsA) und Suberoylanilid-Hydroxamat (SAHA) eine breite inhibierende Wirkung (sogenannte *pan*-HDACi), während MS-275 selektiv auf die HDACs der Klasse I und Apicidin selektiv auf HDAC1 und 3 wirkt (Bolden et al, 2006). Die unterschiedliche Selektivität der HDACi wurde auch vor kurzem durch eine neue Chemoproteomik-Methode nachgewiesen (Bantscheff et al, 2011). Auch wird angenommen, dass Effekte von HDACi zelltypspezifisch sind (Bolden et al, 2006).

Im Moment werden mindestens 15 verschiedene HDACi in klinischen Studien als Mono- oder Kombinationstherapien getestet, bereits von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurde SAHA für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms (Schneider et al, 2010). Nebenwirkungen der HDACi sind meist Müdigkeit, Übelkeit, Dehydrierung, Durchfall, Thrombozytopenie und Unregelmäßigkeiten im Elektrokardiogramm (Schneider et al, 2010).

In Krebszellen, die aus duktalem Adenokarzinomen des Pankreas isoliert wurden, wurden bereits verschiedene HDACi untersucht. Auch hier wurden die Hemmung der Proliferation und die Induktion von Apoptose nachgewiesen (Ammerpohl et al, 2007; Donadelli et al, 2003; Kumagai et al, 2007; Neureiter et al, 2007; Ouaisi et al, 2008a; Ryu et al, 2006; Sato et al, 2004). Auf der molekularen Ebene konnte nach der Zugabe von HDACi eine Hochregulation der Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren (CDKI) p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} sowie eine Herunterregulation der Zellzykluspromotoren Cyclin D1, Cyclin B1, c-Myc und SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) beobachtet werden, was die Proliferationshemmung nach HDACi-Behandlung erklärt (Donadelli et al, 2003; Kumagai et al, 2007; Sato et al, 2004; Schneider et al, 2007). In Bezug auf Apoptose wurden die anti-apoptotischen BCL2-Familienmitglieder MCL1 und BCL-X_L herunterreguliert sowie die proapoptotischen BH3-*only* Proteine BIM, BID und BAX hochreguliert. Ebenso wurde Caspase-8 hochreguliert, die zur HDACi-induzierten Apoptose und Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika beiträgt (Ammerpohl et al, 2007; Donadelli et al, 2007; Neureiter et al, 2007; Piacentini et al, 2006; Ryu et al, 2006).

1.8. Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist für die Entwicklung und die Gewebe-Homöostase ein essentieller Prozess (Adams & Cory, 2007). Die Apoptose sorgt für die Elimination redundanter, beschädigter oder infizierter Zellen, so dass auch fast alle neoplastischen Veränderungen in der Entwicklung einer normalen Zelle zu einer Krebszelle, wie DNA-Schäden, Onkogenaktivierung oder Zellzyklusderegulation Apoptose induzieren können (Hamacher et al, 2008). Auch Chemotherapeutika lösen auf vielfältige Weise die Apoptose der Tumorzellen aus.

Effektormoleküle der Apoptose sind die sogenannten Caspasen (*cysteinyl-aspartate specific proteases*) (Degterev et al, 2003). Sie werden als Vorformen synthetisiert und durch Spaltung aktiviert. Da die Caspasen sich gegenseitig spalten und aktivieren können, kommt es zu einer regelrechten Caspasenkaskade, die die vollkommene Ausführung des Zelltods gewährleistet (Degterev et al, 2003). Caspasen spalten außerdem weitere Substrate, wie nukleare Lamine, DNase-Inhibitoren oder Zytoskelett-Proteine, was zu den typischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen führt (Hamacher et al, 2008).

Die Apoptose kann über den intrinsischen oder extrinsischen Signalweg aktiviert werden, die beide in der Aktivierung von Caspase-3, -6 und -7 münden (Abbildung 1-4) (Hamacher et al, 2008).

Im intrinsischen oder mitochondriellen Signalweg führen verschiedene Stimuli wie zellulärer Stress, Wachstumsfaktormangel, Onkogene oder zytotoxische Substanzen zu einer Aktivierung der pro-apoptotischen BH3-*only*-Proteine (Hamacher et al, 2008). Diese inhibieren daraufhin die anti-apoptotischen Mitglieder der BCL2-Familie, so dass BAX und/oder BAK freigesetzt und aktiviert werden und in der mitochondriellen Membran durch Oligomerisierung Poren bilden können, durch die u.a. Cytochrom C austritt (Adams & Cory, 2007; Antignani & Youle, 2006). Im Zytosol bildet sich das Apoptosom aus Cytochrom C, Procaspase-9 und APAF-1, und Caspase-9 wird aktiviert (Hamacher et al, 2008). Dadurch wird schließlich die Caspasenkaskade aus Caspase-3, -6 und -7 ausgelöst. Außerdem werden die *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Proteine durch die ebenfalls aus dem Mitochondrium freigesetzten Smac/DIABLO-Proteine (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI*) oder die Serin-Protease HtrA2/OMI (*high temperature requirement protein A2*) neutralisiert (Saelens et al, 2004).

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche aktiviert (Hamacher et al, 2008). Diese Rezeptoren sind Mitglieder der *tumor-necrosis factor* (TNF)-Superfamilie wie z.B. der TNF-, FAS- und TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)-Rezeptor, die eine intrazelluläre Todesdomäne besitzen (Hamacher et al, 2008). Durch extrazelluläre Bindung des Liganden (TNF α , FASL, TRAIL) wird das *FAS-associated death domain protein* (FADD) rekrutiert, und es bildet sich der

death inducing signaling complex (DISC) aus Todesrezeptor, FADD und Procaspase-8 und -10 (Hamacher et al, 2008). Nach der autokatalytischen Spaltung zu Caspase-8 werden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert, die wiederum zur Apoptose führen. In sogenannten Typ II-Zellen, zu denen Pankreaskarzinomzellen gehören, gibt es zudem eine Verstärkung der extrinsischen Apoptose, indem das BH3-*only* Protein BID durch Caspase-8 gespalten wird. tBID (*truncated* BID) sorgt daraufhin für die Freisetzung apoptogener Faktoren aus den Mitochondrien und damit zur zusätzlichen Aktivierung der mitochondrialen Apoptose (Hamacher et al, 2008).

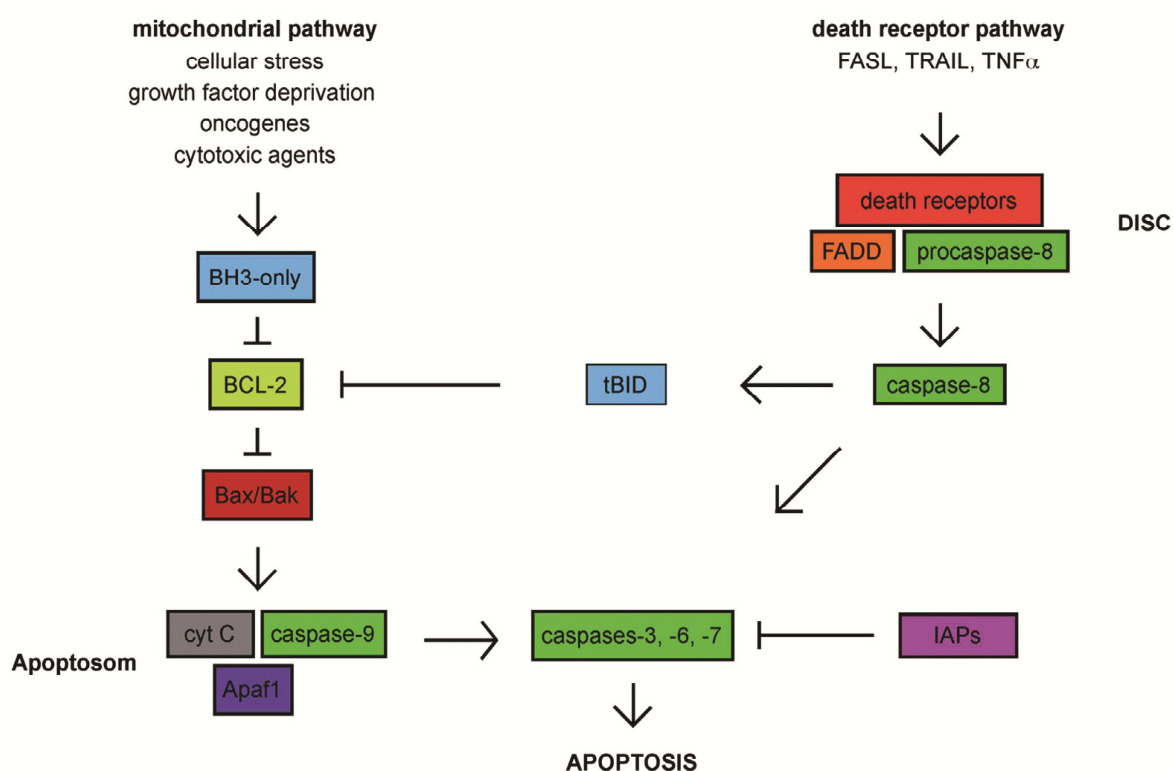


Abbildung 1-4: Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg.

Vereinfachtes Schema der Apoptoseinduktion durch den mitochondrialen und Todesrezeptor-Signalweg (Hamacher et al, 2008).

Neben der Dysregulation des Zellzyklus, dem invasiven Wachstum, der Insensitivität gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie der Metastasierung und der Angiogenese kann in vielen Krebsarten eine erhöhte apoptotische Schwelle beobachtet werden, die zu therapeutischer Resistenz führt (Fulda & Debatin, 2006; Hamacher et al, 2008; Hanahan & Weinberg, 2000; Schneider et al, 2005). Die Resistenz gegenüber Apoptose ist auch eine Eigenschaft des Pankreaskarzinoms, und daher ist die Erniedrigung der apoptotischen Schwelle ein therapeutisches Ziel (Hamacher et al, 2008). Mehrere aktuelle Studien zeigen, dass eine Strategie aus „*Sensitizer*“ (Erniedrigung der apoptotischen Schwelle) und „*Inducer*“ (Aktivierung der apoptotischen Maschinerie) ein wirkungsvoller Ansatz für eine rationale, molekular begründete Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms ist (Hamacher et al, 2008).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Histondeacetylase 2 (HDAC2) auf die Pathogenese des Pankreaskarzinoms hat. Dabei sollte mittels geeigneter *in vitro*-Modelle mit Pankreaskarzinomzelllinien die HDAC2-vermittelte Genregulation untersucht werden. Dies sollte durch siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC2 sowie durch chemische Inhibition von HDAC2 mittels des HDACi Valproinsäure geschehen. Da HDACs zur therapeutischen Resistenz von Krebszellen beitragen (Glozak & Seto, 2007), sollte durch Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika überprüft werden, ob die HDAC2-Depletion zu einer Überwindung der Apoptoseresistenz der Pankreaskarzinomzellen führt und welche Gene hierbei aktiviert werden.

Auch *in vivo* sollte die Funktion von HDAC2 untersucht werden. Zunächst sollten dabei humane Gewebe-Microarrays auf ihre HDAC2-Expression untersucht werden und die Daten mit bereits publizierten Microarray-Ergebnissen humaner Pankreaskarzinome verglichen werden. Die Verwendung eines konditionalen Mausmodells des Pankreaskarzinoms, in dem HDAC2 pankreasspezifisch deletiert werden kann, sollte außerdem anhand von Überlebenskurven und Gewebeschnitten Rückschlüsse auf die Bedeutung von HDAC2 in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms ermöglichen.

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 2-1: Laborgeräte.

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe B.V., EH Breda, NL
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Bioruptor UCD-200 TM	Diagenode s.a. BELGIUM EUROPE, Liège, B
Blotting-Apparatur <i>Semi-Dry</i>	Kreutz, Reiskirchen
Brutschrank HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CO ₂ -Inkubator HERAcell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dewar-Transportgefäß, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Echtzeit-PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Einbettssystem EG 1150	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eppendorf 5432 Mixer	Eppendorf AG, Hamburg
Folienschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Geldokumentationssystem Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer Sunrise	Biometra GmbH, Göttingen
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Glaswaren Schott Duran	Schott UK Ltd, Stafford, UK
Homogenisator Silent Crusher M	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Lumineszenzgerät FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad
Magnetrührer IKAMAG	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Manuelle Färbestation	Thermo Scientific, Walldorf
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom HM355S	Thermo Scientific, Walldorf
Mikrowelle	Siemens AG, München
Multipette stream	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer Improved	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Bioscience Corporate, Lincoln, NE, USA
PCR-Maschinen TPersonal/TGradient	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
pH-Meter pH 521	WTW GmbH, Weilheim
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co. KG, Eberstadt
Power Supply EPS 601	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Präzisionswaage Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern

Bezeichnung	Hersteller
Pumpe VacuGene	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pumpe VacuGene XL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoshake	Gerhardt GmbH, Königswinter
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Vortex VF2	IKA-Werke GmbH, Staufen
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Western Blot-System Mighty Small II	Hofer Inc., Holliston, MA, USA
Wippschüttler WT 16	Biometra GmbH, Göttingen
Zentrifuge Avanti J25	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA

2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Übersicht über Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Biopur Combitips	Eppendorf AG, Hamburg
Blotting Papier	Whatman plc, Kent, UK
CryoTubes	Nunc Brand Products, Naperville, IL, USA
Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einbettkassetten	AMP, Stensved, DK
Einmalspritzen	CODAN Medizinische Geräte GmbH, Lensahn
Höllenstein-Ätztift Argentrix	ryma – pharm GmbH, Körle
Immobilon-P PVDF Transfer Membran	Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
Kanülen Gr. 18	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Phase Lock Gel Light Tubes	5' prime GmbH, Hamburg

Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße 0,65 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe-lock Reaktionsgefäße Biopur	Eppendorf AG, Hamburg
Schlauchfolie	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Shandon coverplate für IHC	Thermo Scientific, Walldorf
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Spritzenfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt AG, Nümbrecht
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Zellkulturverbrauchsmaterialien (Flaschen, Schalen, well-Platten, Röhrchen)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen, CH, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen, CH

2.3. Allgemeine Reagenzien und Enzyme

Tabelle 2-3: Allgemeine Reagenzien und Enzyme.

Reagenz/Enzym	Hersteller
2-Log DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
5-Fluorouracil (5-FU)	EMD Biosciences, San Diego, CA, USA
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bio-Rad Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovine Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Etoposid	EMD Biosciences, San Diego, CA, USA
FuGene6	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England Biolabs, Frankfurt
Gemcitabin	Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Reagenz/Enzym	Hersteller
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isofluran Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Agar/-Flüssigmedium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonidet P40	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Oligofectamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Oxaliplatin	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Paraformaldehyd 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Passive Lysis Buffer	Promega GmbH, Mannheim
PBS GIBCO pH 7,4 (10x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Polyinosinic:polycytidylic acid, Poly(I:C)	InvivoGen Europe, Toulouse, F
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Protein A Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Proteinase K peqGOLD (ChIP-Assay)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilde
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Reagenz/Enzym	Hersteller
tRNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Valproinsäure (VPA)	Merck KGaA, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.4. Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 2-4: Verwendete Pankreaskarzinomzelllinien.

Bezeichnung	Quelle
MiaPaCa2	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
Panc1	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
BxPc3	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
DanG	DKFZ Tumorbank, Heidelberg

Tabelle 2-5: Verwendete Reagenzien für die Zellkultur.

Reagenz	Hersteller
Collagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
D-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FCS	Biochrom AG, Berlin
Opti-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2-6: Medienzusammensetzung für die Zellkultur.

Zelllinie/Art des Mediums	Zusammensetzung
MiaPaCa2, Panc1, primäre Zelllinien aus murinen Pankreaskarzinomen	D-MEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
BxPc3, DanG	RPMI 1640 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
Abstopppmedium (siRNA-Transfektion)	D-MEM 20% FCS 2% Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	7 ml D-MEM 2 ml FCS 1 ml DMSO

2.5. Reagenzien für die Histochemie

Tabelle 2-7: Reagenzien für die Histochemie.

Reagenz	Hersteller
Antigen Unmasking Solution, Citrate-based	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Eosin wässrig 2%	Waldeck GmbH, Münster
Goat serum G9023	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
H ₂ O ₂	Merck KgaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt
Paraffin Tissue Microarray mit normalem Pankreasgewebe sowie duktalem Adenokarzinomen des Pankreas	BioCat GmbH, Heidelberg
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.6. Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 2-8: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.7. Puffer

Tabelle 2-9: Verwendete Puffer.

Bezeichnung des Puffers	Zusammensetzung
Gitschier's Puffer (10x)	670 mM TRIS pH 8,8 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 67 mM MgCl ₂

Material

Bezeichnung des Puffers	Zusammensetzung
PCR-Lysepuffer	0,5% (v/v) Triton X-100 1% (v/v) β -Mercaptoethanol 10% (v/v) 10x Gitschier's Puffer
IP-Puffer pH 7,9 (Ganzzelextrakte)	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P40 10% (v/v) Glycerol
5x Laemmli-puffer pH 6,8 (Western Blot)	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 228 mM TRIS-HCl 0,75 mM Bromphenolblau 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer pH 6,8 (Western Blot)	0,5 M TRIS-HCl
Trenngelpuffer pH 8,8 (Western Blot)	1,5 M TRIS-HCl
Laufpuffer 10x (Western Blot)	0,25 M TRIS-HCl 2 M Glycin 1% (w/v) SDS
Transferpuffer <i>Semi-Dry</i> pH 8,3 (Western Blot)	39 mM Glycin 48 mM TRIS-HCl 0,037% (w/v) SDS 20% (v/v) Ethanol
<i>Blocking</i> Puffer (Western Blot)	5% (w/v) Magermilchpulver 0,1% (v/v) Nonidet P40 gelöst in PBS
Waschpuffer (Western Blot)	0,1% (v/v) Nonidet P40 in PBS
L1-Puffer (ChIP)	50 mM TRIS pH 8,0 2 mM EDTA 0,1% (v/v) NP-40 10% (v/v) Glycerol
L2-Puffer (ChIP)	50 mM TRIS pH 8,0 5 mM EDTA pH 8,0 1% (w/v) SDS
Dilutionspuffer (ChIP)	50 mM TRIS pH 8,0 0,5 mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P40 200 mM NaCl

Bezeichnung des Puffers	Zusammensetzung
Hochsalzpuffer (ChIP)	20 mM TRIS pH 8,0 2 mM EDTA 1% (v/v) Nonidet P40 500 mM NaCl 0,1% (w/v) SDS
LiCl-Puffer (ChIP)	20 mM TRIS pH 8,0 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P40 250 mM LiCl 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
Niedrigsalz/TE-Puffer (ChIP/Echtzeit-PCR)	10 mM TRIS pH 8,0 1 mM EDTA
Elutions-Puffer (ChIP)	10 mM TRIS pH 8,0 1 mM EDTA 1% (w/v) SDS
PBS pH 7,4	8 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄
50x TAE-Puffer pH 8,5	2 M TRIS 100 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure (100%)

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.8. Antikörper

Tabelle 2-10: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Anti-acetyl Histon H3 (Kaninchen)	Upstate/Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
Anti-cleaved PARP (Maus)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-HDAC1, clone 2E10 (Maus)	Upstate/Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
Anti-HDAC2 C-8 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Anti-HDAC2 H-54 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Anti-MCL1 (Kaninchen)	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
Anti-MDA-5 K375 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-NOXA (Maus)	Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA
Anti-Pol II N-20 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Anti-RIG-I D14G6 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-β-Aktin (Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Antikörper	Hersteller
Normal rabbit IgG sc-2027	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
AlexaFluor 680 goat anti-mouse IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AlexaFluor 750 goat anti-mouse IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AlexaFluor 680 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
AlexaFluor 750 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Biotinylated goat anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.9. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Ihre Sequenzen sind Tabelle 2-11 zu entnehmen.

Tabelle 2-11: Sequenzen verwendeter Oligonukleotide.

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
siRNA	<i>scrambled</i> /Kontrolle	CAGUCGCGUUUGCGACUGGdTdT
siRNA	HDAC1	GCAGAUGCAGAGAUUCAACdTdT
siRNA	HDAC2G	GCCUCAUAGAAUCCGCAUGdTdT
siRNA	NOXA	GGAAGUCGAGUGUGCUACUdTdT
Echtzeit-PCR	hCyclophilin-f	ATGGTCAACCCCACCGTGT
	hCyclophilin-r	TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC
Echtzeit-PCR	HDAC1-homo-f	GCTCCATCCGTCCAGATAAC
	HDAC1-homo-r	CTCAAACAGGCCATCGAATA
Echtzeit-PCR	HDAC2-homo-f	AGCATCAGGATTCTGTTACGTTAATGA
	HDAC2-homo-r	CAACACCATCACCATGATGAATATCT
Echtzeit-PCR	NOXA-homo-fw3	CGGAGATGCCTGGGAAGAA
	NOXA-homo-rev2	CCAAATCTCCTGAGTTGAGTAGCA
Echtzeit-PCR	DDX58-homo-f	ACACAGAGAGTCTGGCAAAGA
	DDX58-homo-r	TTGTCTGGCATCTGGAACA
Echtzeit-PCR	IFIH1-homo-f	CGTCAAACAGGAAACAATGAAC
	IFIH1-homo-r	TTCTCCAGATTTGGCTGAACT
Klonierung Standardreihen	M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
ChIP-PCR	GAPDH FW	AGCTCAGGCCTCAAGACCTT
	GAPDH RV	AAGAAGATGCGGCTGACTGT
ChIP-PCR	Noxa-485FW	AGCGTTTGCAGATGGTCAA
	Noxa-328RV	GGAAGTACCCCGCTGAG

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Genotypisierung <i>Hdac2^{loxP}</i>	HDAC2-loxP WT FW	GCACAGGCTACTACTGTGTAGTCC
	HDAC2-loxP RV	CCACCACTGACATGTACCCAAC
	HDAC2-loxP Mut FW	GTCCCTCGACCTGCAGGAATTC
	Gabra1-UP	AACACACACTGGAGGACTGGCTAGG
	Gabra1-LP	CAATGGTAGGCTCACTCTGGGAGATGATA
Genotypisierung <i>Ptf1a^{Cre}</i>	p48-Cre-GT-LP-URP	CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA
	p48-Cre-GT-wt-UP	CCACGGATCACTCACAAAGCGT
	p48-Cre-GT-mut-UP-neu	GCCACCAGCCAGCTATCAA
Genotypisierung <i>LSL-Kras^{G12D}</i>	Kras-UP1-WT	CACCAGCTTCGGCTTCCTATT
	Kras-LP-URP1	AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA
	Kras ^{G12D} -mut-UP	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
Genotypisierung <i>LSL-Trp53^{R172H}</i>	Trp53 ^{R172H} -WT-UP2	AGCCTTAGACATAACACACGAAC
	Trp53 ^{R172H} -URP-LP	CTTGGAGACATAGCCACACTG
	p53 ^{R172H} -mut UP4	GCCACCATGGCTTGAGTAA
Genotypisierung <i>LSL-R26^{Tva-lacZ}</i>	R26-Tva-GT-UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
	R26-Tva-GT-WT-LP	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

2.10. Plasmide und Bakterienstämme

Tabelle 2-12: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Hersteller/Bemerkung
pGL3-Basic	Promega GmbH, Mannheim
NOXA-Luc wt	Zur Verfügung gestellt von Dr. C. Lallemand (Lallemand et al, 2007); Einfügen des humanen <i>NOXA</i> -Promotors (1,2 kb) in pGL3-Basic (Promega)
pCRII-TOPO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>faf2</i> (<i>Cyclophilin</i> human in pCRII-TOPO)	
<i>fag3</i> (<i>HDAC1</i> human in pCRII-TOPO)	
<i>fah2</i> (<i>HDAC2</i> human in pCRII-TOPO)	
<i>fai6</i> (<i>NOXA</i> human in pCRII-TOPO)	Für Standardreihen Echtzeit-PCR, siehe 3.2.6
<i>fam3</i> (<i>DDX58</i> human in pCRII-TOPO)	
<i>fan1</i> (<i>IFIH1</i> human in pCRII-TOPO)	

Zur Klonierung wurden *One Shot TOP10 chemically competent cells* der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) verwendet. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschocks, wie unter 3.2.6 beschrieben.

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. *Kultivierung und Aussaat der Zellen*

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter Sterilwerkbänken. MiaPaCa2-, Panc1-, BxPc3- und DanG-Zellen wurden in den angegebenen Medien (Tabelle 2-6) kultiviert und in 37°C-Brutschränken mit 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem, vorgewärmtem Medium versorgt und passagiert. Das Umsetzen und die Aussaat der Zellen erfolgten durch Waschen mit sterilem PBS und Zugabe von Trypsin, das die Zellen von der Kulturflasche ablöste und vereinzelte. Das Auszählen der Zellen erfolgte in einer Neubauerzählkammer.

Für siRNA- und Poly(I:C)-Transfektionen wurden stets 50.000 Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte und 2.000 Zellen pro *well* einer 96-*well*-Platte ausgesät. Für Luciferase-Assays wurden in 12-*well*-Platten 30.000 Zellen pro *well* verwendet. Bei Behandlung der Zellen mit Chemikalien ohne vorangehende Transfektion wurden 50.000 Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte und 5.000 Zellen pro *well* einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten in 2 ml, in 12-*well*-Platten in 1 ml und in 96-*well*-Platten in 100 µl Medium ausgesät.

3.1.2. *siRNA-Transfektionen*

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium gewaschen, um transfektionshemmende Serumrückstände zu entfernen. Anschließend wurden bei 6-*well*-Platten 800 µl und bei 96-*well*-Platten 80 µl serumfreies Medium vorgelegt.

siRNAs (*small interfering RNAs*; Sequenzen siehe Tabelle 2-11) wurden in einer Konzentration von 40 µM in Wasser gelöst und mittels Oligofectamins (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers in einer Konzentration von 50 nM transfiziert. Bei Doppeltransfektionen wurden von jeder siRNA 50 nM eingesetzt, so dass insgesamt 100 nM siRNA transfiziert wurden. Wie aus Tabelle 3-1 ersichtlich ist, wurde Oligofectamin hierzu 5 Minuten mit Opti-MEM inkubiert (Mix I), dann zu dem Ansatz aus siRNA und Opti-MEM (Mix II) gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl des Gemisches zu den Zellen in 6-*well*-Platten und 20 µl zu den Zellen in 96-*well*-Platten gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml (6-*well*-Platte) bzw. 100 µl (96-*well*-Platte) Medium mit 20% FCS gestoppt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium durch frisches Medium mit 10% FCS ersetzt.

Tabelle 3-1: Ansätze zur Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit siRNA.Mengenangaben beziehen sich auf den Ansatz je *well*.

		6- <i>well</i> -Platte	96- <i>well</i> -Platte	Beschreibung
Mix I	Opti-MEM	12,5 µl	2,5 µl	5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, dann Zugabe zu Mix II
	Oligofectamin	2,5 µl	0,5 µl	
Mix II	Opti-MEM	183,75 µl	16,875 µl	Nach Zugabe von Mix I 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
	siRNA (50 nM final)	1,25 µl	0,125 µl	

3.1.3. *Behandlung der Zellen mit Valproinsäure (VPA)*

Um HDACs der Klasse I zu inhibieren und HDAC2 proteasomal zu degradieren, wurde Valproinsäure (*valproic acid*, VPA) verwendet. VPA wurde in einer Konzentration von 150 mM in bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und maximal drei Monate bei -20°C gelagert. Zur Behandlung der Zellen wurde für jede der verwendeten Konzentrationen eine Verdünnung mit dem entsprechenden Medium hergestellt, das alte Medium von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für die angegebenen Zeiträume auf den Zellen belassen.

3.1.4. *Behandlung der Zellen mit Chemotherapeutika*

Zur Induktion von Apoptose in den Pankreaskarzinomzelllinien wurden verschiedene Chemotherapeutika eingesetzt. Etoposid wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 25 mg/ml angesetzt und mit Medium auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt. Es wurde stets eine DMSO-Negativkontrolle mitgeführt. Analog wurde für 5-Fluorouracil (5-FU; Stammlösung 100 mM in DMSO) verfahren. Oxaliplatin wurde zu 1,36 mM in G5%-Glucose-Lösung, Gemcitabin zu 10 mg/ml in bidestilliertem Wasser gelöst.

3.1.5. *Poly(I:C)-Transfektionen*

Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) ist eine synthetische, doppelsträngige RNA, die *in vitro* virale Infektionen simuliert (Besch et al, 2009). Poly(I:C) wurde mittels Polyethylenimins (PEI) in die Zellen transfiziert (Wirth et al, 2011). Dazu wurden die Zellen in 96-*well*-Platten ausgesät. 24 Stunden nach dem Aussäen wurde VPA (finale Konzentration 1,5 mM) zu den Zellen gegeben (siehe 3.1.3), nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Transfektion. Dafür wurde Poly(I:C) (Stammlösung 1 µg/µl in bidestilliertem Wasser) zunächst 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt, dann ad 20 µl auf die verschiedenen Konzentrationen eingestellt. So wurden z.B. für eine finale Konzentration von 100 ng/ml Poly(I:C) in 1 ml Transfektionsansatz

zunächst 10 µl 1:100-verdünntes Poly(I:C) mit 10 µl Wasser gemischt, dann 100 µl Opti-MEM und 1 µl PEI (Stammlösung 1 mg/ml; sterilfiltriert und bei -20°C gelagert) hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde die Poly(I:C)-PEI-Mischung zu 869 µl serumfreiem Medium mit 10 µl VPA (Stammlösung 150 mM) bzw. Wasser gegeben und je 100 µl des Gemisches für 48 Stunden auf den Zellen belassen.

3.1.6. Hoechst-Färbung

Das Hoechst-Reagenz 33342 ist ein zellpermeabler Farbstoff, der bei Bindung an doppelsträngige, AT-reiche Bereiche der kleinen DNA-Furche blau fluoresziert. Diese Färbung kann verwendet werden, um apoptotische Zellen zu identifizieren und zu quantifizieren, da die kondensierte und fragmentierte DNA deutlich von normalen Zellkernen zu unterscheiden ist.

Vor der Färbung wurden die Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät und mit siRNA transfiziert und/oder verschiedenen Chemikalien behandelt (siehe 3.1.1., 3.1.2., 3.1.3., 3.1.4.). Jedes *well* enthielt 100 µl Medium.

Für die Färbung wurde zunächst die Hoechst-Stammlösung (2 mM) 1:250 in Medium verdünnt, dann 100 µl zu jedem *well* hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten im Brutschrank konnten die apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden. Pro *well* wurden 300 Zellen ausgezählt, jede Behandlung erfolgte im Triplett.

3.1.7. MTT-Assay

Durch den 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay kann die Viabilität von Zellen nach verschiedenen Behandlungen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen im Triplett in 96-*well*-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit siRNA transfiziert oder mit chemischen Substanzen behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden zu 100 µl Medium 10 µl des MTT-Reagenz hinzugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Lebende Zellen werden hierdurch blau angefärbt, da sie den wasserlöslichen MTT-Farbstoff in wasserunlösliche Formazankristalle umwandeln können. Im Anschluss daran wurde das Medium verworfen und die Formazankristalle mit 200 µl eines Gemisches aus DMSO und Ethanol 100% (1:1) gelöst. Nach 10-minütigem Schütteln wurde die Optische Dichte (OD) im Photometer Anthos 2001 bei 600 nm bestimmt. Die OD der Negativkontrolle wurde als 100% Viabilität festgesetzt und die Viabilität der behandelten Zellen darauf bezogen.

3.1.8. Bromodeoxyuridin (BrdU)-Assay

Die Untersuchung der Proliferation in Pankreastumorzelllinien nach verschiedenen Behandlungen wurde mittels des *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kits* (Roche Diagnostics) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden im Triplet in 96-*well*-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit siRNA transfiziert oder mit chemischen Substanzen behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden zu den Zellen 10 µl *BrdU labeling solution* hinzugegeben und für weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das Pyrimidinanalog BrdU in proliferierenden Zellen an Stelle von Thymidin in die DNA inkorporiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und zur Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA 200 µl *FixDenat* hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Lösung ersetzt durch die *anti-BrdU-POD*-Lösung (Peroxidase-konjugierte Anti-BrdU-Antikörper), die 90 Minuten auf den Zellen belassen wurde. Die Zellen wurden dreimal mit 200 µl *Washing solution* gewaschen, dann wurden zur Detektion der Immunkomplexe 100 µl *Substrate solution* hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD im Photometer Anthos 2001 bei 414 nm (Referenz: 550 nm) gemessen.

3.1.9. Caspase-Assay

Durch den Caspase-Assay kann die Aktivität von Caspasen nachgewiesen werden, indem ein Substrat verwendet wird, das nach der Spaltung durch Caspasen luminesziert. Es wurde dafür der *Caspase-Glo-3/7-Assay* (Promega) nach Anleitung des Herstellers verwendet. In einem Vorversuch wurde dazu zunächst die Inkubationszeit der Zellen mit VPA und/oder Etoposid bis zur maximalen Caspase-Aktivität ermittelt. Im Versuch wurde dann nach der jeweiligen Inkubationszeit 100 µl des Caspase-Reagenz zu den Zellen gegeben und die 96-*well*-Platte nach einer Stunde Inkubation im FLUOstar-Luminometer analysiert.

3.1.10. Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay wird verwendet, um die Aktivität eines Promotorbereiches durch die Expression eines Reportergens nachzuweisen. Hierzu wird der zu untersuchende Promotor vor das Luciferase-Reporter gen kloniert und das Plasmid in die Zellen transfiziert. Nach Lyse der Zellen und Zugabe des Substrates Luciferin kann durch die Aktivität der Luciferase die emittierte Lumineszenz gemessen werden.

24 Stunden nach dem Aussäen erfolgte die Transfektion mit den Reporterplasmiden pGL3-Basic und Noxa-Luc wt (Lallemand et al, 2007) im Triplet mittels FuGene6 (Roche Diagnostics) gemäß den Angaben des Herstellers. Vor der Transfektion wurde 1 ml Medium vorgelegt, pro *well* wurden 500 ng Reporterplasmid eingesetzt. Der Ansatz aus 97 µl

serumfreiem Medium, 3 μ l FuGene6 und 500 ng pDNA wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor pro *well* 100 μ l zugegeben wurden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden je *well* 80 μ l *Passive Lysis Buffer* (1:5 verdünnt mit bidestilliertem Wasser) auf die Zellen gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Das Lysat wurde anschließend mehrmals im *well* auf- und abpipettiert, um die Zellen zu lösen, dann wurde es in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in Stickstoff schockgefroren und mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden die Proben nach dem Auftauen 20 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert und 50 μ l zu 50 μ l vorgelegtem Luciferin gegeben. Die Messung erfolgte im Luminometer, die Messdauer betrug 10 Sekunden. Anschließend wurde die Proteinmenge der Proben bestimmt (siehe 3.2.1) und die Werte darauf normalisiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Ganzzellextrakte

Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten ausgesät und mit siRNA transfiziert oder mit chemischen Substanzen behandelt, wie unter 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben. Vor der Ernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurde IP-Puffer zugegeben (30 μ l pro *well* einer 6-*well*-Platte), der nach der Anleitung des Herstellers mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche Diagnostics) supplementiert war und die Zellen mit einem Zellschaber auf Eis abgekratzt. Das Lysat wurde in einem *Safe-Lock* Reaktionsgefäß in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Lysat 20 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte durch die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden das Farbstoffkonzentrat 1:5 in Wasser verdünnt und in eine Mikrotiterplatte je *well* 300 μ l vorgelegt. Pro *well* wurde je 1 μ l der Proben zugegeben, die Messung erfolgte im Triplett. Als Standardreihe wurden definierte Konzentrationen von BSA verwendet.

Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die OD der Farbreaktion im Photometer Anthos 2001 bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Ausgehend von der Standardreihe wurde hieraus die Proteinkonzentration berechnet. Anschließend wurde in allen Proben durch Zugabe von IP-Puffer eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und Laemmli-Puffer hinzugegeben. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden die Extrakte bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2. Western Blot

Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die elektrophoretische Auftrennung der Ganzzellextrakte erfolgte mittels einer SDS-PAGE. Hierzu wurden die unter Tabelle 3-2 angegebenen Gele verwendet. Je nach dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurde ein 10- bis 15%iges Trenngel verwendet.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Mengenangaben beziehen sich auf Gele der Größe 5,5 x 8,5 x 0,15 cm.

	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%
ddH ₂ O	3 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,5 ml
Sammelgel-/ Trenngelpuffer	1,3 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
Acrylamid 30%	750 µl	3,3 ml	4 ml	5 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS 10%	25 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Zunächst wurde das Trenngel vorbereitet. Nach dem Start der Polymerisation durch APS und TEMED wurde es in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 20 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und die Polymerisation des Sammelgels durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Nachdem das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel pipettiert worden war, wurde der Probenkamm ohne Luftblasen hineingesteckt. Nach 30 Minuten wurde der Kamm entfernt und die Probenaschen dreimal mit Laufpuffer mittels einer Spritze gespült. Während die Proben 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurden, wurden die Gele in die Laufvorrichtung eingespannt. Anschließend wurden die Proben und ein Proteinmarker aufgetragen und mit Laufpuffer überschichtet. Sie wurden bei 80-120 V für 2-4 Stunden aufgetrennt.

Blotten. Im Anschluss daran wurden die Proteine in einer *Semi-Dry*-Blotapparatur auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde die Membran in Methanol aktiviert und in bidestilliertem Wasser gewässert. Nachdem sie kurz in Transferpuffer gelegt worden war, wurde sie in der Blotapparatur auf drei Lagen Transferpuffer-getränktes Blottingpapier aufgebracht. Auf die Membran wurde das in Transferpuffer gewaschene Gel gelegt, gefolgt von drei Lagen feuchtem Blottingpapier. Es wurde je nach Molekulargewicht der Proteine für 45 bis 60 Minuten geblottet, bei 0,8 mA/cm².

Immundetektion. Nach dem Blot wurden die Membranen 30 Minuten in *Blocking* Puffer geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurden die Membranen mit 4 ml des primären Antikörpers (1:500 - 1:1000 verdünnt in *Blocking* Puffer) eingeschweißt und über Nacht auf einem Wippschüttler bei 4°C inkubiert. Als Ladekontrolle

wurde stets β -Aktin verwendet (1:2000 verdünnt in *Blocking Puffer*). Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen dreimal 10 Minuten mit Waschpuffer bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4 ml des Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpers (1:2000 verdünnt in *Blocking Puffer*) eingeschweißt und im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer im Dunkeln wurde die Membran am *Odyssey Infrared Imaging System* bei 700 bzw. 800 nm Wellenlänge eingescannt.

3.2.3. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten sowie zur Qualitätskontrolle isolierter RNA (siehe 3.2.4, 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8, 3.3.3) wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden je nach erwarteter Bandengröße 0,7 bis 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, dann unter Rühren bis zu einer Temperatur von ca. 55°C abgekühlt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid wurde das Gel in die Gießvorrichtung gegossen und bis zur Erkaltung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde es in die TAE-Puffer gefüllten Laufkammern überführt. Es wurden 10-35 μ l Probe (ggf. mit Auftragspuffer versetzt) sowie ein DNA-Marker (0,1 - 10 kb) aufgetragen, dann die Gelelektrophorese bei 110 V für 1,5 Stunden durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte in einem Geldokumentationssystem durch UV-Licht (302 nm).

3.2.4. RNA-Extraktion

Die Zellen wurden nach ihrer entsprechenden Behandlung (siRNA/Chemikalien) nach der jeweiligen Inkubationszeit geerntet. Hierzu wurden 600 μ l RLT-Puffer versetzt mit 6 μ l β -Mercaptoethanol und das Medium der Zellen verworfen. Je *well* einer 6-*well*-Platte wurden 100 μ l des RLT/ β -Mercaptoethanol-Gemischs hinzugegeben und die lysierten Zellen auf Eis abgekratzt. Nach der Überführung des Lysats in ein Biopur-Reaktionsgefäß wurde es direkt weiterverwendet oder in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels der *QIAshredder*-Säulchen und des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zusammengefasst, wurden die Proben zunächst in den *QIAshredder*-Säulchen zentrifugiert und das Lysat mit einem Volumen 70%igem Ethanol gemischt. Durch zweimaliges Zentrifugieren in *RNeasy Mini Columns* wurden die im Lysat enthaltenen Nukleinsäuren an die Membran gebunden. Nach einem Waschschrift mit Puffer RW1 wurden je Säule 80 μ l DNase I-Lösung (10 μ l DNase I Stock-Lösung und 70 μ l RDD-Puffer) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit Puffer RW1 und zwei Waschschriffe mit Puffer RPE. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden die Säulchen

ein weiteres Mal ohne Puffer zentrifugiert, dann wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration und Qualität der RNA wurde in einer photometrischen Messung am NanoDrop-Gerät ermittelt.

3.2.5. *cDNA-Synthese durch reverse Transkription*

Um eine quantitative Echtzeit-PCR durchführen zu können, wurde die isolierte RNA (3.2.4) zunächst durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde der in Tabelle 3-3 angegebene Reaktionsansatz mit den Reagenzien der Firma Applied Biosystems verwendet.

Tabelle 3-3: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.

Die verwendeten Komponenten sind Bestandteile des *TaqMan Reverse Transcription Reagents Kits* (Applied Biosystems).

Komponente	Finale Konzentration	µl pro Reaktion
<i>10x TaqMan RT Buffer</i>	1x	5 µl
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	5,5 mM	11 µl
<i>dNTP-Mix</i>	500 µM jeweils	10 µl
<i>Random hexamers</i>	2,5 µM	2,50 µl
<i>RNase Inhibitor</i>	0,4 U/µl	1 µl
<i>Multiscribe RT (50 U/µl)</i>	1,25 U/µl	1,25 µl
RNA	1 µg	1 µg
Wasser RNase-frei	ad 19,25 µl	ad 19,25 µl

Die Reaktion erfolgte in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm:

25°C 10 min

48°C 1 h

95°C 5 min

Anschließend wurde die cDNA 1:5 in TE-Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.6. **Quantitative Echtzeit-PCR**

Design der Oligonukleotide. Die für die quantitative Echtzeit-PCR benötigten Oligonukleotide wurden mittels des Programms Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) und der Gensequenzen unter <http://www.ensembl.org> entworfen. Die Länge des PCR-Produkts sollte dabei 50-150 bp betragen und eine Schmelztemperatur von ca. 60°C aufweisen. Außerdem sollten die Oligonukleotide in unterschiedlichen Exons des Gens liegen, die durch ein Intron von mehr als 1000 bp getrennt sind, um unspezifische Reaktionen mit genomischer DNA zu vermeiden.

Klonierung der Standardreihen. Durch die quantitative Echtzeit-PCR ist eine genaue Bestimmung der Molekülmengen eines Transkripts möglich. Hierzu ist es erforderlich, bei jedem Experiment eine Standardreihe mitzuführen, von der die Molekülmengen bekannt sind. Die Erstellung der Standardreihen erfolgte durch die Klonierung des jeweiligen PCR-Produkts in den Vektor pCRII-TOPO mittels des *TOPO TA Cloning Kits* (Invitrogen). Das PCR-Produkt wurde dabei durch den in Tabelle 3-4 angegebenen Ansatz generiert.

Tabelle 3-4: PCR-Ansatz und -Bedingungen zur Generierung des PCR-Produkts zur Verwendung im *TOPO TA Cloning Kit*.

Ansatz	1x	PCR-Bedingungen	
<i>REDTaq ReadyMix</i>	25 µl	95°C	3 min
Echtzeit-Oligonukleotid <i>forward</i> (10 µM)	2 µl	95°C	45 sec
Echtzeit-Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	2 µl	60°C	45 sec
H ₂ O	19 µl	72°C	45 sec
cDNA (20 ng/µl)	2 µl	72°C	10 min

Anschließend wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel in TAE-Puffer die richtige Größe des PCR-Produkts und die Spezifität der Reaktion überprüft. Zu 2 µl des PCR-Produkts wurden dann 0,5 µl Salt Solution und 0,5 µl pCRII-TOPO-Vektor aus dem *TOPO TA Cloning Kit* gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 µl des Ansatzes zu chemokompetenten TOP10 *Escherichia coli* gegeben und durch Hitzeschock transformiert. Dazu wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von 30 Sekunden bei 42°C und 2 Minuten auf Eis. Nach der Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C geschüttelt, um den Bakterien eine Expression der Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Kanamycin-Agarplatten (100 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überprüft, welche Kolonien das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung exprimierten. Hierzu wurden 5 bis 10 Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in PCR-Reaktionsgefäße überführt und auf einer neuen Agarplatte („Pickplatte“) ausgestrichen, die bei 37°C inkubiert wurde. In die PCR-Reaktionsgefäße wurden 50 µl H₂O gegeben und zur Lyse in einer PCR-Maschine 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die freigesetzte DNA wurde in *Screen-PCRs* verwendet (Tabelle 3-5). Dabei wurde in einer ersten PCR mit den ursprünglichen Echtzeit-Oligonukleotiden überprüft, ob das PCR-Produkt in pCRII-TOPO integriert wurde. In einer zweiten PCR wurde dann mittels des M13 rev-Oligonukleotids, das 5' des PCR-Produkts im Vektor bindet, überprüft, ob das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung eingefügt wurde.

Tabelle 3-5: PCR-Ansätze und –Bedingungen der Screen-PCRs zur Überprüfung der erhaltenen Kolonien durch das TOPO TA Cloning Kit.

Ansatz	1x	PCR-Bedingungen		
<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C	3 min	40 Zyklen
Echtzeit-Oligonukleotid <i>forward</i> (10 µM)	1 µl	95°C	45 sec	
Echtzeit-Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl	60°C	45 sec	
H ₂ O	3 µl	72°C	45 sec	
Bakterienlysat	10 µl	72°C	10 min	
<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C	3 min	40 Zyklen
M13 rev (10 µM)	1 µl	95°C	45 sec	
Echtzeit-Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl	60°C	45 sec	
H ₂ O	3 µl	72°C	45 sec	
Bakterienlysat	10 µl	72°C	10 min	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Nur wenn bei beiden PCRs Banden in der richtigen Länge zu detektieren waren, konnte davon ausgegangen werden, dass das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung inseriert worden war.

Positive Klone wurden ausgehend von der Pickplatte in 5 ml LB-Kanamycin-Medium angeimpft (100 µg/ml Kanamycin) und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach Abnahme einer Glycerinkultur (500 µl Bakteriensuspension gemischt mit 400 µl Glycerin, Lagerung bei -80°C) wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 Min uten, 7.000 rpm, 4°C) und das Sediment zur Isolation der Plasmid-DNA verwendet. Die Isolation der DNA erfolgte durch Verwendung des *Plasmid Mini Kits* (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde durch photometrische Messung im NanoDrop-Gerät bestimmt.

Ausgehend von der Anzahl der Basenpaare (bp) des entstandenen Plasmids und der erhaltenen Konzentration wurde daraufhin die Molekülmenge pro µl berechnet:

$$\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \text{Konzentration Plasmid} \left[\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right] \cdot \frac{6,022 \cdot 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}}{\text{bp Plasmid} \cdot 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}$$

Der errechnete Wert wurde verwendet, um die Standardreihen zu verdünnen. In einer Verdünnungsreihe wurden elf Standards zu je 500 µl in TE-Puffer verdünnt mit 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 2·10⁴, 4·10³, 800, 160, 32 und 6,4 Molekülen/µl.

Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR. Die Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I durchgeführt. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Die Fluoreszenzintensität steigt daher im Laufe der PCR an, da immer mehr doppelsträngige DNA synthetisiert wird.

Je *well* wurde der in Tabelle 3-6 angegebene Ansatz pipettiert. Dafür wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix ohne cDNA erstellt, von dem in jedes *well* 20 µl vorgelegt wurden. Anschließend wurden in jedes *well* 5 µl der zuvor verdünnten cDNA, der Standards oder TE-Puffer als Negativkontrolle hinzugegeben. Die Versuche erfolgten in Duplikaten oder Triplets.

Tabelle 3-6: Ansatz und Bedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR.

SKA = Schmelzkurvenanalyse.

Ansatz	1x	PCR-Bedingungen		
<i>Power SYBR Green Mastermix</i>	12,5 µl	95°C	10 min	
Echtzeit-Oligonukleotid <i>forward</i> (10 µM)	0,75 µl	95°C	15 sec	40x
Echtzeit-Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	0,75 µl	60°C	1 min	
H ₂ O	6 µl	95°C	15 sec	
cDNA (4 ng/µl)	5 µl	60°C	1 min	
		60°C	+0,3°C/min	SKA
		95°C	15 sec	

Im Anschluss an jede Echtzeit-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um erneut die Qualität der Oligonukleotide beurteilen zu können und Artefakte wie Oligonukleotid-Dimere, Fehlpaarungen und Kontaminationen auszuschließen. Hierzu wurde die Temperatur kontinuierlich erhöht und die Veränderung der Fluoreszenz gemessen. Am Schmelzpunkt des PCR-Produkts trennen sich die DNA-Stränge und die Fluoreszenz sinkt abrupt ab, was in der Schmelzkurve durch ein starkes Maximum zu erkennen ist.

Auswertung der Echtzeit-PCR. Bei jedem Versuch wurde mit Cyclophilin ein sogenanntes Haushaltsgen mitgeführt, das unter allen Bedingungen im gleichen Maß exprimiert wurde. Diese Kontrolle wurde verwendet, um Abweichungen der eingesetzten Probe (z.B. durch Pipettierungenauigkeiten) zu normalisieren. Die durch die StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) errechneten Molekülmengen jeder Probe wurden daher zunächst durch den Wert von Cyclophilin geteilt. Anschließend wurde die relative Veränderung der mRNA-Expression (*Fold change*) berechnet, so dass alle Werte im Verhältnis zur Negativkontrolle (z.B. unbehandelte Zellen) standen.

3.2.7. Affymetrix-Microarray

Durch Microarrays kann die Genexpression global in einer Probe untersucht werden. In einem ersten Experiment sollten sie darüber Aufschluss geben, welche Gene durch die siRNA-vermittelte HDAC2-Herunterregulation differenziell exprimiert werden. Hierzu wurden MiaPaCa2- und Panc1-Zellen, wie unter 3.1.2 beschrieben, mit einer Kontroll- und einer HDAC2-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die

Zellen, wie unter 3.2.4 beschrieben, mit RLT-Puffer geerntet und die RNA mittels des *RNeasy Mini Kits* extrahiert. Nach einer Qualitätskontrolle durch eine Agarosegelelektrophorese (3.2.3) wurde die RNA durch Verwendung der zugehörigen Kits (*One-Cycle Target Labeling and Control Reagents*, vgl. *GeneChip Expression Analysis Manual*, Sektion 2) in Biotin-markierte cRNA umgewandelt. Hierzu wurden 5 µg der MiaPaCa2-RNA und 3,125 µg der Panc1-RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente dann als Matrize für eine *in vitro*-Transkription zur Synthese Biotin-markierter cRNA. Nach der spektrophotometrischen Bestimmung der RNA-Menge und der Qualitätskontrolle auf einem Agarosegel wurde die cRNA fragmentiert und auf den Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 hybridisiert. Die Detektion erfolgte durch die Zugabe eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des GeneChip Scanners 3000 gemessen wurde. Die Expressionsdaten wurden mittels der Microarray Suite 5.0 ausgewertet. Die Fragmentierung, Hybridisierung und Detektion der Proben sowie die Auswertung der Ergebnisse wurden von der Affymetrix *Core Facility* der Technischen Universität München durchgeführt.

Microarray-Daten von 53 murinen Pankreaskarzinomzelllinien lagen in den Laboren von PD Dr. Dieter Saur und PD Dr. Günter Schneider bereits vor (Isolierung der Zelllinien siehe 3.3.5). Anhand dieser Expressionsprofile konnte die Expression der HDACs 1-11 in den verschiedenen Zelllinien ermittelt werden.

Des Weiteren wurden Microarray-Daten von Ishikawa et al. (GEO *accession number*: GSE1542) verwendet, die von der Oncomine-Datenbank (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) abgerufen wurden. Diese Daten basieren auf Proben duktaler Adenokarzinome des Pankreas, die zytologisch in die Klassen I bis V eingeteilt worden waren (Ishikawa et al, 2005).

3.2.8. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mittels der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) kann eine Interaktion von Proteinen mit bestimmten DNA-Regionen nachgewiesen werden. So kann mit dieser Methode z.B. die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit der Promotorregion eines Gens gezeigt werden.

Vorbereitung der Proben. Für die ChIP wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und mit einer Kontroll- und einer *HDAC2*-spezifischen siRNA transfiziert, wie unter 3.1.2 beschrieben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd fixiert (finale Konzentration: 1%). Hierbei kommt es zu einer kovalenten Bindung zwischen DNA und Proteinen (*crosslinking*). Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von Glycin in einer finalen Konzentration von 125 mM, gefolgt von einer 3- bis 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und

die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 80 µl gekühltem PBS je *well* wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 2 Minuten bei 1.600 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Lyse. Das Zellsediment wurde zur Lyse in 600 µl L1-Puffer, der nach Angaben des Herstellers mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren (Roche Diagnostics) versetzt war, resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne isoliert, indem das resuspendierte Sediment dreimal mit einer 1 ml-Spritze (Kanüle Gr. 18) aufgezogen und jeweils wieder in das Reaktionsgefäß zurückgegeben wurde. Die Zellkerne wurden 2 Minuten bei 3.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, der nun das Zytoplasma enthielt, wurde verworfen. Die sedimentierten Zellkerne wurden in 600 µl L2-Puffer, der mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren versetzt war, resuspendiert und in zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße zu je 300 µl aufgeteilt.

Sonifizierung. Im Bioruptor-Ultraschallwasserbad erfolgte die Sonifizierung der Proben, um DNA-Fragmente von ca. 500 bp zu erhalten. Hierzu wurde das Wasserbad des Gerätes nach den Herstellerangaben mit gekühltem Wasser und Eis gefüllt und der Dreheinsatz komplett mit Reaktionsgefäßen gefüllt. Die Sonifizierung erfolgte insgesamt 13 Minuten lang, wobei auf 30 Sekunden Beschallung jeweils 30 Sekunden Pause folgten. Nach 7 Minuten wurde das Wasser erneuert, da es sich im Lauf der Ultraschallbehandlung erwärmte.

Nach dem Aufschluss wurden die Proben 15 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die zuvor aufgeteilten Proben wieder vereinigt.

Bestimmung der DNA-Konzentration und Verdünnung der Proben. Die Proben und der L2-Puffer wurden 1:20 mit bidestilliertem Wasser verdünnt, um im NanoDrop-Spektrophotometer die DNA-Konzentration bestimmen zu können.

Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 100 µg Chromatin mit Dilutionspuffer ad 500 µl in einem *Safe-Lock*-Reaktionsgefäß aufgefüllt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Als Kontrolle (*Input*) wurden 20 µg Chromatin mit Elutionspuffer ad 550 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

Zugabe des Antikörpers. Am nächsten Tag wurden die IP-Proben auf Eis aufgetaut und 120 µl Protein-A-Agarose zugegeben, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Proben wurden 2-4 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben eine Minute bei 800 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 5 µg Antikörper wurden die Proben über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert.

Bindung des Antikörpers an Protein-A-Agarose. Am nächsten Tag wurden 120 µl Protein-A-Agarose zu den Proben gegeben und die Proben 2-4 Stunden auf einem

Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Dies ermöglichte dem Antikörper, an die *Agarose-Beads* zu binden. Die *Beads* wurden anschließend eine Minute bei 800 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Es folgten Waschschritte mit je dreimal 700 µl Hochsalzpuffer, LiCl-Puffer und Niedrigsalzpuffer. Hier wurde der jeweilige Puffer zur Probe gegeben, die Reaktionsgefäße 3 Minuten auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert, dann eine Minute bei 800 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen.

Elution der DNA und Entfernung der Proteine. Nach dem letzten Waschschritt wurden 300 µl Elutionspuffer zu den *Beads* gegeben und die Proben nach kurzem Schütteln 15 Minuten bei 65°C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. 250 µl des Überstands wurden in ein neues *Safe-Lock*-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Daraufhin wurde zu den *Beads* nochmals 250 µl Elutionspuffer gegeben und ein zweites Mal für 15 Minuten bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden wiederum 2 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert, 300 µl des Überstands wurde mit dem ersten Eluat vereinigt. Schließlich wurden die IP- und *Input*-Proben mit 30 µl 5 M NaCl versetzt und über Nacht bei 65°C im Thermoschüttler inkubiert. Zur Entfernung der am Chromatin fixierten Proteine wurden am nächsten Tag 2 µl Proteinase K zugegeben und die Proben 2 Stunden bei 45°C inkubiert.

DNA-Extraktion und -Fällung. Die Proben wurden in neue *Phase-Lock-Gel*-Reaktionsgefäße überführt, mit 600 µl Phenol/Chloroform versetzt und auf dem Vortex geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C. Von der oberen, wässrigen Phase wurden 530 µl abgenommen und in ein neues *Phase-Lock-Gel*-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 530 µl Chloroform hinzugegeben und erneut 5 Minuten zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 470 µl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung mit 47 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol p.a. aufgefüllt. Zugegeben wurden außerdem 2 µl tRNA als *Tracer*. Die Reaktionsgefäße wurden für mindestens 30 Minuten bei -20°C aufbewahrt, dann 20 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Sediment wurden 300 µl 70%iger Ethanol gegeben und die Proben 60 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die *Input*-Proben wurden in 50 µl TE-Puffer, die IP-Proben in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst, dann bei -20°C gelagert.

PCR und Agarosegel. Es folgte die Quantifizierung der zu untersuchenden Chromatinbereiche durch PCR. Hierzu wurde ein Ansatz von 50 µl verwendet, der 25 µl *REDTaq ReadyMix*, je 1 µl Oligonukleotid *forward* und *reverse* (10 µM) und 1 µl der *Input*-Proben bzw. 5 µl der IP-Proben enthielt. Die verwendeten Oligonukleotide umfassten die

Promotorregion der untersuchten Gene. Um im semiquantitativ bestimmbaren Bereich der PCR zu bleiben, wurden lediglich 28-38 Zyklen des folgenden Programms verwendet:

	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	28-38x
Hybridisierung	56°C <i>NOXA</i> , 60°C <i>GAPDH</i>	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
	72°C	10 min	

Schließlich wurden 30 µl der *Input*-PCR-Proben und 40 µl der *IP*-PCR-Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen und 1,5 Stunden bei 110 V aufgetrennt. Banden zeigten die Bindung des untersuchten Proteins an die jeweilige Promotorregion an.

3.3. *In vivo*-Methoden

3.3.1. *Haltung der Mäuse*

Alle Mäuse wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich gezüchtet und gehalten. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und nach Standards der *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) durchgeführt.

3.3.2. *Mauslinien*

Zur gewebespezifischen Deletion bestimmter Gene oder Expression mutierter Allele wurde das konditionale Cre/loxP-System verwendet. Hierbei wird die Fähigkeit der Cre-Rekombinase genutzt, sogenannte loxP-Sequenzen zu erkennen und dort die DNA zu rekombinieren. Die DNA wird dabei an zwei loxP-Sequenzen geschnitten, und der dazwischenliegende Bereich wird deletiert, so dass eine loxP-Sequenz zurückbleibt (Jonkers & Berns, 2002; Sauer, 1998).

Die gezielte Deletion bestimmter Exons erfolgte durch die Verpaarung von Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen mit Mäusen, die loxP-flankierte Exons enthielten (vgl. *Hdac2*^{loxP}-Mäuse). Daneben wurden Tiere mit mutierten Allelen verwendet, die 5' des mutierten Gens ein transkriptionelles Stop-Element enthielten, das von loxP-Sequenzen flankiert war (loxP-Stop-loxP; LSL) (Hingorani et al, 2003). In diesen Tieren wurde das mutierte Allel nicht exprimiert, so dass diese Mäuse heterozygot für das Wildtypallel waren. Durch Kreuzen mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen wurde bei den Nachkommen die Stopkassette deletiert und das mutierte Allel damit aktiviert (vgl. *LSL-Kras*^{G12D}; *LSL-Trp53*^{R172H}; *LSL-R26*^{Tva-lacZ}).

Alle Tiere wiesen einen gemischten genetischen Hintergrund (129/Sv / C57BL/6) auf.

***Ptf1a/p48*^{Cre/+} (Nakhai et al, 2007)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hassan Nakhai (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München). *Ptf1a/p48*^{Cre/+}-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem *Ptf1a* (*pancreas specific transcription factor, 1a*)-Promotor, der spezifisch in pankreatischen Vorläuferzellen und im exokrinen und endokrinen Pankreas aktiv ist. Die Cre-Rekombinase wird zudem in Neuronen der Retina, im Cerebellum und dem dorsalen Neuralrohr exprimiert (Nakhai et al, 2007).

***Hdac2*^{loxP} (Montgomery et al, 2007)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Eric Olson, Ph.D. (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA) zur Verfügung gestellt. *Hdac2*^{loxP}-Mäuse weisen loxP-Sequenzen 5' von Exon 2 und 3' von Exon 4 der Histondeacetylase 2 (HDAC2) auf.

***LSL-Kras*^{G12D} (Hingorani et al, 2003; Jackson et al, 2001)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Tyler Jacks, Ph.D. (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). *LSL-Kras*^{G12D}-Mäuse weisen im *Kras*-Gen eine im humanen Pankreaskarzinom häufig auftretende Mutation auf (Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 12 des ersten kodierenden Exons), die nach Deletion der Stopkassette die GTPase-Aktivität beeinträchtigt und zu einer konstitutiven Aktivierung der Ras-Signalwege führt (Hingorani et al, 2003).

***LSL-Trp53*^{R172H} (Hingorani et al, 2005; Olive et al, 2004)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Tyler Jacks, Ph.D. (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). *LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse weisen eine *missense* Mutation (Arginin zu Histidin in Kodon 172) auf, die häufig in spontanen humanen Tumoren sowie bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom in Kodon 175 beobachtet wurde (Olive et al, 2004). Diese Mutation führt nach Deletion der Stopkassette zur Expression eines dominant negativen onkogenen p53-Proteins (de Vries et al, 2002; Liu et al, 2000).

***LSL-R26*^{Tva-lacZ} (Seidler et al, 2008)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde in der Gruppe von PD Dr. Dieter Saur (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) generiert. Sie zeichnet sich durch die bicistronische Expression des endogen nur von Geflügelzellen exprimierten *tumor virus A* (*Tva*)-Rezeptors und nuklearem LacZ (β -Galaktosidase) unter dem ubiquitären *Rosa26*-Promotor aus. Durch den *Tva*-Rezeptor können die Zellen dieser Mäuse mit dem *replication-competent avian*

sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with splice acceptor (RCAS)-Virus infiziert werden. Eine Auswirkung dieses Allels auf die Tumorprogression des Pankreas oder das Überleben der Mäuse wurde bisher nicht beobachtet (unveröffentlichte Daten PD Dr. Dieter Saur).

3.3.3. Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, dann ca. 2 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgetrennt und in ein 0,65 ml-Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Ätztift wurden Blutungen gestoppt. Außerdem wurden die Tiere am Ohr durch Ausstanzen von Löchern und Halblöchern mit einem Nummerncode versehen.

Für die Lyse der Schwanzstücke wurde zunächst Proteinase K 1:50 in PCR-Lysepuffer verdünnt, dann 50 µl zu jedem Schwanzstück gegeben. Die Lyse erfolgte in einer PCR-Maschine mittels des folgenden Programms:

55°C 1 h 30 min

95°C 15 min

Nach der Lyse wurden die Proben kurz auf dem Vortex geschüttelt, dann 10 Minuten bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in *8-Strip*-PCR-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Die PCRs wurden nach den in Tabelle 3-7 angegebenen Schemata pipettiert und in den PCR-Maschinen programmiert. 20 µl jedes PCR-Produkts wurden auf ein 1,5-2%iges Agarosegel in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid aufgetragen und 1,5 Stunden bei 110 V aufgetrennt.

Tabelle 3-7: Genotypisierungs-PCRs – Ansätze, Bedingungen und erwartete Bandengrößen.

WT = Wildtyp-Allel; Mut = mutiertes Allel; Gabra = interne Kontrolle.

Bezeichnung	Ansatz	1x	PCR-Bedingungen	Erwartete Banden
<i>Hdac2</i> ^{loxP} WT	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	450 bp (WT) 290 bp (Gabra)
	HDAC2-loxP WT FW	0,72 µl	95°C 45 sec	
	HDAC2-loxP RV	0,72 µl	60°C 45 sec	
	Gabra1-UP	0,72 µl	72°C 1 min 30 sec	
	Gabra1-LP	0,72 µl	72°C 10 min	
	H ₂ O	10,92 µl		
	DNA	1,2 µl		
<i>Hdac2</i> ^{loxP} Mut	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	450 bp (Mut) 290 bp (Gabra)
	HDAC2-loxP Mut FW	0,72 µl	95°C 45 sec	
	HDAC2-loxP RV	0,72 µl	60°C 45 sec	
	Gabra1-UP	0,72 µl	72°C 1 min 30 sec	
	Gabra1-LP	0,72 µl	72°C 10 min	
	H ₂ O	10,92 µl		
	DNA	1,2 µl		

Bezeichnung	Ansatz	1x	PCR-Bedingungen	Erwartete Banden
<i>Ptf1a/p48^{Cre}</i>	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	600 bp (WT) 400 bp (Mut)
	p48-Cre-GT-LP-URP	1,14 µl	95°C 45 sec	
	p48-Cre-GT-wt-UP	0,9 µl	60°C 1 min	
	p48-Cre-GT-mut-UP-neu	0,3 µl	72°C 1 min 30 sec	
	DMSO	1,5 µl	72°C 10 min	
	H ₂ O	9,96 µl		
	DNA	1,2 µl		
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	270 bp (WT) 170 bp (Mut)
	Kras-WT-UP1	0,9 µl	95°C 45 sec	
	Kras-URP-LP1	1,08 µl	55°C 1 min	
	KrasG12Dmut UP	0,36 µl	72°C 1 min 30 sec	
	H ₂ O	11,46 µl	72°C 10 min	
	DNA	1,2 µl		
<i>LSL-Trp53^{R172H}</i>	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	570 bp (WT) 270 bp (Mut)
	Trp53R172H-WT-UP2	0,72 µl	95°C 30 sec	
	Trp53R172H-URP-LP	0,96 µl	60°C 30 sec	
	p53R172H-mut UP4	0,48 µl	72°C 1 min	
	H ₂ O	11,64 µl	72°C 10 min	
	DNA	1,2 µl		
<i>LSL-R26^{Tva-lacZ}</i>	<i>REDTaq ReadyMix</i>	15 µl	95°C 3 min	600 bp (WT) 310 bp (Mut)
	R26-Tva-GT-UP	0,36 µl	95°C 45 sec	
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	0,24 µl	62°C 1 min	
	R26-Tva-GT-WT-LP	0,6 µl	72°C 1 min 30 sec	
	H ₂ O	12,6 µl	72°C 10 min	
	DNA	1,2 µl		

3.3.4. Töten der Tiere und Organentnahme

Alle Tiere wurden in einer Isoflurankammer betäubt und durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 70% Ethanol wurden die Organe entnommen, in PBS gewaschen und 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Entwässerung erfolgte über Nacht in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten. Anschließend wurden die Organe in Paraffinblöcke eingegossen.

3.3.5. Zellisolation aus Pankreastumoren

Bei Vorhandensein eines Pankreastumors wurde direkt nach der Organentnahme ein ca. 0,5 cm³ großes Stück steril abgetrennt und in sterilem PBS bis zur weiteren Verwendung gelagert. Es wurde unter einer Sterilwerkbank in eine neue Petrischale überführt und mit Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke zerschnitten. Diese wurden in Medium, supplementiert mit 200 U/ml Collagenase, überführt und in einem 50 ml-Röhrchen bis zu 48 Stunden bei

37°C in einem Wasserbad inkubiert. In dieser Zeit wurden die Gewebestücke auch mechanisch durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zerkleinert. Sobald keine großen Stücke mehr sichtbar waren, wurden die Zellen 10 Minuten bei 1.000 rpm abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte analog zur bereits beschriebenen Vorgehensweise unter 3.1.1.

3.3.6. Anfertigung von Paraffinschnitten

Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke mindestens 30 Minuten bei -20°C vorgekühlt. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 3,5 µm an einem Mikrotom angefertigt. Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Schnitte zur Glättung in ein auf 37-50°C erhitztes Wasserbad transferiert, dann wurden sie durch Hineintauchen des Objektträgers auf den Objektträger gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.3.7. HE-Färbung

Die getrockneten Paraffinschnitte (vgl. 3.3.6) wurden zunächst zweimal 5 Minuten in Roti-Histol inkubiert, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2x 100%, 2x 98% und 2x 80% Ethanol; jeweils 3 Minuten). Nach einer Minute Inkubation in bidestilliertem Wasser wurden die Schnitte bis zu 5 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung getaucht, 10 Minuten unter Leitungswasser gespült und dann ca. 20 Sekunden in Eosin gegengefärbt. Nach einer kurzen Inkubation in bidestilliertem Wasser wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2x 80%, 2x 96% und 2x 100% Ethanol) dehydriert. Nach zweimal 5 Minuten in Roti-Histol wurden sie mit Pertex eingedeckt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte eine mikroskopische Analyse.

3.3.8. Immunhistochemie (IHC)

Die Gewebe-Microarrays mit humanen Proben von normalem Pankreas sowie duktalem Adenokarzinomen des Pankreas sowie die Gewebeschnitte von murinen Proben wurden entparaffinisiert und rehydriert, wie unter 3.3.7 beschrieben. In einer Mikrowelle wurden dann mittels *Antigen Unmasking Solution* 10 Minuten bei 600 W die Antigene demaskiert. Nach 20 Minuten Abkühlen wurde die Lösung gegen PBS ersetzt, die Schnitte in die Färbestation überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Um endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, wurden die Schnitte im Dunkeln 10 Minuten in 3% H₂O₂ inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen (3x PBS) und mit 5% Serum in PBS mit Avidin für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS

wurde der primäre Antikörper HDAC2, 1:100 verdünnt in PBS mit 5% Serum und Biotin, auf den Schnitten über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre, biotinylierte Antikörper 1:500 mit PBS/5% Serum verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Nach erneutem Waschen wurde die *VECTASTAIN Elite ABC solution* hinzugegeben und nach 30 Minuten durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Schließlich wurden die Schnitte 3 bis 5 Minuten mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) inkubiert, bis eine Braunfärbung sichtbar war. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und eingedeckt, wie unter 3.3.7 beschrieben. Die HDAC2-Expression im normalen Gewebe und in den duktalem Adenokarzinomen wurde von drei Untersuchern (Petra Fritsche, PD Dr. Dieter Saur und PD Dr. Günter Schneider) unabhängig quantifiziert. Dabei wurden fünf Gesichtsfelder bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Ein finaler Wert, der sogenannte *Score* (0-300), wurde errechnet durch die Multiplikation der Prozentzahl HDAC2-gefärbter Nuklei (0-100%) mit der Färbeintensität (1: schwach; 2: mäßig; 3: stark).

3.4. Statistische Analysen

Alle Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten reproduziert. Die Zellkultur-Assays wurden zudem stets im Triplet durchgeföhrt. Abbildungen und statistische Analysen wurden durch das Programm GraphPad Prism4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Um statistische Signifikanzen zu errechnen, wurde ein zweiseitiger Student t-test verwendet, p-Werte sind in den Abbildungen angegeben ($p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**), $p < 0,001$ (***)). IC_{50} -Werte wurden mittels GraphPad Prism4 mit einem nicht-linearen Regressionsmodell errechnet.

4. Ergebnisse

4.1. HDAC2 wird im duktalem Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert

Um die Expression von HDAC2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu untersuchen, wurden humane Gewebe-Microarrays immunhistochemisch für HDAC2 angefärbt (Abbildung 4-1).

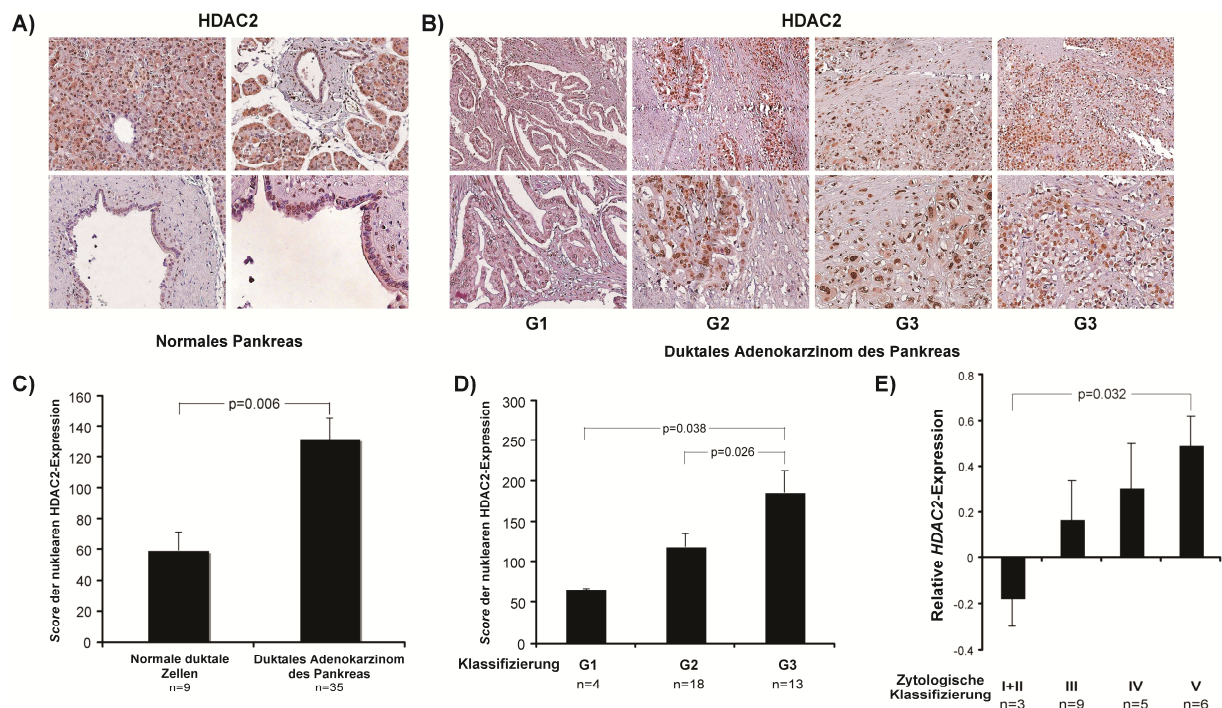


Abbildung 4-1: HDAC2 wird im duktalem Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert.

A) Immunhistochemische Färbung von HDAC2 in normalem Pankreasgewebe. **B)** Immunhistochemische Färbung von HDAC2 in gut (G1), mäßig (G2) und undifferenzierten (G3) duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Vergrößerung oben 100x, unten 200x. **C)** Score der nuklearen HDAC2-Expression in normalen duktalem Zellen und im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. **D)** Score der nuklearen HDAC2-Expression in gut (G1), mäßig (G2) und undifferenzierten (G3) duktalem Adenokarzinom des Pankreas. **E)** Microarray-Daten von Ishikawa et al. (GEO accession number: GSE1542) wurden der Oncomine-Datenbank entnommen. Die HDAC2-Expression wurde nach der zytologischen Klassifizierung auf einer logarithmischen Achse aufgetragen.

Im normalen Pankreas konnte nukleares HDAC2 in den Acini und den Langerhans-Inseln detektiert werden (Abbildung 4-1A). Duktale Zellen kleiner Pankreasgänge wiesen keine Färbung auf (Abbildung 4-1A, oben links), wohingegen einige Nuklei duktalem Zellen mittlerer (Abbildung 4-1A, oben rechts) und großer Pankreasgänge (Abbildung 4-1A, unten) schwach gefärbt waren. Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte eine starke Färbung der Nuklei beobachtet werden, vor allem in mäßig differenzierten und undifferenzierten Tumoren (Abbildung 4-1B). Die Quantifizierung der nuklearen HDAC2-Expression zeigte, dass HDAC2 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas 2,2-fach höher exprimiert war als in normalen Duktalen (Abbildung 4-1C). Am stärksten war HDAC2 dabei in G3-Tumoren exprimiert

(3,1-fache Expression; Abbildung 4-1D). Um diese Daten zu validieren, wurden Microarray-Daten von Ishikawa et al. (Ishikawa et al, 2005) analysiert (Abbildung 4-1E). Auch hier konnte eine Zunahme der *HDAC2*-mRNA-Expression mit dem Anstieg der zytologischen Klasse festgestellt werden, mit der höchsten Expression von *HDAC2* im duktalem Adenokarzinom (Klasse V).

4.2. HDAC2 wird für Viabilität und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nicht benötigt

Um die Funktion von *HDAC2* *in vitro* untersuchen zu können, wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und Panc1 mit einer *HDAC2*-spezifischen siRNA transfiziert. Abbildung 4-2A zeigt die siRNA-vermittelte Herunterregulation von *HDAC2* 48 und 72 Stunden nach der Transfektion von MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit einer *HDAC2*-spezifischen siRNA. Die Expression von *HDAC1* wurde durch die Transfektion nicht beeinträchtigt, was die Spezifität der siRNA belegt. Allenfalls eine leichte Zunahme der *HDAC1*-Expression ist festzustellen, was auf Kompensationsmechanismen zurückzuführen sein könnte.

Zur Bestimmung der Viabilität *HDAC2*-depletierter Zellen wurden MTT-Assays durchgeführt. Weder 48 noch 72 Stunden nach der Transfektion konnte im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikante Reduktion der Viabilität festgestellt werden (Abbildung 4-2B). Auch war die BrdU-Inkorporation 48 und 72 Stunden nach der Transfektion der *HDAC2*-siRNA in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen nicht signifikant verändert (Abbildung 4-2C). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass der Verlust von *HDAC2* in Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich Viabilität und Proliferation kompensiert werden kann.

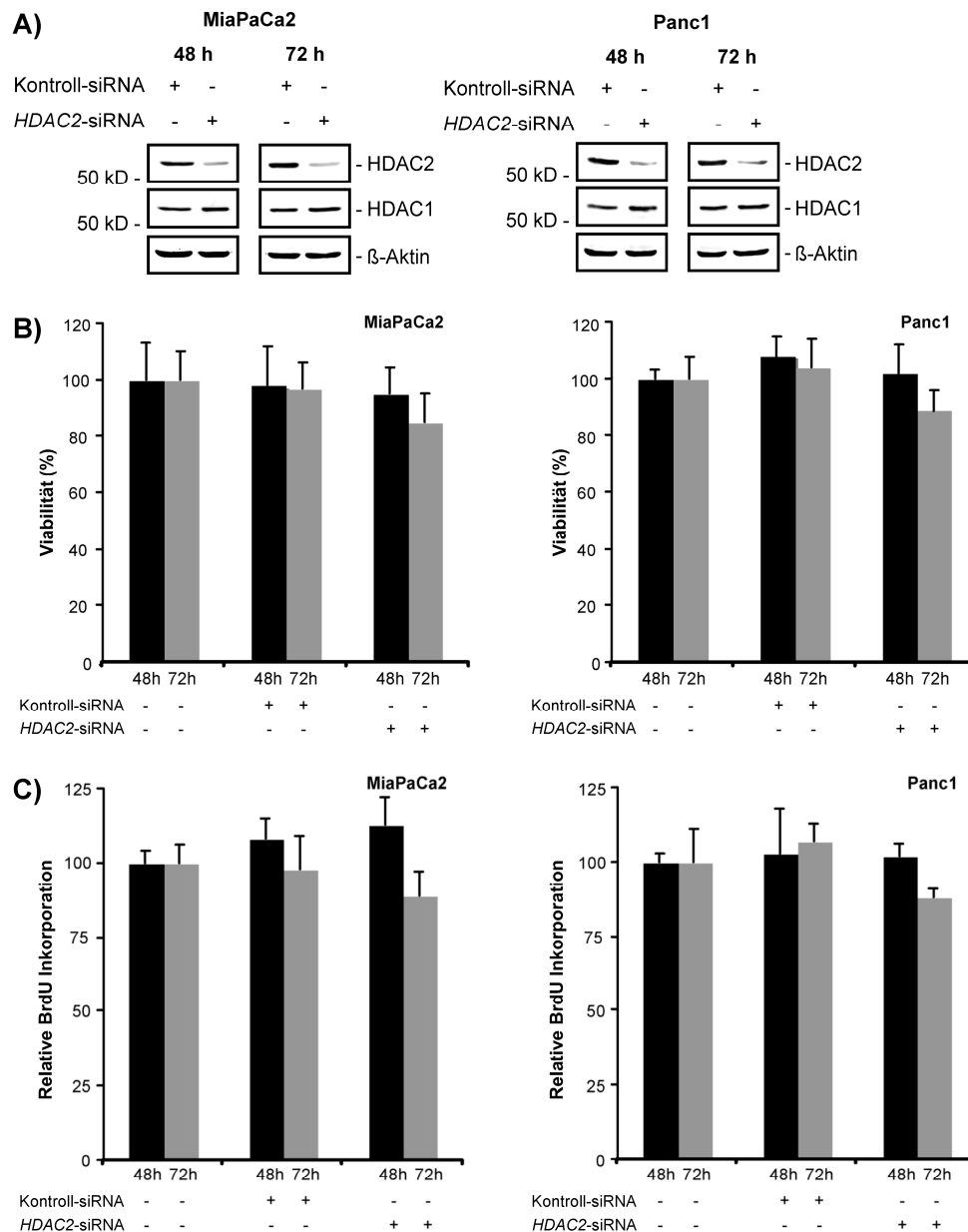


Abbildung 4-2: HDAC2 wird für die Viabilität und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nicht benötigt.

A) Western Blot-Analyse von HDAC2 und HDAC1 48 und 72 Stunden nach der Transfektion von MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs. **B)** MTT-Assays und **C)** BrdU-Assays von MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

4.3. Die HDAC2-Herunterregulation sensitiviert gegenüber Etoposid

Da HDACs zur therapeutischen Resistenz von Krebszellen beitragen (Glozak & Seto, 2007), wurde die Sensitivität von MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit verminderter HDAC2-Expression gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika untersucht. Zunächst wurden die Zellen nach der siRNA-Transfektion mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid behandelt. Wie in Abbildung 4-3A zu sehen ist, konnte in Hoechst-Färbungen 24 Stunden nach der Behandlung ein dosisabhängiger, signifikant erhöhter Anteil apoptotischer Zellen beobachtet

werden, wenn die Expression von HDAC2 in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen durch RNA-Interferenz vermindert war. Ebenso waren Viabilität und IC₅₀-Werte HDAC2-depletierter Zellen 48 Stunden nach der Etoposid-Behandlung signifikant reduziert (Abbildung 4-3B und C).

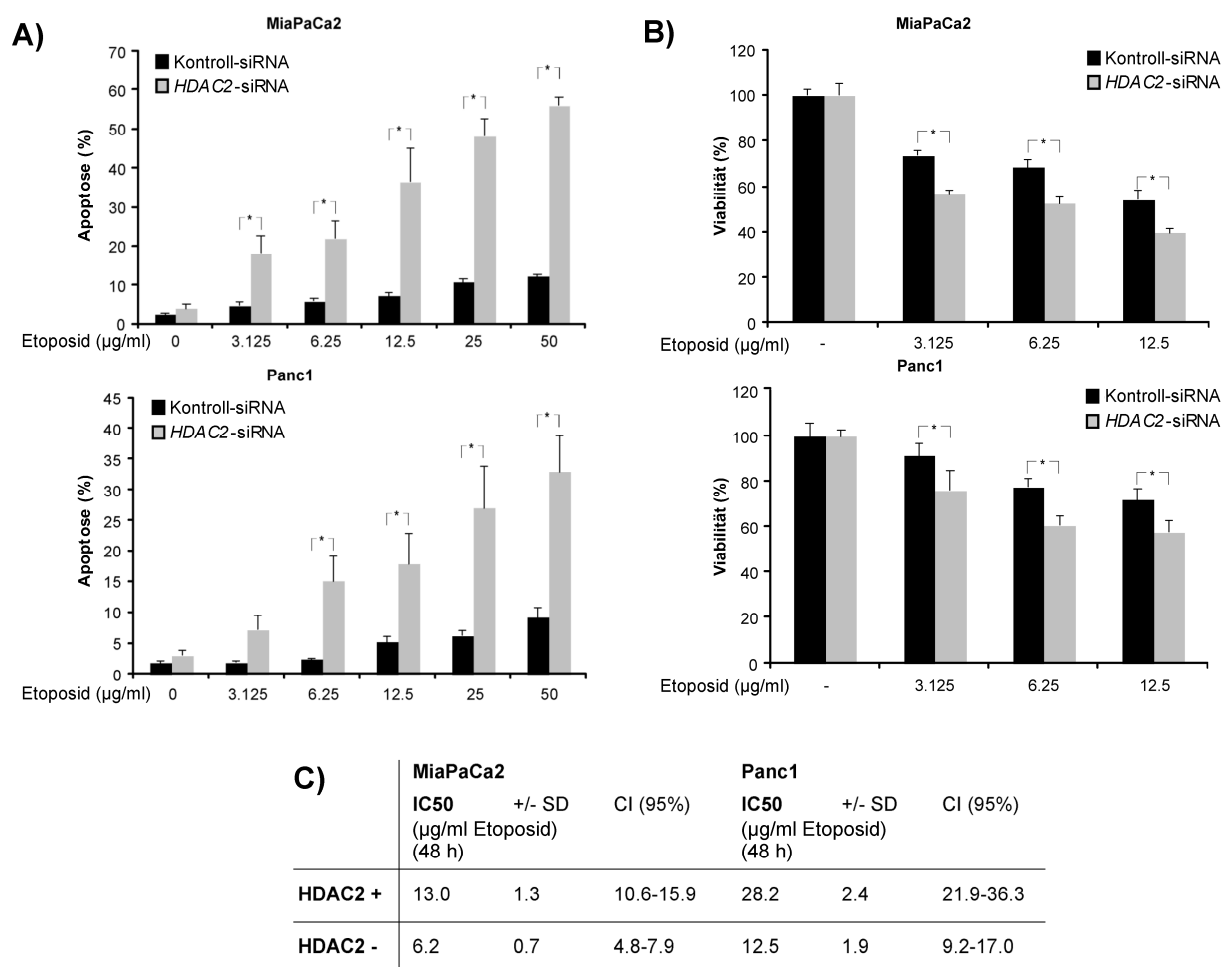


Abbildung 4-3: HDAC2-Herunterregulation sensitiviert gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Etoposid behandelt. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mittels des Hoechst-Farbstoffs durch Fluoreszenzmikroskopie. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Etoposid behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **C)** IC₅₀-Werte der in B) abgebildeten MTT-Assays.

Die erhöhte Sensitivität von MiaPaCa2- und Panc1-Zellen wurde in Caspase-3/7-Assays verifiziert. Wie in Abbildung 4-4A zu sehen ist, stieg die Caspase-Aktivität in Zellen mit herunterreguliertem HDAC2 nach Behandlung mit Etoposid in einer dosisabhängigen Weise signifikant an. Die erhöhte Caspase-Aktivität korrelierte in HDAC2-depletierten und mit Etoposid behandelten Zellen mit einer verstärkten Spaltung des Caspase-Substrates PARP (Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase) (Abbildung 4-4B).

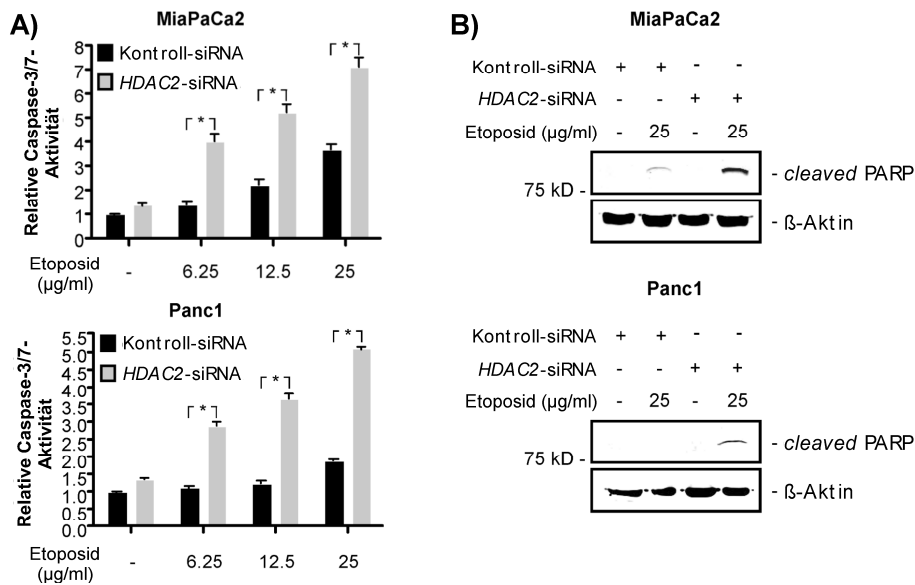


Abbildung 4-4: In HDAC2-depletierten Zellen führt die Behandlung mit Etoposid zu einer gesteigerten Aktivierung von Caspasen.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Etoposid behandelt. Die Caspase-Aktivität wurde durch Caspase-3/7-Assays bestimmt. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 25 µg/ml Etoposid behandelt. Der gezeigte *cleaved* PARP Western Blot dient als indirektes Maß für die Caspase-Aktivität.

Eine ähnliche Sensitivierung gegenüber Etoposid konnte auch in mit *HDAC2*-siRNA behandelten DanG- und BxPc3-Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-5), was einen Hinweis auf einen generellen Mechanismus in Pankreaskarzinomzellen gibt.

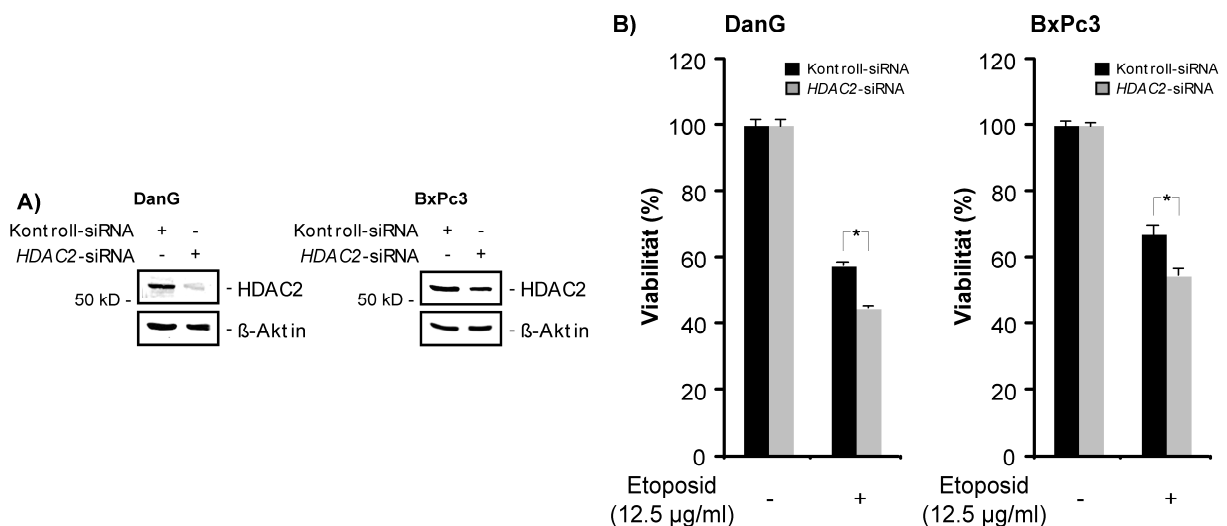


Abbildung 4-5: Die HDAC2-Herunterregulation in DanG- und BxPc3-Zellen führt zu einer Sensitivierung gegenüber Etoposid.

A) Western Blot-Analyse von *HDAC2* 48 Stunden nach der Transfektion von DanG- (links) und BxPc3-Zellen (rechts) mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs. **B)** DanG- und BxPc3-Zellen wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit 12,5 µg/ml Etoposid behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt.

Der sensitivierende Effekt war HDAC2-Isoenzym-spezifisch, da die siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC1 in Kombination mit einer Etoposid-Behandlung zu keiner erhöhten Apoptoseinduktion führte (Abbildung 4-6).

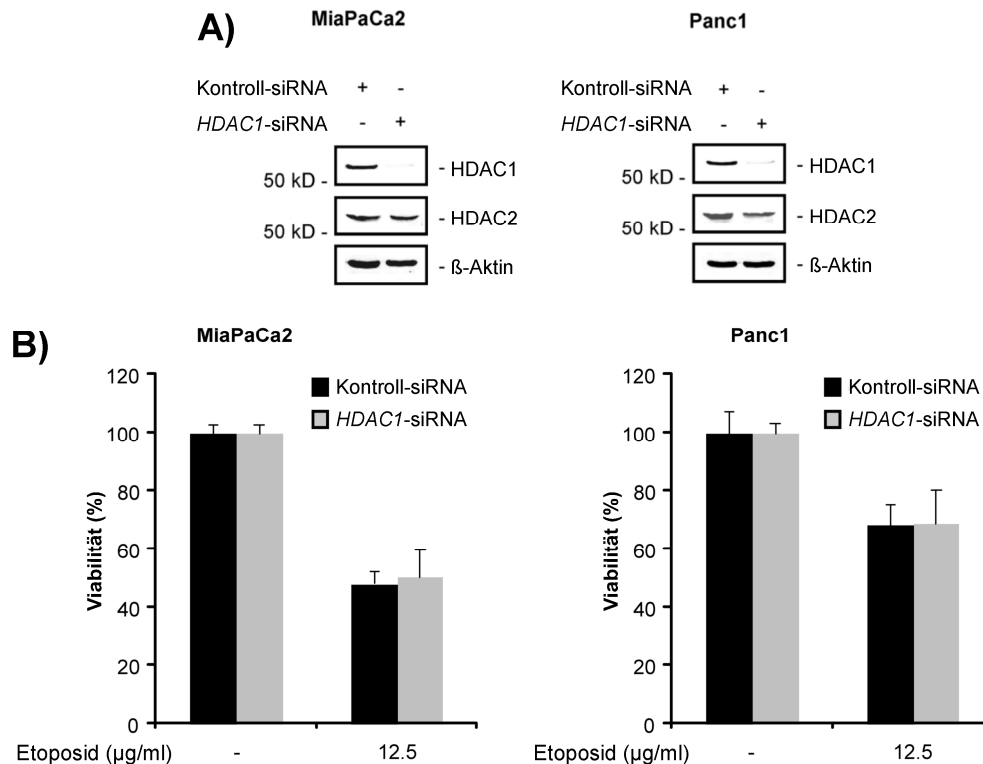


Abbildung 4-6: Die Herunterregulation von HDAC1 hat keinen sensitivierenden Effekt gegenüber Etoposid.

A) Western Blot-Analyse von HDAC1 und HDAC2 48 Stunden nach der Transfektion von MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) mit Kontroll- oder HDAC1-spezifischen siRNAs. **B)** MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) wurden mit Kontroll- oder HDAC1-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit 12,5 µg/ml Etoposid behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt.

4.4. VPA sensitiviert gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose

Um die mittels RNA-Interferenz erhaltenen Daten zu verifizieren, wurde Valproinsäure (VPA) verwendet, das ein Klasse I-spezifischer HDACi ist (Göttlicher et al, 2001). Außerdem induziert VPA die Expression der E2-Konjugase Ubc8 und führt dadurch zum proteasomalen Abbau von HDAC2 (Krämer et al, 2003). In der Tat führte in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen die VPA-Behandlung zur Depletion von HDAC2 (Abbildung 4-7A). Bei Verwendung einer VPA-Konzentration von 1,5 mM, einer Konzentration, die auch bei Menschen in Therapien gemessen werden kann, konnte bis zu 72 Stunden nach Beginn der Behandlung keine Reduktion der Proliferation und Viabilität bei den verwendeten Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden (Abbildung 4-7B und C).

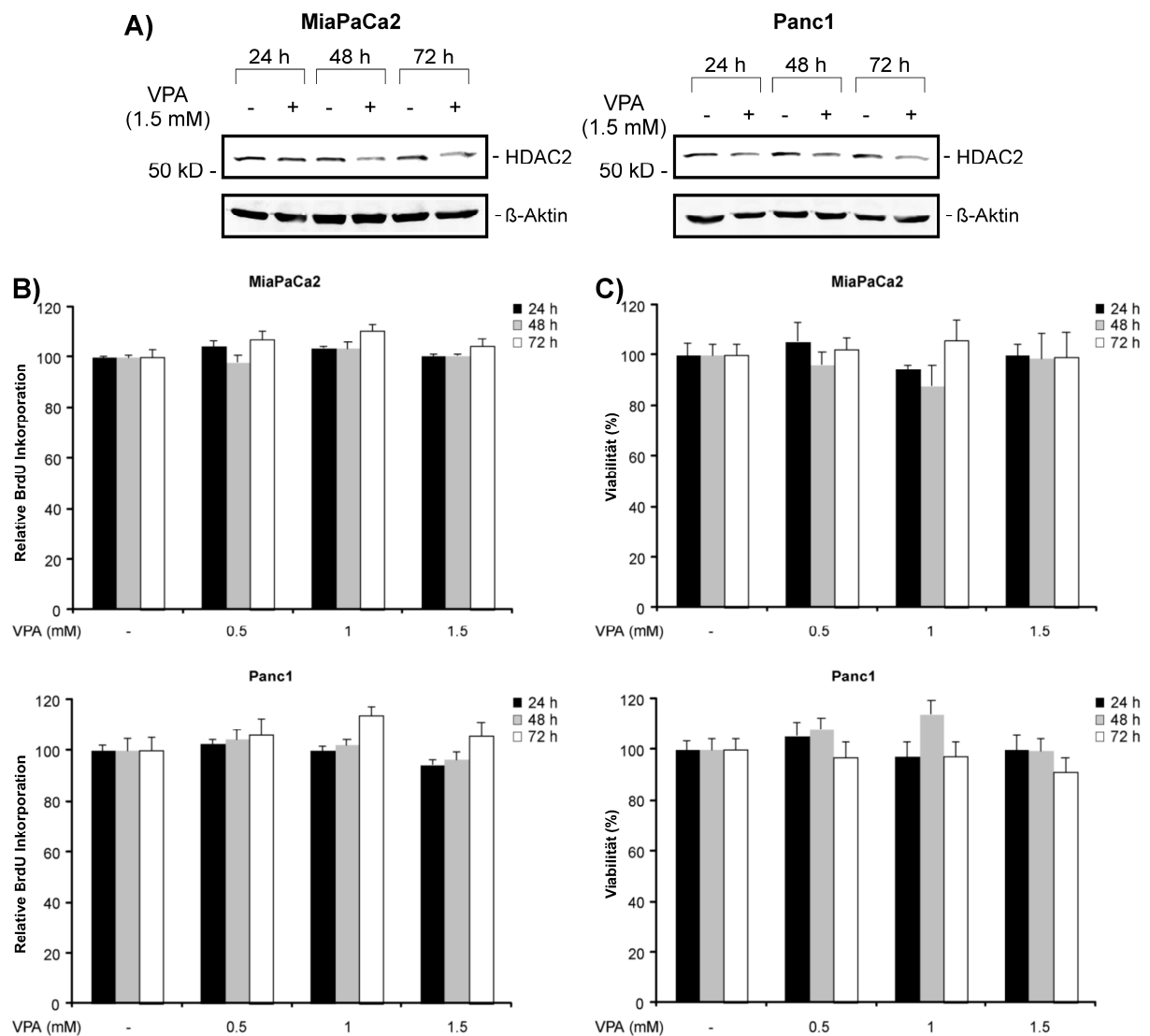


Abbildung 4-7: Die VPA-Behandlung von Pankreaskarzinomzellen beeinträchtigt nicht Proliferation oder Viabilität.

A) Western Blot-Analyse von HDAC2 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung von MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) mit 1,5 mM VPA. **B)** BrdU-Assays und **C)** MTT-Assays von MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen von VPA.

Wie bei den durch RNA-Interferenz HDAC2-depletierten Zellen, sensitivierte auch VPA die Zellen gegenüber Etoposid (Abbildung 4-8). So war der Anteil apoptotischer Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit VPA und Etoposid im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Etoposid signifikant erhöht (Abbildung 4-8A). Auch konnte in MTT-Assays bei gleichzeitiger Behandlung mit VPA und Etoposid für 72 Stunden eine signifikante Reduktion der Viabilität beobachtet werden (Abbildung 4-8B). In Caspase-3/7-Assays führte die alleinige Behandlung mit Etoposid zu einer 4,6-fach höheren Caspase-Aktivität in MiaPaCa2-Zellen und zu einer 3,1-fach höheren Caspase-Aktivität in Panc1-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 4-8C). Diese Caspase-Aktivierung wurde signifikant verstärkt, wenn die Zellen zudem mit VPA behandelt wurden (7,5-fach in MiaPaCa2-, 5,1-fach in Panc1-Zellen).

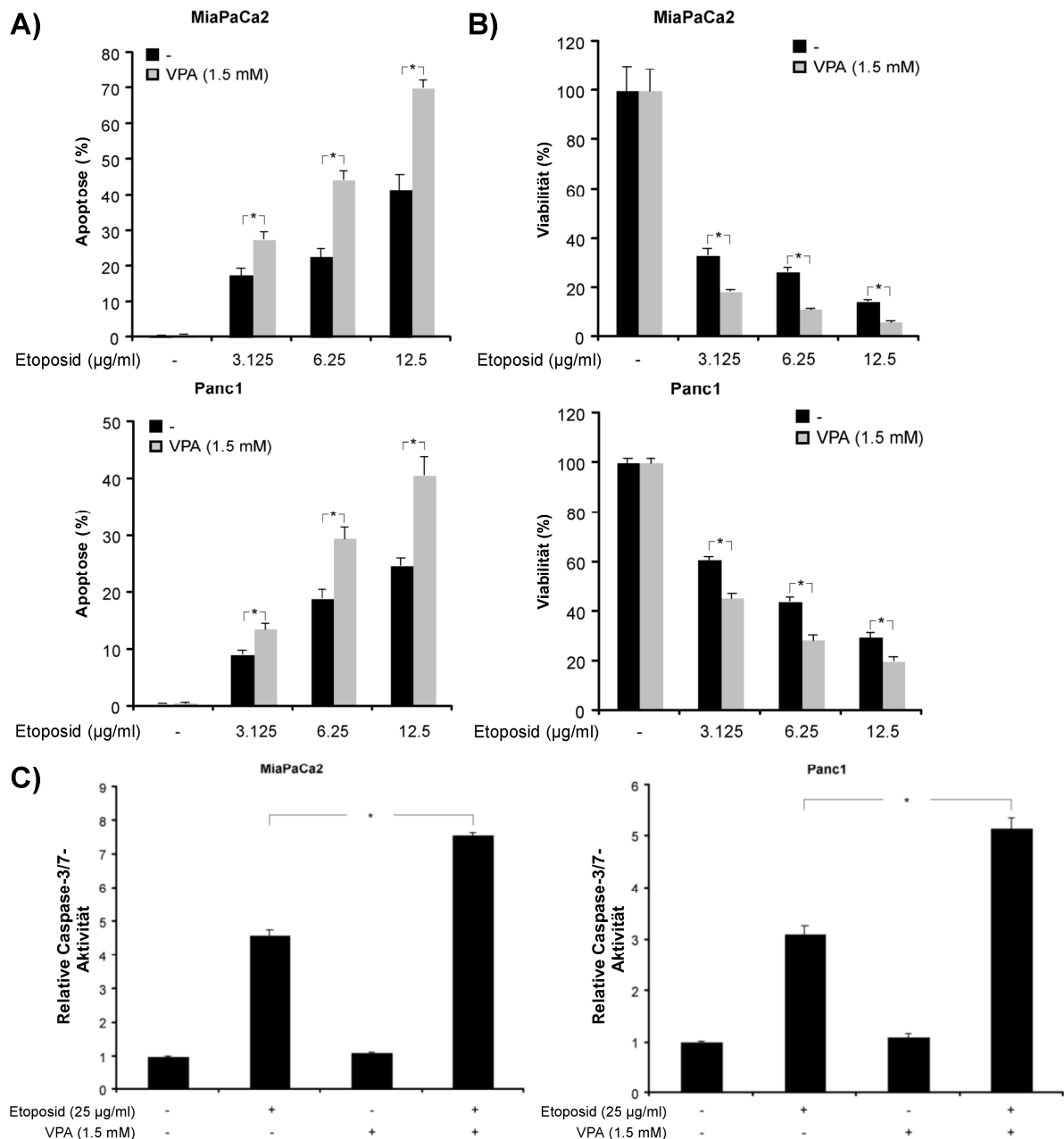


Abbildung 4-8: Die gleichzeitige Behandlung mit VPA und Etoposid führt zur erhöhten Induktion von Apoptose in Pankreaskarzinomzellen.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden, wie angegeben, 48 Stunden mit VPA und Etoposid behandelt. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mittels des Hoechst-Farbstoffs durch Fluoreszenzmikroskopie. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden, wie angegeben, 72 Stunden mit VPA und Etoposid behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **C)** MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) wurden, wie angegeben, 24 Stunden mit VPA und Etoposid behandelt. Die Caspase-Aktivität wurde durch Caspase-3/7-Assays bestimmt.

4.5. HDAC2-Herunterregulation und -Inhibition führen nicht zu einer Sensitivierung gegenüber Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin

Um zu überprüfen, ob die HDAC2-Depletion auch gegenüber anderen Chemotherapeutika eine sensitivierende Wirkung bezüglich der Apoptose hat, wurden die Zellen nach HDAC2-

Herunterregulation durch siRNA oder HDAC2-Inhibition durch VPA mit Gemcitabin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Oxaliplatin behandelt.

Zunächst wurde Gemcitabin verwendet, das routinemäßig als Zytostatikum bei duktalem Adenokarzinomen des Pankreas verabreicht wird. Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin) ist ein Nukleosid aus Cytosin und einer difluorierten Desoxyribose. Durch den Einbau in die DNA wird die DNA-Synthese unterbrochen und es kommt zur Apoptose der Zellen. Tatsächlich konnte in MTT-Assays bei der alleinigen Behandlung von MiaPaCa2-Zellen mit Gemcitabin eine ca. 40%ige und bei Panc1-Zellen eine 20-30%ige Reduktion der Viabilität beobachtet werden (Abbildung 4-9A und B). In Kombination mit VPA oder einer HDAC2-spezifischen siRNA konnte die Viabilität jedoch nicht weiter erniedrigt werden.

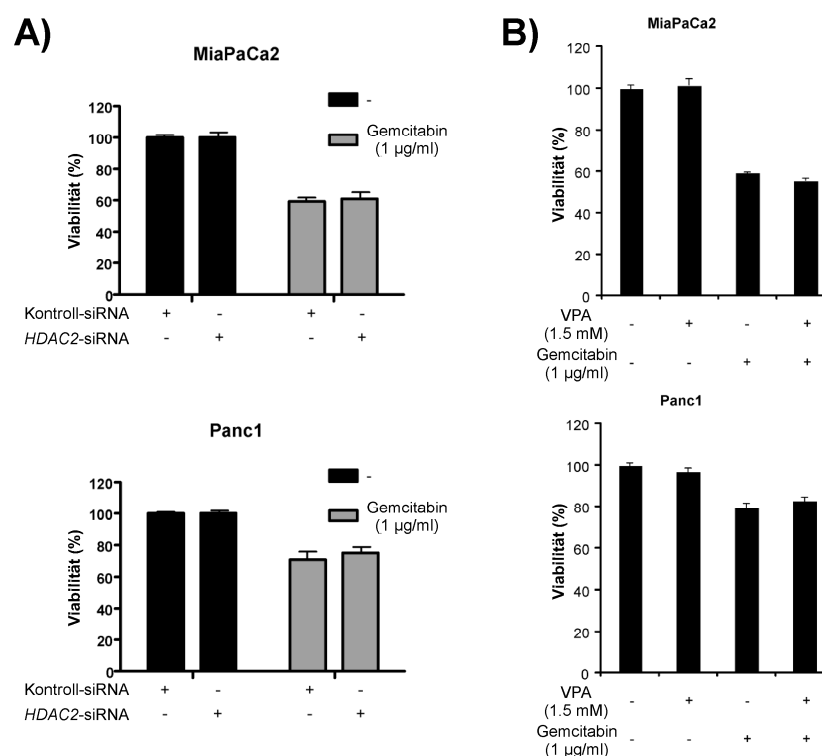


Abbildung 4-9: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber Gemcitabin-vermittelter Apoptose.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder HDAC2-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit Gemcitabin behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden, wie angegeben, 48 Stunden mit VPA und Gemcitabin behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt.

5-FU ist wie Gemcitabin ein Zytostatikum, das aufgrund der Strukturähnlichkeit mit der Pyrimidinbase Uracil anstatt dieser in die RNA eingebaut wird. Darüber hinaus hemmt 5-FU ein Schlüsselenzym der Pyrimidin-Biosynthese, die Thymidilat-Synthase, die die Umwandlung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) in Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) katalysiert. Dies führt zu einem Mangel an Pyrimidinen für die DNA-Synthese und damit zur Hemmung des Zellwachstums.

Bei Behandlung von MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit 5-FU konnte eine ca. 20-30%ige Reduktion der Viabilität beobachtet werden (Abbildung 4-10A und B). Wie bei Gemcitabin konnte jedoch die Kombination mit VPA oder einer *HDAC2*-spezifischen siRNA die Viabilität nicht weiter reduzieren.

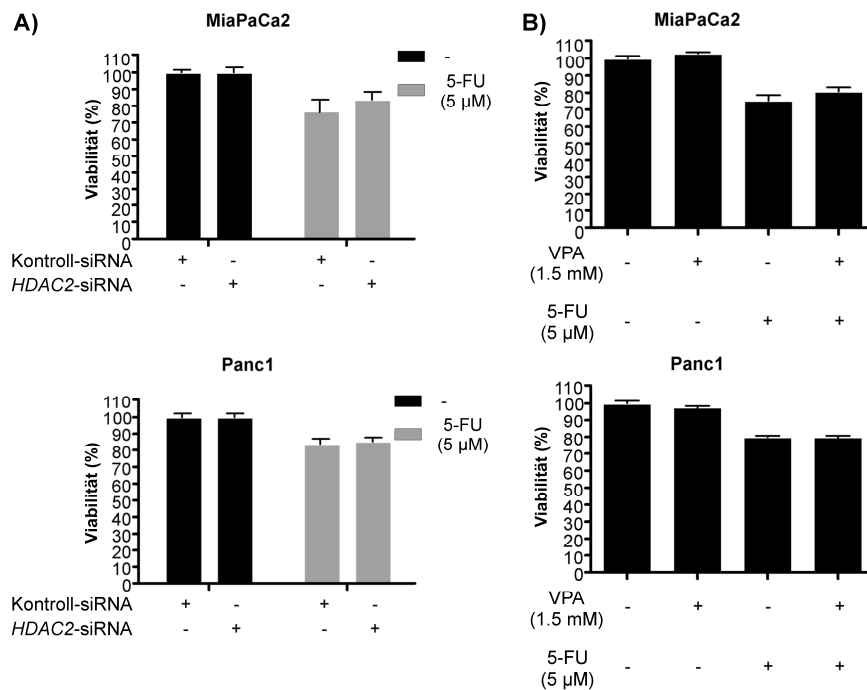


Abbildung 4-10: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber 5-FU-vermittelter Apoptose.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit 5-FU behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden, wie angegeben, 48 Stunden mit VPA und 5-FU behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt.

Des Weiteren wurde Oxaliplatin verwendet. Oxaliplatin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Platin-Derivate. Hierbei ist das Platinion mit einem 1,2-Diaminocyclohexyl-Liganden (DACH-Ligand) und einem Oxalation komplexiert. Im Körper entstehen aus Oxaliplatin Stoffwechselprodukte, die mit der DNA reagieren. Die DNA wird dadurch vernetzt, die DNA-Platin-Addukte hemmen die DNA-Synthese.

Bei Behandlung von MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit Oxaliplatin konnte eine 30-40%ige Reduktion der Viabilität beobachtet werden (Abbildung 4-11A und B). Wie bei Gemcitabin und 5-FU konnte jedoch die Kombination mit VPA oder einer *HDAC2*-spezifischen siRNA die Viabilität nicht weiter reduzieren.

Da im Gegensatz zur verstärkten Etoposid-induzierten Apoptose nach *HDAC2*-Herunterregulation durch siRNA oder *HDAC2*-Inhibition durch VPA mit anderen Chemotherapeutika keine Sensitivierung beobachtet werden konnte, scheint die *HDAC2*-Depletion demnach spezifisch bei der durch DNA-Doppelstrangbrüche induzierten Apoptose eine sensitivierende Wirkung zu haben.

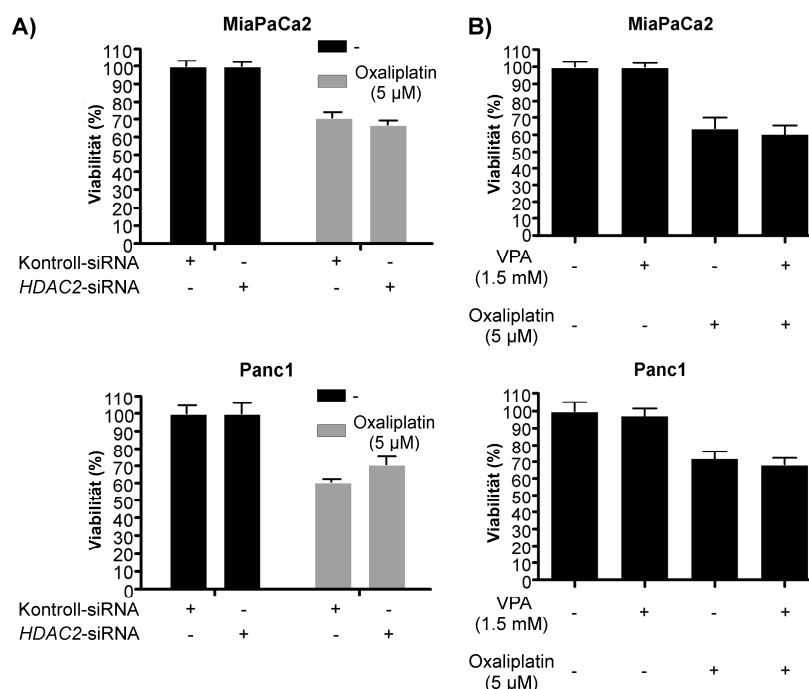


Abbildung 4-11: HDAC2-Depletion sensitiviert nicht gegenüber Oxaliplatin-vermittelter Apoptose.

A) MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit Oxaliplatin behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **B)** MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) wurden, wie angegeben, 48 Stunden mit VPA und Oxaliplatin behandelt. Die Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt.

4.6. HDAC2 kontrolliert die *NOXA*-Genexpression

Um den molekularen Mechanismus, der der Sensitivierung zu Grunde liegt, genauer zu untersuchen, wurde die Genexpression nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von *HDAC2* mittels Microarrays global analysiert. Es zeigte sich, dass innerhalb der an Apoptose beteiligten Gene nur das *BH3-only* Protein *NOXA* bei MiaPaCa2- und Panc1-Zellen nach *HDAC2*-Herunterregulation signifikant hochreguliert war (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Regulation von Apoptose beteiligten Genen nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von *HDAC2*.

MiaPaCa2- und Panc1-Zellen wurden mit Kontroll- und *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert und für eine Microarray-Analyse verwendet. Die angegebene Regulation bezeichnet die Hoch- oder Herunterregulation im Verhältnis zur Kontrolle.

Gene ID	Offizielles Symbol	Synonym	Regulation (durch <i>HDAC2</i> -Herunterregulation)	
			MiaPaCa2	Panc1
3066	<i>HDAC2</i>	<i>RPD3</i>	-10.5	-7.9
BCL2-Familie				
4170	<i>MCL1</i>		2	1.3
598	<i>BCL2L1</i>	<i>BCL-X_L</i>	1.4	1.1
596	<i>BCL2</i>		-1.3	1
597	<i>BCL2A1</i>	<i>A1</i>	1	-1.5
581	<i>BAX</i>		1.1	1.3
578	<i>BAK1</i>	<i>BAK</i>	1.2	1.2
666	<i>BOK</i>		1.1	-2.1

	Gene ID	Offizielles Symbol	Synonym	Regulation (durch HDAC2- Herunterregulation)	
				MiaPaCa2	Panc1
	572	<i>BAD</i>		1.9	1.3
	638	<i>BIK</i>		1.3	-1.1
	637	<i>BID</i>		-1.3	-1.3
	10018	<i>BCL2L11</i>	<i>BIM</i>	1.2	1.5
	90427	<i>BMF</i>		1	1.2
	8739	<i>HRK</i>	<i>DP5, HAKIRI</i>	1	1.2
	27113	<i>BBC3</i>	<i>PUMA, JFY1</i>	1.1	1
	5366	<i>PMAIP1</i>	<i>NOXA, APR</i>	4.7	4
IAP-Familie					
	4671	<i>NAIP</i>	<i>BIRC1</i>	-1.2	-1.1
	330	<i>BIRC3</i>	<i>ciAP2</i>	1.1	-1.1
	329	<i>BIRC2</i>	<i>ciAP1</i>	-1.9	1.6
	331	<i>XIAP</i>	<i>BIRC4</i>	1.8	1.2
	79444	<i>BIRC7</i>	<i>LIVIN</i>	1	1
	57448	<i>BIRC6</i>	<i>APOLLON, BRUCE</i>	1.4	1.4
	332	<i>BIRC5</i>	<i>SURVIVIN</i>	1.2	1.5
Todesrezeptoren und -adaptoren					
	7132	<i>TNFRSF1A</i>	<i>TNFR1</i>	-1.2	1.1
	7133	<i>TNFRSF1B</i>	<i>TNFR2</i>	-1.1	-1.6
	8797	<i>TNFRSF10A</i>	<i>TRAILR1, DR4</i>	1.4	1.5
	8795	<i>TNFRSF10B</i>	<i>TRAILR2, DR5</i>	2.2	1.5
	8717	<i>TRADD</i>		1.2	-1.7
	8772	<i>FADD</i>	<i>MORT1</i>	1	1
	8837	<i>CFLAR</i>	<i>FLIP</i>	1.2	1.7
Mitochondrielle Proteine					
	317	<i>APAF1</i>	<i>CED4</i>	-1.1	1.4
	9131	<i>AIFM1</i>	<i>AIF</i>	1.2	1.5
	56616	<i>DIABLO</i>	<i>SMAC</i>	-1.1	-1.2
	27429	<i>HTRA2</i>	<i>OMI</i>	-1.1	-1.3

Zur Validierung der Microarray-Daten wurden quantitative Echtzeit-PCRs verwendet. Tatsächlich war die *NOXA*-mRNA 48 Stunden nach der Transfektion von Kontroll- und *HDAC2*-spezifischen siRNAs im Vergleich zur Kontrolle 4,4-fach in MiaPaCa2- und 2,2-fach in Panc1-Zellen hochreguliert (Abbildung 4-12A). Die siRNA-vermittelte Herunterregulation von *HDAC2* konnte ebenfalls bestätigt werden (Abbildung 4-12A).

Die Behandlung der Zellen mit VPA führte ebenso zu einer dosisabhängigen *NOXA*-Induktion in beiden Zelllinien (Abbildung 4-12B). Dagegen wurde die Expression der *HDAC2*-mRNA, wie erwartet, durch die VPA-Behandlung nicht reguliert, da VPA auf Ebene des Proteins wirkt.

Auch korrelierte die VPA-induzierte Hochregulation der *NOXA*-mRNA mit einem VPA-induzierten Anstieg der *NOXA*-Promotor-Aktivität in einer dosisabhängigen Weise (Abbildung 4-12C).

In ChIP-Assays konnte eine direkte und spezifische Bindung von *HDAC2* an den *NOXA*-Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 4-12D). Außerdem konnte 48 Stunden nach der Transfektion einer *HDAC2*-spezifischen siRNA ein erhöhtes Level von acetyliertem Histon H3 und RNA-Polymerase II am *NOXA*-Promotor beobachtet werden, was Kennzeichen einer

offenen Chromatinstruktur und einer transkriptionellen Aktivierung sind. Dagegen wurde keine Änderung der Bindung von acetyliertem Histon H3 und RNA-Polymerase II am Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Promotor festgestellt, was die Spezifität des Assays belegt. Zur sukzessiven Öffnung des Lokus passt die signifikant erhöhte, zeitabhängige, Etoposid-induzierte *NOXA*-Expression in *HDAC2*-depletierten *MiaPaCa2*- und *Panc1*-Zellen (Abbildung 4-12E).

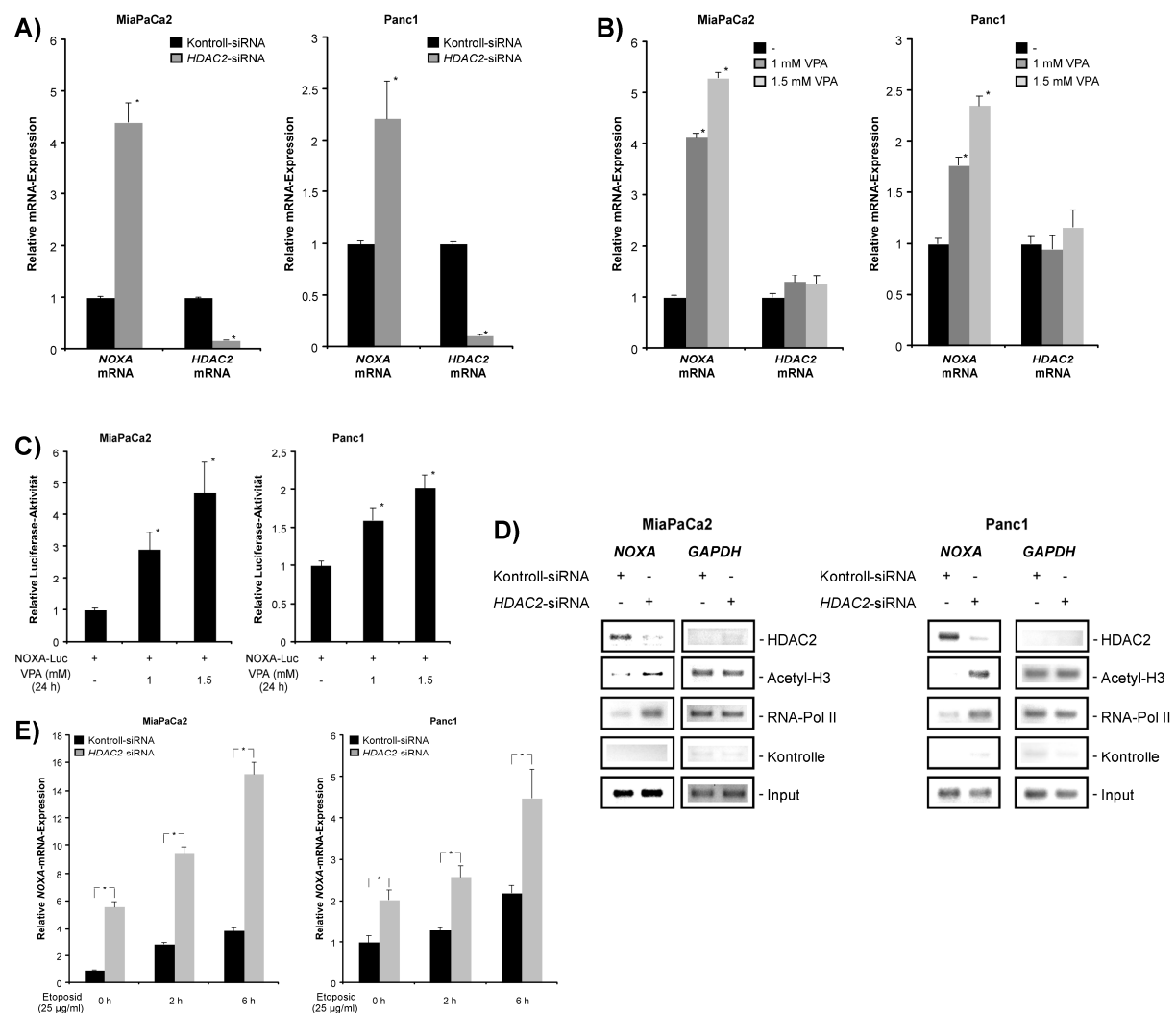


Abbildung 4-12: HDAC2 reprimiert das NOXA-Gen.

A) Quantitative *NOXA*- und *HDAC2*-mRNA-Analyse in *MiaPaCa2*- (links) und *Panc1*-Zellen (rechts) nach *HDAC2*-siRNA-Transfektion. Die RNA wurde 48 Stunden nach der Transfektion isoliert. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse und Normalisierung auf Cyclophilin. **B)** Quantitative *NOXA*- und *HDAC2*-mRNA-Analyse in *MiaPaCa2*- (links) und *Panc1*-Zellen (rechts) nach 48-stündiger VPA-Behandlung. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse und Normalisierung auf Cyclophilin. **C)** Das *NOXA*-Luc-Reporterplasmid wurde in *MiaPaCa2*- (links) und *Panc1*-Zellen (rechts) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen, wie angegeben, mit VPA behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. **D)** Chromatin-Immünpräzipitation des *NOXA*-Genpromotors. Chromatin von *MiaPaCa2*- (links) und *Panc1*-Zellen (rechts), die mit Kontroll- oder *HDAC2*-spezifischen siRNAs transfiziert worden waren, wurde mit *HDAC2*- oder RNA-Polymerase II-Antikörpern sowie Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 oder IgG als Negativkontrolle immunpräzipitiert. Präzipitierte DNA oder 10% des Chromatin-Inputs wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für *NOXA* und *GAPDH* amplifiziert. **E)** Quantitative *NOXA*-mRNA-Analyse in *MiaPaCa2*- (links) und *Panc1*-Zellen (rechts). 48 Stunden nach der *HDAC2*-siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit Etoposid behandelt und zu den angegebenen Zeiten RNA isoliert. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse und Normalisierung auf Cyclophilin.

Dagegen konnte nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC1 nur ein marginaler Anstieg der *NOXA*-mRNA-Expression beobachtet werden. Es scheint sich daher um einen Isoenzym-spezifischen Effekt für HDAC2 zu handeln.

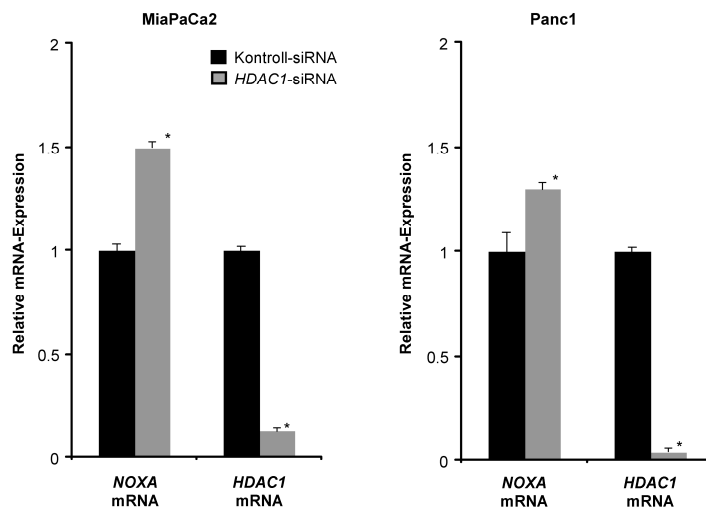


Abbildung 4-13: siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC1 führt zu einem marginalen Anstieg der *NOXA*-mRNA-Expression.

Quantitative *NOXA*- und *HDAC1*-mRNA-Analyse in MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) nach *HDAC1*-siRNA-Transfektion. Die RNA wurde 48 Stunden nach der Transfektion isoliert. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse und Normalisierung auf Cyclophilin.

4.7. *NOXA* ist essentiell für die HDAC2-abhängige Sensitivierung gegenüber Etoposid

Um die essentielle Rolle von *NOXA* in der Sensitivierung gegenüber Etoposid nach HDAC2-Herunterregulation zu beweisen, wurden MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit *HDAC2*- und *NOXA*-spezifischen siRNAs transfiziert, sowohl allein als auch in Kombination. Die Herunterregulation von HDAC2 und *NOXA* wurde durch Western Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 4-14D). Wie bereits zuvor beobachtet, war der Anteil apoptotischer Zellen nach HDAC2-Herunterregulation und Etoposid-Behandlung signifikant erhöht (Abbildung 4-14A). Wenn jedoch HDAC2 und *NOXA* gleichzeitig herunterreguliert wurden, lag der Anteil apoptotischer Zellen nach Etoposid-Behandlung lediglich auf dem Level der Kontrollzellen.

Um diese Daten weiter zu validieren, wurden MTT- und Caspase-3/7-Assays durchgeführt. Die 48-stündige Behandlung der mit einer Kontroll-siRNA transfizierten Zellen mit Etoposid führte zu einer 44,2%igen Reduktion der Viabilität in MiaPaCa2- und einer 25,4%igen Reduktion in Panc1-Zellen (Abbildung 4-14B). Diese Etoposid-induzierte Reduktion der Viabilität war nach *HDAC2*-siRNA-Transfektion signifikant erhöht, mit 65% in MiaPaCa2- und 36,9% in Panc1-Zellen (Abbildung 4-14B). Im Gegensatz dazu sank die Etoposid-induzierte Reduktion der Viabilität auf 29% in MiaPaCa2- und 21,9% in Panc1-Zellen, wenn die Zellen gleichzeitig mit *HDAC2*- und *NOXA*-siRNA transfiziert worden waren.

In Caspase-3/7-Assays induzierte die Etoposid-Behandlung in den Kontrollen eine 5,2-fache Caspase-Aktivität in MiaPaCa2- und eine 3,1-fache Aktivität in Panc1-Zellen (Abbildung 4-14C). Diese Etoposid-abhängige Induktion der Caspase-3/7-Aktivität wurde noch erhöht,

wenn HDAC2 durch siRNA herunterreguliert war. In MiaPaCa2-Zellen war sie dann 8,7-fach, bei Panc1-Zellen 6,2-fach erhöht. Wiederum konnte eine Hochregulation der Caspase-Aktivität nach Etoposid-Behandlung verhindert werden, wenn die Zellen mit beiden siRNAs gleichzeitig transfiziert wurden. Die Caspase-Aktivität war in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen dann lediglich 2,3-fach und 2,6-fach erhöht (Abbildung 4-14C). Dieser Effekt konnte auch in Western Blot-Analysen des Proteins *cleaved* PARP gesehen werden (Abbildung 4-14D).

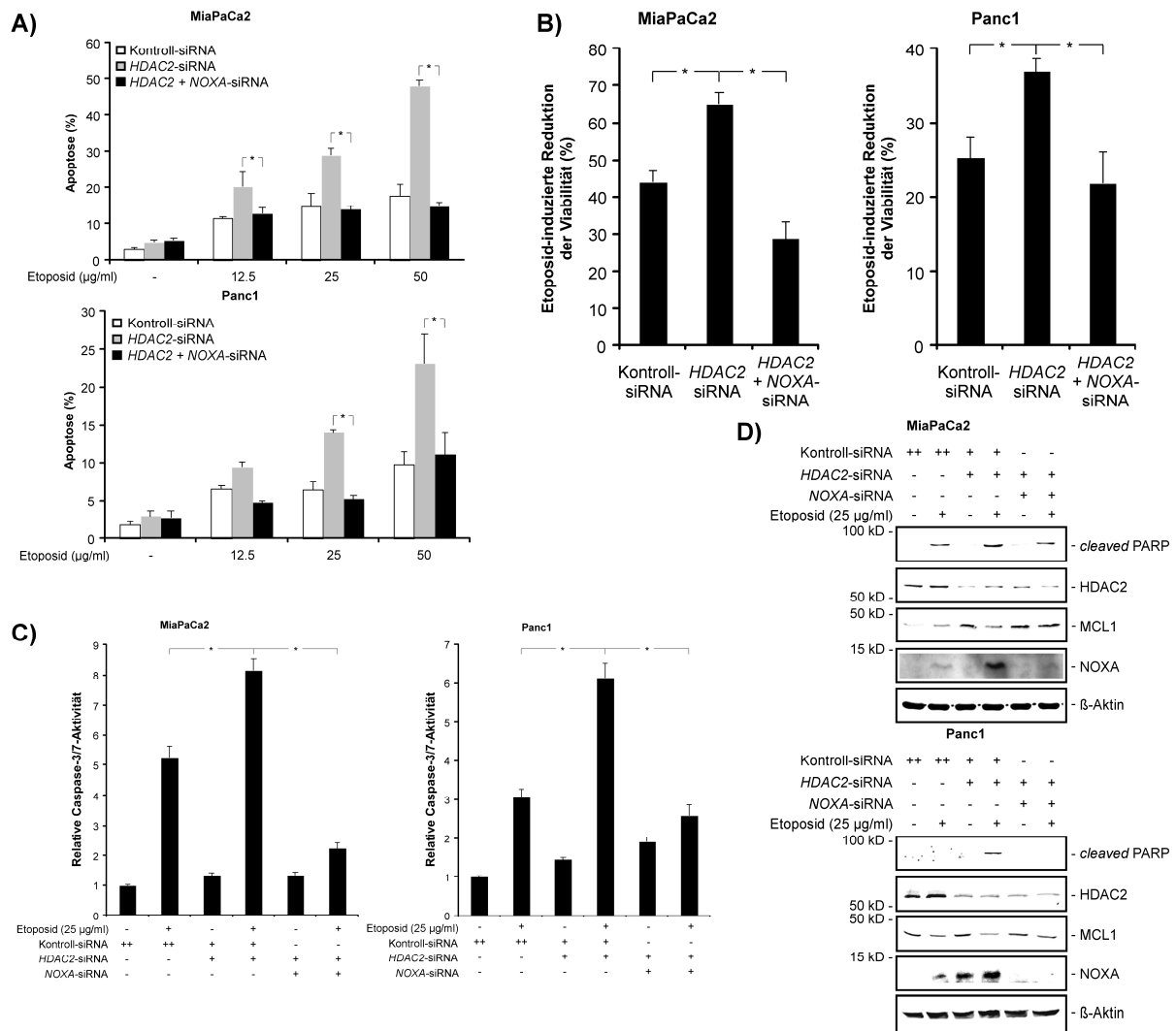


Abbildung 4-14: NOXA ist essentiell für die Sensitivierung gegenüber Etoposid nach HDAC2-Depletion.

MiaPaCa2- und Panc1-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA, einer HDAC2-spezifischen siRNA oder einer Kombination aus HDAC2- und NOXA-spezifischen siRNAs transfiziert. **A)** 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen, wie angegeben, für weitere 24 Stunden mit Etoposid behandelt. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mittels des Hoechst-Farbstoffs durch Fluoreszenzmikroskopie. **B)** 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 Stunden mit 12,5 µg/ml Etoposid behandelt. Die Etoposid-induzierte Reduktion der Viabilität wurde durch MTT-Assays bestimmt. **C)** 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 25 µg/ml Etoposid behandelt. Die Caspase-Aktivität wurde mittels Caspase-3/7-Assays bestimmt. **D)** 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 25 µg/ml Etoposid behandelt. Durch Western Blot-Analysen wurde die Expression von *cleaved* PARP, HDAC2, MCL1 und NOXA, mit β-Aktin als Ladungskontrolle, untersucht.

Auch auf Proteinebene konnte die NOXA-Hochregulation nach HDAC2-Depletion und Etoposid-Behandlung verifiziert werden (Abbildung 4-14D). Da NOXA vor allem an das anti-apoptotische BCL2-Familienmitglied MCL1 bindet, wurde die MCL1-Regulation durch Western Blot-Analysen untersucht. Es zeigte sich, dass MCL1 im Fall der effektiven Apoptose-Induktion herunterreguliert wird, und dass dies durch die NOXA-siRNA verhindert wird.

4.8. Interferonantwort-Gene werden nach HDAC2-Depletion hochreguliert

Neben der Hochregulation von NOXA wurde in den Microarray-Analysen festgestellt, dass nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 Gene für die Interferonantwort stark exprimiert werden (Tabelle 4-2). So waren unter den 20 am meisten hochregulierten Gene sieben Gene der Interferonantwort. Es handelte sich um die ATP-abhängigen RNA-Helicasen *DDX58* (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58*) und *IFIH1* (*interferon induced with helicase C domain 1*), sowie drei Gene der Familie von *Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats* (*IFIT1-3*). Außerdem waren die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase *OAS2* und das 2'-5'-Oligoadenylatsynthase-like Protein *OASL* hochreguliert, die doppelsträngige RNA binden. *OAS2* ist zudem in der Lage, durch die Polymerisierung von ATP zu PPP(A2'P5'A)N-Oligomeren die RNase L zu aktivieren, was zur Spaltung einzelsträngiger RNA, und damit zur Inhibition der Translation, führt.

Tabelle 4-2: Nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 werden Gene für die Interferonantwort stark exprimiert.

MiaPaCa2-Zellen wurden mit Kontroll- und HDAC2-spezifischen siRNAs transfiziert und für eine Microarray-Analyse verwendet. Die angegebene Regulation bezeichnet die Hoch- oder Herunterregulation im Verhältnis zur Kontrolle.

Gene ID	Offizielles Symbol	Synonym	Regulation +/- Standardfehler (durch HDAC2- Herunterregulation)		
			MiaPaCa2		
3066	<i>HDAC2</i>	<i>RPD3</i>	0.09	+/-	0.001
4939	<i>OAS2</i>	(2'-5')oligo(A) synthetase 2	7.30	+/-	0.21
23586	<i>DDX58</i>	<i>RIG-I</i>	6.87	+/-	1.69
8636	<i>OASL</i>	<i>TRIP14</i>	5.93	+/-	0.43
64135	<i>IFIH1</i>	<i>MDA-5</i>	5.34	+/-	0.88
3433	<i>IFIT2</i>	<i>G10P2, GARG-39</i>	5.20	+/-	0.65
3437	<i>IFIT3</i>	<i>CIG-49, GARG-49</i>	4.86	+/-	0.91
5366	<i>PMAIP1</i>	<i>NOXA</i>	4.70	+/-	0.30
3434	<i>IFIT1</i>	<i>G10P1, GARG-16</i>	4.45	+/-	0.27

Es ist bekannt, dass siRNA-Transfektionen zur unspezifischen Aktivierung von Interferonantwort-Genen führen können (Sledz et al, 2003). Um einen solchen *Off-target*-Effekt ausschließen zu können, wurde HDAC2 in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen mit VPA inhibiert und die Expression von *DDX58* und *IFIH1* in einer quantitativen Echtzeit-PCR untersucht. Tatsächlich stieg die Expression der beiden Gene nach VPA-Behandlung in einer

dosisabhängigen Weise signifikant an (Abbildung 4-15A), so dass ein *Off-target*-Effekt ausgeschlossen werden kann. Auch konnte die erhöhte DDX58-Expression nach VPA-Behandlung auf Proteinebene in einer Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 4-15B).

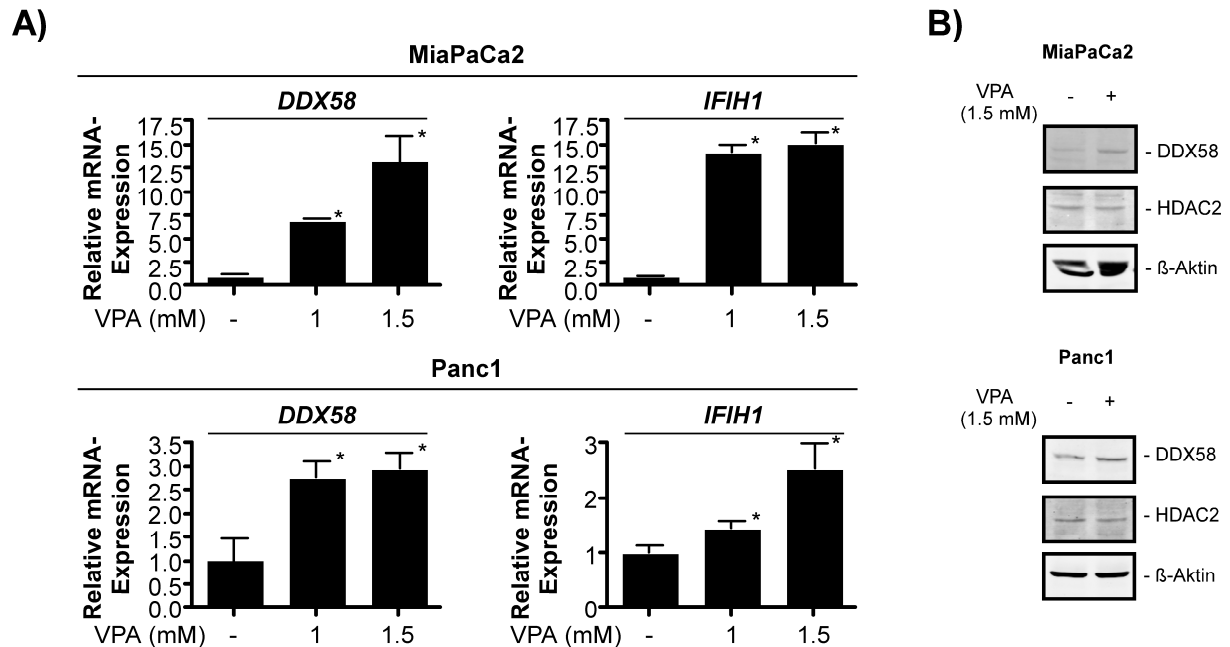


Abbildung 4-15: DDX58 und IFIH1 werden nach HDAC2-Inhibition hochreguliert.

A) Quantitative *DDX58*- und *IFIH1*-mRNA-Analyse in MiaPaCa2- (oben) und Panc1-Zellen (unten) nach 48-stündiger VPA-Behandlung. Die Quantifizierung erfolgte durch Echtzeit-PCR-Analyse und Normalisierung auf Cyclophilin. **B)** Western Blot-Analyse der Proteinexpression von DDX58 und HDAC2 nach 48-stündiger VPA-Behandlung.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von NOXA in humanen Melanomzellen durch 5'-Triphosphat-RNA (pppRNA) und Poly(I:C) möglich ist (Besch et al, 2009). Dabei führte pppRNA zu einer Aktivierung von *DDX58*, während Poly(I:C) *IFIH1* stimulierte. Beide Gene führten über *IFN-β promoter stimulator 1 (IPS-1)* zur Aktivierung von NOXA und nachfolgender Apoptose.

Um zu überprüfen, ob in den VPA-behandelten Pankreaskarzinomzellen, in denen *IFIH1* stark hochreguliert war (Abbildung 4-15A), ebenfalls durch die Verwendung von Poly(I:C) Apoptose induziert werden konnte, wurden die Zellen mit VPA vorbehandelt und anschließend mit Poly(I:C) transfiziert. Es zeigte sich jedoch, dass Poly(I:C) unabhängig von der VPA-Behandlung keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte (Abbildung 4-16).

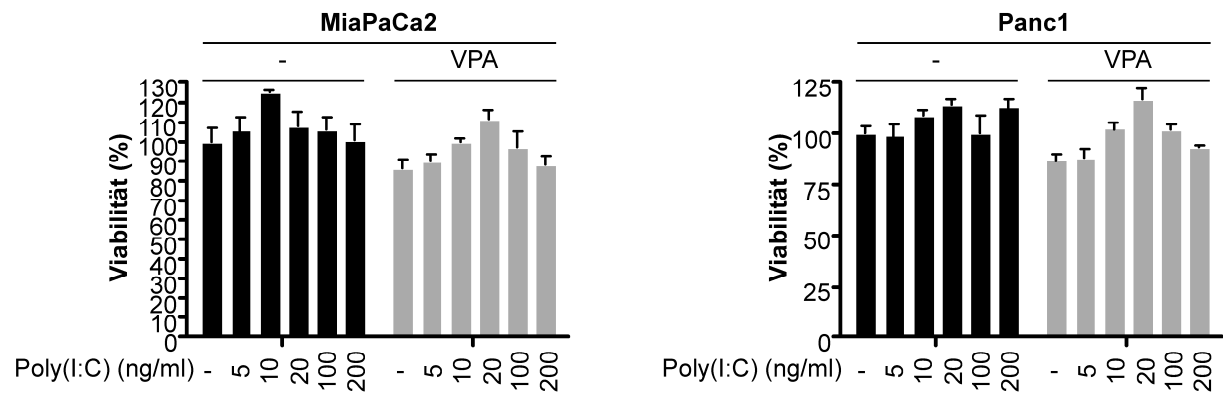


Abbildung 4-16: Poly(I:C) führt in Verbindung mit VPA nicht zu einer verminderten Viabilität. MiaPaCa2- (links) und Panc1-Zellen (rechts) wurden 24 Stunden mit 1,5 mM VPA vorbehandelt, dann mit den angegebenen Konzentrationen von Poly(I:C) transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Viabilität der Zellen durch MTT-Assays ermittelt.

4.9. HDAC2 wird im murinen Pankreaskarzinom stark exprimiert

Zur Analyse der Funktion von HDAC2 *in vivo* wurden konditionale Pankreaskarzinom-Mausmodelle verwendet. Aus den Tumoren dieser Mäuse konnten Zellen isoliert werden, die *in vitro* molekular untersucht wurden. Von 53 Zelllinien wurden in Vorarbeiten Microarray-Analysen durchgeführt. Abbildung 4-17 zeigt die mRNA-Expression der Histondeacetylasen der Klassen I, II und IV in diesen Zelllinien. *Hdac2* war dabei die am stärksten exprimierte Histondeacetylase, gefolgt von *Hdac1* und *Hdac3*. Alle anderen HDACs waren weit niedriger exprimiert.

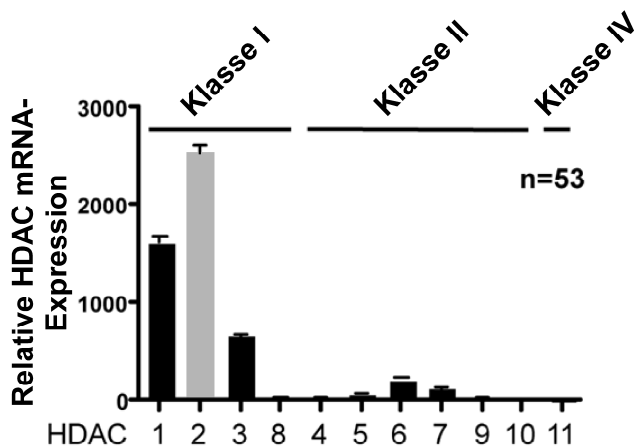


Abbildung 4-17: Relative Expression von HDACs der Klassen I, II und IV in 53 murinen Pankreaskarzinomzelllinien. Die Zellen wurden aus Pankreastumoren konditionaler Mausmodelle isoliert und für Microarray-Analysen verwendet.

Diese starke Expression von HDAC2 im Pankreas zeigte sich auch bei immunhistochemischen Färbungen von Gewebe-Paraffinschnitten von Mäusen des Genotyps *Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}(LSL-R26^{Tva-lacZ/+})*. HDAC2 war hier in allen Stadien der Tumorigenese stark nuklear exprimiert (Abbildung 4-18). Insbesondere im mäßig differenzierten und undifferenzierten duktalem Adenokarzinom konnte stets eine deutliche nukleare Färbung beobachtet werden, was mit den zuvor gezeigten humanen Gewebe-Microarrays (Abbildung 4-1) korreliert.

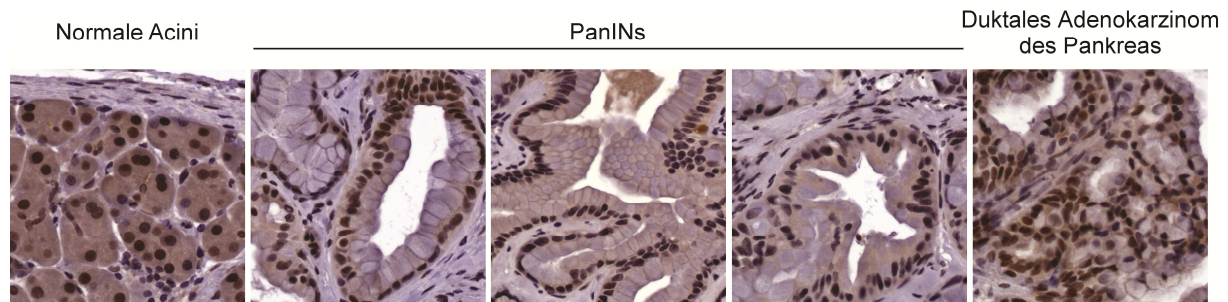


Abbildung 4-18: HDAC2-Expression in den verschiedenen Stadien der Pankreastumorigenese. Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen von HDAC2 in normalen Acini, PanIN-Läsionen sowie im duktales Adenokarzinom des Pankreas (Vergrößerung: 200x).

4.10. Überleben und Phänotypen HDAC2-defizienter Tumormäuse

Da HDAC2 im humanen und murinen Pankreaskarzinom stark exprimiert wird, scheint es in der Karzinogenese eine wichtige Rolle zu spielen. Es sollte daher untersucht werden, welche Wirkung die HDAC2-Depletion auf die Tumorigenese hat. Hierzu wurden *Hdac2^{loxP}*-Mäuse in das murine Pankreaskarzinommodell *Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (*LSL-R26^{Tva-lacZ/+}*) gekreuzt. In diesen Mäusen werden die Exons 2-4 von *Hdac2* pankreasspezifisch deletiert. Die Mäuse wiesen bei Geburt und in der weiteren Entwicklung einen normalen Phänotyp auf. Alle Mäuse mussten jedoch aufgrund neuronaler Tumoren mit konsekutiven Lähmungen geopfert werden (Tabelle 4-3). Makroskopisch hatten 50% (4/8) der HDAC2-defizienten Mäuse einen kleinen Pankreastumor (< 0,5 cm³), ein größerer Tumor wurde nicht beobachtet. Mikroskopisch war bei 62,5% (5/8) der HDAC2-defizienten Mäuse ein Pankreaskarzinom nachweisbar.

Aufgrund der neuronalen Phänotypen und der kleinen Kohortgröße kann eine Aussage über ein verändertes Überleben von *Hdac2^{loxP/loxP};Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (*LSL-R26^{Tva-lacZ/+}*)-Mäusen im Vergleich zu *Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (*LSL-R26^{Tva-lacZ/+}*)-Mäusen nicht getroffen werden.

Tabelle 4-3: Überleben und Phänotypen der HDAC2-defizienten Tumormäuse im *Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Modell.

Die Tiere F0651 und F0826 hatten den Genotyp *Hdac2^{loxP/loxP};Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};LSL-R26^{Tva-lacZ/+}*, die restlichen Mäuse den Genotyp *Hdac2^{loxP/loxP};Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*. Makroskopisch beobachtete Karzinome waren stets < 0,5 cm³. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten.

Maus-Nr.	F0826	F0853	F0961	F0865	F0884	F0848	F0912	F0651	
Überleben (Tage)	50	70	70	82	94	107	131	134	
Neuronaler Phänotyp	+	+	+	+	+	+	+	+	100% (8/8)
Makroskopisches Karzinom	-	+	-	+	+	-	+	-	50% (4/8)
Mikroskopisches Karzinom	-	+	-	+	+	+	+	-	62,5% (5/8)

5. Diskussion

Obwohl HDACs an der Karzinogenese solider Tumore beteiligt sind und HDACi bereits in verschiedenen klinischen Studien ihre Wirksamkeit bewiesen haben, sind definitive HDAC-kontrollierte Signalwege und Isoenzym-spezifische Funktionen bisher noch unzureichend untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde in Pankreaskarzinomzelllinien ein HDAC2-abhängiger Signalweg entdeckt, der durch die Repression von NOXA zur Resistenz gegenüber Topoisomerase II-Inhibitoren führt. Außerdem weisen *in vivo* erste Ergebnisse auf eine Rolle von HDAC2 in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms hin.

5.1. Essentielle Rolle von HDAC2 im Pankreaskarzinom

Erst vor kurzem konnte bei Speiseröhrenkrebs eine Korrelation zwischen hoher HDAC2-Expression und Lymphknoten-Metastasen sowie geringerer Tumordifferenzierung demonstriert werden (Langer et al, 2010). In gastrointestinalen Tumoren, wie Kolon- und Magenkrebs (Huang et al, 2005; Weichert et al, 2008a; Weichert et al, 2008b; Zhu et al, 2004b), sowie im humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist HDAC2 ebenfalls stark exprimiert. Die Expression von HDAC2 in humanen Pankreaskarzinomen stieg dabei auf Protein und mRNA-Ebene im Rahmen der Tumorprogression an. Außerdem konnte in einem murinen *Kras*^{G12D}-abhängigen Mausmodell in allen Stadien der Tumorigenese sowie in 53 aus Pankreastumoren isolierten Zelllinien eine hohe HDAC2-Expression gezeigt werden. Die hohe Expression von HDAC2 lässt auf eine wichtige Rolle von HDAC2 in der Karzinogenese des Pankreas und anderen gastrointestinalen Tumoren schließen. Dazu passt, dass vor kurzem ein wesentlicher Beitrag von HDAC2 zur Karzinogenese gastrointestinaler Tumoren *in vivo* in einem *APC*^{min}-Mausmodell des Kolonkarzinoms nachgewiesen wurde (Zimmermann et al, 2007).

5.2. Kompensation des HDAC2-Verlusts

Die Funktionen von HDAC2 sind stark abhängig von Zelltyp und Gewebe. *In vivo* zeigte eine Studie, dass HDAC2-*Knock-out*-Mäuse eine erhöhte Proliferation und Apoptose der Herzzellen aufwiesen, während dieser Phänotyp in Zellen anderer Gewebe nicht beobachtet werden konnte (Montgomery et al, 2007). Auch konnte in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu *in vitro*-Studien in vielen anderen Krebszelllinien (Harms & Chen, 2007; Huang et al, 2005; Weichert et al, 2008b; Wilson et al, 2006; Zhu et al, 2004b), nach der siRNA-vermittelten Herunterregulation von HDAC2 in MiaPaCa2- und Panc1-Zellen keine beeinträchtigte Proliferation und Viabilität der Zellen oder ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen festgestellt werden. Dies spricht in diesen Zelllinien für eine redundante Funktion von HDAC2 in Zellzyklusprogression und Apoptoseinduktion. Möglicherweise übernimmt hier

HDAC1 Funktionen von HDAC2, da HDAC1 zu HDAC2 86% Aminosäuresequenzidentität aufweist und oftmals in den gleichen Co-Repressorkomplexen assoziiert ist (Jurkin et al, 2011; Yang & Seto, 2008). Gestützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung, dass in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien bei siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 eine leicht erhöhte Expression von HDAC1 festzustellen war, denn dieser Effekt wurde auch bei MEFs HDAC2-defizienter Mäuse gezeigt (Wilting et al, 2010). Zudem wurde in HDAC1-defizienten embryonalen Stammzellen gezeigt, dass auch HDAC2 verschiedene Funktionen von HDAC1 übernehmen kann (Zupkovitz et al, 2006). Da allerdings in der vorliegenden Arbeit auch die Behandlung der Zellen mit dem Klasse I-spezifischen HDACi VPA keinen Effekt auf Proliferation und Viabilität hatte, könnte dies auch auf einen Beitrag der HDACs der Klassen II und IV hinweisen.

5.3. Synergie von HDAC2-Depletion und Etoposid-Behandlung – eine nicht-redundante Funktion von HDAC2

Als nicht-redundante Funktion von HDAC2 konnte nach HDAC2-Depletion eine deutliche Sensitivierung gegenüber dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid festgestellt werden. Die Depletion von HDAC1 konnte diese Sensitivierung nicht bewirken. Auch die Verwendung anderer Chemotherapeutika mit einem anderen Wirkmechanismus führte nicht zur gesteigerten Apoptose der Zellen, es scheint sich daher um einen spezifischen Effekt für DNA-Doppelstrangbrüche induzierende Chemotherapeutika zu handeln. Da die Sensitivierung auch in den Pankreaskarzinomzelllinien BxPc3 und DanG beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen generellen Mechanismus in Pankreaskarzinomzelllinien handelt.

In Säugetieren werden die Topoisomerasen II α und II β unterschieden, die den topologischen Zustand der DNA durch Auflösung der Helix-Windungen regulieren können und so verschiedene biologische Prozesse, wie Replikation, Mitose, Chromatinkondensierung und Transkription erleichtern (Marchion et al, 2005b). Nach dem Schneiden des DNA-Doppelstrangs entstehen zwischen den Topoisomerase II-Enzymen und der von ihnen geschnittenen DNA vorübergehend kovalente Bindungen (Marchion et al, 2005b). Topoisomerase II-Inhibitoren induzieren DNA-Strangbrüche, indem sie an die DNA binden, die Topoisomerase II-DNA-Komplexe stabilisieren und die Religation der DNA-Stränge inhibieren (Münster et al, 2009b).

Die Synergie der Klasse I-HDACi/Topoisomerase II-Inhibitor-Kombination ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut dokumentiert (Marchion et al, 2005a; Marchion et al, 2005b; Marchion et al, 2009; Tsai et al, 2000). Auch in klinischen Studien der Phasen I und II in fortgeschrittenen soliden Tumoren konnte eine zytotoxische Wirkung von VPA mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Epirubicin gezeigt werden (Münster et al, 2009a; Münster et al, 2007). Trotzdem

sind die molekularen Mechanismen, die die Synergie erklären und die beitragenden HDAC-Isoenzyme unzureichend untersucht. Bereits gezeigt wurde jedoch, dass HDAC1 und HDAC2 *in vitro* und *in vivo* unter normalen physiologischen Bedingungen mit Topoisomerase II assoziiert sind (Johnson et al, 2001; Tsai et al, 2000). Hier könnten HDAC1 und 2 dazu beitragen, die Effizienz von Topoisomerase II bei der Kondensierung der Chromosomen zu erhöhen (Tsai et al, 2000). Werden die HDACs dagegen durch HDACi inhibiert, liegt das Chromatin dekondensiert vor, so dass Topoisomerase II-Inhibitoren vermehrt an die DNA binden und Doppelstrangbrüche induzieren könnten (Münster et al, 2009b).

Zusätzlich zu dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten sensitivierenden Effekt gegenüber Etoposid konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die HDAC2-Depletion mit antihormoneller Therapie in Mammakarzinomzellen und mit Todesrezeptor-Aktivierung in Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen in Synergie steht, was die Wichtigkeit von HDAC2 als therapeutischer Zielstruktur demonstriert (Bicaku et al, 2008; Kaler et al, 2008; Schüler et al, 2010).

5.4. Molekularer Wirkmechanismus der VPA/Etoposid-Kombination in Pankreaskarzinomzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *NOXA*-Gen eine wichtige Zielstruktur von HDAC2 ist, was den Wirkmechanismus der verwendeten HDACi/Topoisomerase II-Inhibitor-Kombination in Pankreaskarzinomzellen erklärt. In Transkriptom-Analysen HDAC2-depletierter Zellen war die mRNA-Expression von *NOXA* stark hochreguliert. Diese erhöhte *NOXA*-mRNA-Expression konnte sowohl durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von HDAC2, als auch die HDAC2-Inhibition durch VPA-Behandlung in nahezu identischem Maße beobachtet werden. Nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC1 war *NOXA* dagegen nur marginal hochreguliert, was die in diesem Fall fehlende Sensitivierung erklärt.

BH3-*only* Proteine wie *NOXA* sind Rezeptoren zellulären Stresses und Regulatoren der Apoptose, die nach ihrer Aktivierung die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren induzieren (Häcker & Weber, 2007). Da die durch HDAC2-Depletion hervorgerufene Sensitivierung gegenüber Etoposid vollkommen aufgehoben wurde, wenn *NOXA* durch siRNA herunterreguliert wurde, kann der beobachtete Synergismus durch die Regulation des *NOXA*-Gens durch HDAC2 erklärt werden. In dieser Signalkette wird der *NOXA*-Lokus in unbehandelten Pankreaskarzinomzellen von HDAC2 kontrolliert, die Zellen sind resistent gegenüber Etoposid (Abbildung 5-1A). Wird HDAC2 jedoch durch siRNA herunterreguliert oder durch VPA gehemmt, resultiert dies in spezifischer Acetylierung des Histons H3 am *NOXA*-Lokus, und das Chromatin öffnet sich (Abbildung 5-1B). An das dekondensierte Chromatin können durch Etoposid aktivierte

Transkriptionsfaktoren binden und eine verstärkte *NOXA*-Expression, und damit Apoptose, bewirken (Abbildung 5-1B). Zu diesem Modell passt, dass die *NOXA*-Expression in HDAC2-reduzierten Zellen nach Zugabe von Etoposid in einer zeitabhängigen Weise stärker anstieg als in Kontrollzellen.

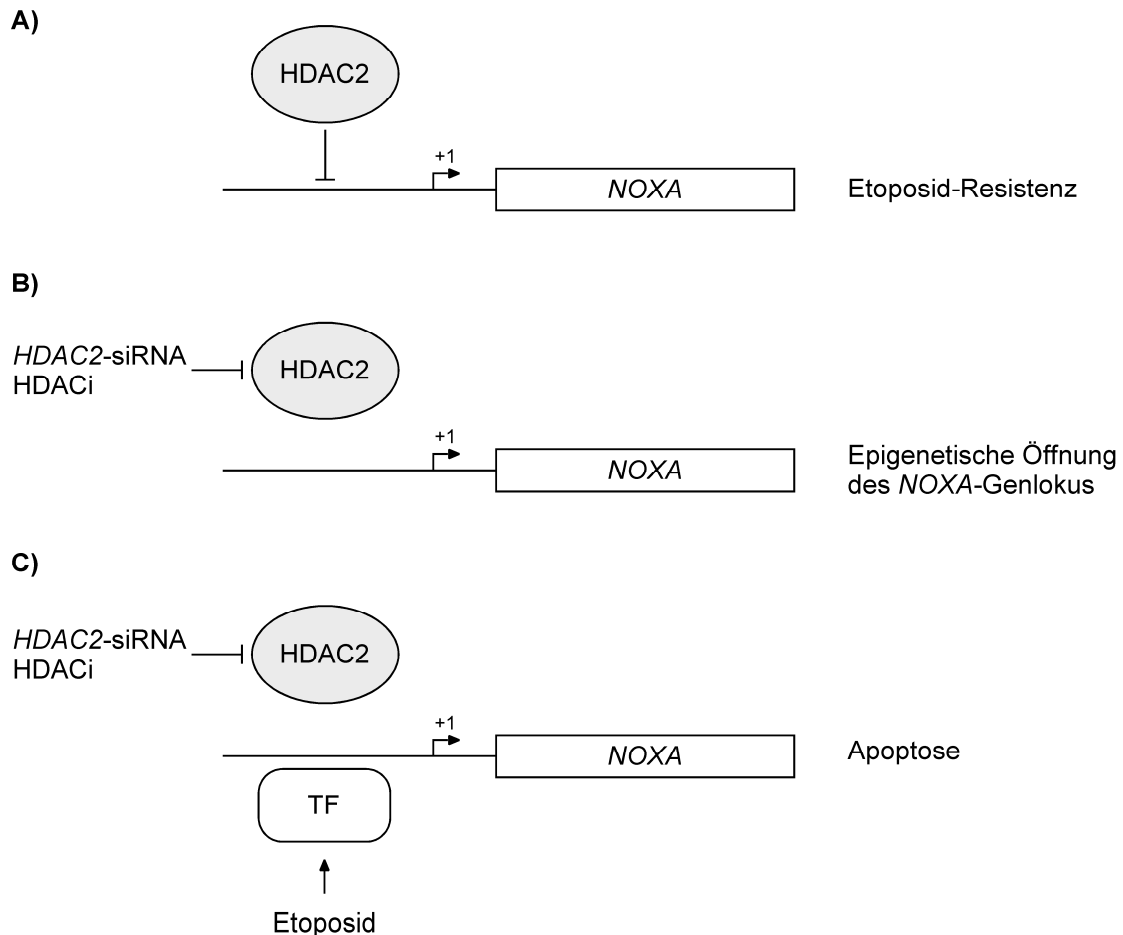


Abbildung 5-1: Vereinfachtes Schema des Wirkmechanismus der HDACi/Etoposid-Kombination in Pankreaskarzinomzellen.

A) In Gegenwart von HDAC2 am *NOXA*-Promotor ist das Chromatin deacetyliert und damit geschlossen, eine Transkription von *NOXA* findet nicht statt. Die Zellen sind resistent gegenüber Etoposid. **B)** Durch HDAC2-Depletion mittels siRNA oder VPA wird der *NOXA*-Genlokus durch Acetylierung der Histone epigenetisch geöffnet. Es findet eine schwache Transkription von *NOXA* statt, eine Induktion von Apoptose lässt sich nicht feststellen. **C)** Durch die Kombination von HDAC2-Depletion mittels siRNA oder VPA und Etoposid-Behandlung werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und binden an den geöffneten *NOXA*-Genlokus. Es kommt zur verstärkten Transkription von *NOXA* und zur Apoptose der Zellen. TF = Transkriptionsfaktor.

NOXA wurde zunächst als Phorbol ester-induzierbares und p53-reguliertes Gen beschrieben, das unter genotoxischem Stress in die Apoptose involviert war (Hijikata et al, 1990; Oda et al, 2000). Dies wurde in murinen Embryo-Fibroblasten *NOXA*-defizienter Mäuse, die einen höheren Schwellenwert gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose aufwiesen, validiert (Shibue et al, 2003; Villunger et al, 2003). Darüber hinaus wurde in der Magenkarzinomzelllinie MKN45 ein Synergieeffekt beobachtet, wenn Wildtyp-p53 adenoviral transferiert wurde und zugleich eine HDACi-Behandlung erfolgte (Sasaki et al, 2008). Hier

wurden NOXA-Expression und Apoptose induziert, was für eine epigenetische Stilllegung von NOXA in einer HDAC-abhängigen Weise spricht und die Bedeutung von p53 in der Aktivierung des NOXA-Gens hervorhebt. Da HDAC2 in MCF7-Zellen die DNA-Bindung von p53 an relevante Zielgene unterdrücken kann (Harms & Chen, 2007), muss auch im vorliegenden Modellsystem eine p53-abhängige Aktivierung von NOXA nach HDAC2-Herunterregulation oder -Inhibition in Betracht gezogen werden. Jedoch ist dieses Szenario unwahrscheinlich, da sowohl MiaPaCa2- als auch Panc1-Zellen p53-Proteine mit Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne exprimieren (Ruggeri et al, 1992). Vorstellbar wäre daher, dass andere Transkriptionsfaktoren der p53-Familie hier eine Rolle spielen. p63 wird jedoch in Panc1-Zellen nicht exprimiert (eigene Beobachtungen), so dass eine Beteiligung von p73 eher in Frage kommt. Bereits vor einigen Jahren wurde in verschiedenen Krebszelllinien gezeigt, dass Etoposid zu einer Induktion von p73 führte (Irwin et al, 2003). Dazu kommt, dass vor kurzem in MEFs demonstriert werden konnte, dass p73 durch Etoposid in einer NF- κ B-abhängigen Weise aktiviert wurde und zu einer Induktion von Noxa führte (Martin et al, 2009). In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pankreaskarzinomzellen war allerdings nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 die basale NF- κ B-Aktivität signifikant verringert (Schüler et al, 2010), und in mit SAHA behandelten Panc1-Zellen wurde eine reduzierte basale Bindung von RelA an ein Konsensus- κ B-Oligonukleotid festgestellt (Lehmann et al, 2009). Auch in HCT116 Kolonkarzinomzellen, in denen HDAC2 durch siRNA oder HDACi depletiert wurde, wurde eine Reduzierung der TNF α -vermittelten Aktivierung eines NF- κ B Luciferase-Reportergens beschrieben (Kaler et al, 2008). Es ist daher fraglich, ob der von Martin et al. beschriebene Signalweg in Pankreaskarzinomzelllinien auch bei verminderter NF- κ B-Aktivität aktiviert werden kann.

Neuere Untersuchungen demonstrieren in Leukämie-Zellen eine Hochregulation von NOXA auf Protein- und mRNA-Ebene nach HDACi-Behandlung sowie den Beitrag von NOXA zur HDACi-induzierten Apoptose (Inoue et al, 2007; Inoue et al, 2008). Im Gegensatz zu diesen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit in Pankreaskarzinomzellen keine Apoptoseinduktion nach alleiniger HDAC2-Depletion durch siRNA oder VPA-Behandlung beobachtet werden, was durch Unterschiede in der Karzinogenese und Tumorbilogie von Leukämie und Pankreaskarzinomen erklärt werden könnte. Auch könnte das Fehlen der Korrelation zwischen erhöhtem NOXA-mRNA-Level und erhöhter Proteinexpression in MiaPaCa2-Zellen und die fehlende MCL1-Depletion in Panc1-Zellen nach HDAC2-Depletion die Beobachtung erklären, dass die alleinige HDAC2-Depletion nicht zur Apoptoseinduktion führte.

5.5. Induktion von Interferonantwortgenen durch HDAC2-Depletion

In Microarray-Transkriptomanalysen zeigte sich, dass nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von HDAC2 neben *NOXA* auch sieben Gene der Interferonantwort hochreguliert waren. Die Interferonantwort dient normalerweise im Körper dazu, virale Infektionen abzuwehren (Sledz et al, 2003). Kennzeichen der viralen Infektionen sind u.a. doppelsträngige RNAs, die bei der viralen Replikation entstehen und durch *Toll-like receptors* (TLRs), *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors* (RLRs) und *nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs) erkannt werden (Takeuchi & Akira, 2009). Die Zellen degradieren diese doppelsträngigen RNAs zunächst durch die Endoribonuklease Dicer in 21 bp lange Fragmente, die sequenzspezifisch an die mRNA der Wirtszelle binden und durch RNA-Interferenz ihre Zerstörung bewirken (Ding, 2010). Außerdem bewirkt die doppelsträngige RNA in der Wirtszelle die Produktion und Sekretion von Interferonen, die an Zelloberflächenrezeptoren binden und über die Aktivierung des JAK/STAT (Janus Kinase/*signal transducer and activator of transcription*)-Signalwegs die genspezifische Transkription antiviraler Gene stimulieren (Katze et al, 2002). Dadurch werden u.a. die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase *OAS2* und damit die latente RNase L aktiviert, die einzelsträngige RNA degradiert (Katze et al, 2002).

Auch die 21 bp lange siRNA ist eine doppelsträngige RNA, und es wurde bereits gezeigt, dass sie Interferonantwort-Gene wie *OAS2* und *IFIT2* unspezifisch stimulieren kann (Sledz et al, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auch durch VPA-Behandlung die Hochregulation der RLRs *DDX58* und *IFIH1* auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen, so dass ein *Off-target*-Effekt unwahrscheinlich ist.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass *DDX58* und *IFIH1* auch an einem Interferon-unabhängigen Signalweg beteiligt sind, der zur Apoptose von Melanomzellen führt (Besch et al, 2009). Wurden hier die Zellen mit 5'-Triphosphat-RNA (pppRNA), die von viralen RNA-Polymerasen im Zytosol synthetisiert wird, behandelt, führte dies zu einer erhöhten Expression von *DDX58*, während durch die Behandlung mit *polyinosinic-polycytidylic acid* (Poly(I:C)), einer künstlichen dsRNA, *IFIH1* hochreguliert wurde. Die Aktivierung beider Gene führte schließlich zur p53-unabhängigen Aktivierung von *NOXA*, und damit zur Apoptose der Zellen. In den durch VPA-Behandlung HDAC2-depletierten Pankreaskarzinomzellen konnte jedoch trotz der Hochregulation von *IFIH1* nach Transfektion mit Poly(I:C) keine Apoptose induziert werden. Die Pankreaskarzinomzellen scheinen demnach im Gegensatz zu den Melanomzellen über einen Sicherheitsmechanismus zu verfügen, der sie vor *IFIH1*-induzierter Apoptose schützt. Möglich wäre hier eine Beteiligung von *BCL-X_L*, das in oben genannter Studie nicht-maligne Zellen trotz induzierter *NOXA*-Expression vor der Apoptose bewahrte (Besch et al, 2009). Ob pppRNA synergistisch mit HDACi in Pankreaskarzinomzellen wirkt, bleibt unbeantwortet und bedarf weiterer Analysen.

5.6. Bedeutung von HDAC2 im murinen Pankreaskarzinommodell

Wie oben dargelegt, konnte bereits in verschiedenen Tumoren eine erhöhte HDAC2-Expression nachgewiesen und mit einer schlechten Prognose korreliert werden. Auch in 53 Zelllinien aus murinen Pankreastumoren sowie Gewebeschnitten aller Phasen der Tumorigenese konnte eine hohe Expression von HDAC2 beobachtet werden und legt eine wichtige Rolle von HDAC2 in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms nahe. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Bedeutung von HDAC2 *in vivo* im murinen Pankreaskarzinommodell untersucht werden. Hierzu wurde HDAC2 mittels des Cre/loxP-Systems pankreasspezifisch deletiert. Jedoch mussten sämtliche HDAC2-defizienten Tumormäuse (Genotyp $Hdac2^{loxP/loxP};Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}(LSL-R26^{Tva-lacZ})$) aufgrund von neuronalen Tumoren mit konsekutiven Lähmungen geopfert werden.

Die Cre-Rekombinase von $Ptf1a/p48^{Cre/+}$ -Mäusen wird neben dem Pankreas auch in Neuronen der Retina, im Cerebellum und dem dorsalen Neuralrohr exprimiert (Nakhai et al, 2007). Onkogenes KRAS^{G12D} und dominant negatives p53^{R172H} sind demnach in $Hdac2^{loxP/loxP};Ptf1a/p48^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}(LSL-R26^{Tva-lacZ})$ -Mäusen auch in diesen Geweben aktiv, was das Auftreten von neuronalen Tumoren erklärt. Dieses Modell ist daher nicht geeignet für eine Untersuchung des Überlebens von HDAC2-defizienten Tieren im Vergleich zu HDAC2-Wildtyp-Tieren. Zur Klärung dieser Frage bedarf es weiterführender Experimente, die im Rahmen dieser Dissertation nicht abschließend durchgeführt werden konnten. Diese Versuche beinhalten auch die Verwendung einer weiteren Cre-Mauslinie, wie z.B. $Pdx1-Cre$ (Hingorani et al, 2003), die keine Expression in neuronalen Geweben aufweist.

5.7. Mögliche Therapieansätze

VPA wurde bereits im Jahr 1882 erstmals synthetisiert, 1963 wurde seine anti-epileptische Wirkung entdeckt (Duenas-Gonzalez et al, 2008). In verschiedensten *in vitro*- und *in vivo*-Systemen konnte seitdem auch die Tumorstimmigkeit durch Auswirkungen auf Zellzyklus, Apoptose, Angiogenese, Metastasierung, Differenzierung und Seneszenz nachgewiesen werden (Duenas-Gonzalez et al, 2008). Obwohl VPA nicht so wirksam ist wie HDACi der neueren Generation, sprechen das bekannte Toxizitätsprofil, langfristige Sicherheitsdaten, die Wirtschaftlichkeit und die gute Gewebepenetranz für die Verwendung von VPA in klinischen Studien, besonders in Verbindung mit zytotoxischen Substanzen (Duenas-Gonzalez et al, 2008). Erste Studien dieser Art ergaben bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Verwendung von VPA allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika (Chateauvieux et al, 2010; Duenas-Gonzalez et al, 2008).

Da die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *NOXA* eine relevante Zielstruktur von VPA ist, sollten in der Therapie des Pankreaskarzinoms *NOXA*-aktivierende Substanzen wie Topoisomerase II- oder Proteasom-Inhibitoren für neue VPA/HDACi-Kombinationen berücksichtigt werden. Dies ist besonders wichtig, da in der vorliegenden Arbeit keine Synergie zwischen der HDAC2-Depletion und den Standard-Chemotherapeutika Gemcitabin, 5-FU und Oxaliplatin gezeigt werden konnte. Außerdem sollten auch Substanzen, die die extrinsische Apoptose induzieren, in Kombination mit HDACi in Betracht gezogen werden. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die HDAC2-Herunterregulation durch siRNA oder die HDAC2-Inhibition durch VPA in Pankreaskarzinomzellen auch zu einer Sensitivierung gegenüber TRAIL führt, allerdings in einer *NOXA*-unabhängigen Weise (Schüler et al, 2010). Eine spezifische Inhibition von HDAC2 in der Therapie des Pankreaskarzinoms scheint daher eine vielversprechende Option zur Aufhebung der Resistenz gegen DNA-Doppelstrangbrüche induzierende Chemotherapeutika und extrinsische Apoptosestimuli zu sein.

6. Zusammenfassung

In den letzten 20 Jahren konnte keine Verbesserung bezüglich der Behandlung von Patienten mit Pankreaskarzinom erzielt werden, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt noch immer bei maximal 6% (Jemal et al, 2010). Zwar sind einige grundlegende genetische Mechanismen in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms mittlerweile bekannt, jedoch gibt es nur wenige Daten zu epigenetischen Faktoren. Durch die Behandlung von Pankreaskarzinomzelllinien mit HDACi, die mehrere HDACs inhibieren, wurden diverse molekulare Veränderungen beschrieben. Erkenntnisse über die nicht-redundanten Isoenzym-spezifischen Funktionen der einzelnen HDACs und ihre Rolle im duktalem Adenokarzinom des Pankreas gibt es bisher jedoch kaum.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass HDAC2 in Gewebe-Microarrays humaner Pankreaskarzinome hoch exprimiert war und die Expression mit fortschreitender Malignität des Tumors anstieg. Diese Korrelation konnte auch auf mRNA-Ebene demonstriert werden.

In vitro konnte durch RNA-Interferenz gezeigt werden, dass die Depletion von HDAC2, aber nicht HDAC1, die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid erhöhte. Die Sensitivierung konnte auch bei HDAC2-Inhibition durch die Verwendung des HDACi VPA erreicht werden. Andere Chemotherapeutika (Gemcitabin, 5-FU, Oxaliplatin) führten jedoch zu keiner Sensitivierung, was auf einen spezifischen Mechanismus für DNA-Doppelstrangbrüche induzierende Substanzen hinweist. In Transkriptomanalysen nach siRNA-vermittelter HDAC2-Depletion in Pankreaskarzinomzelllinien wurde die Hochregulation des BH3-only Proteins *NOXA* beobachtet, was durch Verwendung von VPA validiert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass HDAC2 den *NOXA*-Promotor epigenetisch reguliert und die *NOXA*-Induktion nach HDAC2-Depletion für die Sensitivierung gegenüber Etoposid ausreichend ist. HDAC2 trägt demnach zur therapeutischen Resistenz gegenüber Etoposid bei, indem es die Expression des proapoptischen Gens *NOXA* inhibiert. Der entdeckte Signalweg könnte als Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dienen.

In den Transkriptomanalysen wurde zudem die Hochregulation von sieben Genen der Interferonantwort beobachtet. Durch die Verwendung des HDACi VPA konnte die Hochregulation von *DDX58* und *IFIH1* validiert werden. Jedoch konnte die *IFIH1*-aktivierende doppelsträngige RNA Poly(I:C) in Kombination mit VPA in Pankreaskarzinomzellen keine Verminderung der Viabilität herbeiführen.

In vivo konnte in einem konditionalen Mausmodell des Pankreaskarzinoms die hohe Expression von HDAC2 in allen Stadien der Tumorigenese beobachtet werden. In 53 Zelllinien, die aus murinen Pankreaskarzinomen isoliert worden waren, war HDAC2 die am stärksten exprimierte Histondeacetylase. Dies legt eine wichtige Rolle von HDAC2 in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms nahe. Aufgrund des Auftretens neuronaler Tumoren

im *Hdac2*^{loxP/loxP};*Ptf1a/p48*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+} (*LSL-R26*^{Tva-lacZ})-Mausmodell mit einer Penetranz von 100% kann eine Aussage über das Überleben HDAC2-defizienter Tumormäuse im Vergleich zu HDAC2-Wildtyp-Tumormäusen jedoch nicht getroffen werden.

7. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* **19**(5): 488-496

Ammerpohl O, Trauzold A, Schniewind B, Griep U, Pilarsky C, Grutzmann R, Saeger HD, Janssen O, Sipos B, Kloppel G, Kalthoff H (2007) Complementary effects of HDAC inhibitor 4-PB on gap junction communication and cellular export mechanisms support restoration of chemosensitivity of PDAC cells. *Br J Cancer* **96**(1): 73-81

Antignani A, Youle RJ (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 685-689

Bantscheff M, Hopf C, Savitski MM, Dittmann A, Grandi P, Michon AM, Schlegl J, Abraham Y, Becher I, Bergamini G, Boesche M, Dellling M, Dumpelfeld B, Eberhard D, Huthmacher C, Mathieson T, Poeckel D, Reader V, Strunk K, Sweetman G, Kruse U, Neubauer G, Ramsden NG, Drewes G (2011) Chemoproteomics profiling of HDAC inhibitors reveals selective targeting of HDAC complexes. *Nat Biotechnol* **29**(3): 255-265

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G (2009) Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* **119**(8): 2399-2411

Bicaku E, Marchion DC, Schmitt ML, Münster PN (2008) Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling. *Cancer Res* **68**(5): 1513-1519

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 769-784

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

Buchwald M, Krämer OH, Heinzl T (2009) HDACi--targets beyond chromatin. *Cancer Lett* **280**(2): 160-167

Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M (2010) Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* **2010**(pii: 479364): 1-18

de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, Jacks T (2002) Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2948-2953

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**(53): 8543-8567

Ding SW (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* **10**(9): 632-644

Donadelli M, Costanzo C, Beghelli S, Scupoli MT, Dandrea M, Bonora A, Piacentini P, Budillon A, Caraglia M, Scarpa A, Palmieri M (2007) Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochim Biophys Acta* **1773**(7): 1095-1106

- Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, Scupoli MT, Moore PS, Bassi C, Scarpa A, Palmieri M (2003) Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol Carcinog* **38**(2): 59-69
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008) Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* **34**(3): 206-222
- Fulda S, Debatin KM (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**(34): 4798-4811
- Glozak MA, Seto E (2007) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* **26**(37): 5420-5432
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**(24): 6969-6978
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459**(7243): 55-60
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* **10**(1): 32-42
- Häcker G, Weber A (2007) BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 150-155
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2008) Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* **7**: 64
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70
- Harms KL, Chen X (2007) Histone deacetylase 2 modulates p53 transcriptional activities through regulation of p53-DNA binding activity. *Cancer Res* **67**(7): 3145-3152
- Hijikata M, Kato N, Sato T, Kagami Y, Shimotohno K (1990) Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line. *J Virol* **64**(10): 4632-4639
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**(6): 437-450
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramandt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**(5): 469-483
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ (2001) Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* **25**(5): 579-586

- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **6**(8): 2969-2972
- Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, Raju GC, Hooi SC (2005) Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* **12**(4): 395-404
- Huang L (2006) Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol* **209**(3): 611-616
- Inoue S, Riley J, Gant TW, Dyer MJ, Cohen GM (2007) Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* **21**(8): 1773-1782
- Inoue S, Walewska R, Dyer MJ, Cohen GM (2008) Downregulation of Mcl-1 potentiates HDACi-mediated apoptosis in leukemic cells. *Leukemia* **22**(4): 819-825
- Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG, Jr. (2003) Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* **3**(4): 403-410
- Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K, Mano H (2005) Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. *Cancer Sci* **96**(7): 387-393
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* **15**(24): 3243-3248
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**(5532): 1074-1080
- Johnson CA, Padget K, Austin CA, Turner BM (2001) Deacetylase activity associates with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **276**(7): 4539-4542
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**(5897): 1801-1806
- Jonkers J, Berns A (2002) Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(4): 251-265
- Jurkin J, Zupkovitz G, Lagger S, Grausenburger R, Hagelkruys A, Kenner L, Seiser C (2011) Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **10**(3)

- Kaler P, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L, Klampfer L (2008) HDAC2 deficiency sensitizes colon cancer cells to TNF α -induced apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity. *Exp Cell Res* **314**(7): 1507-1518
- Katze MG, He Y, Gale M, Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**(9): 675-687
- Krämer OH (2009) HDAC2: a critical factor in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* **30**(12): 647-655
- Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* **22**(13): 3411-3420
- Kumagai T, Wakimoto N, Yin D, Gery S, Kawamata N, Takai N, Komatsu N, Chumakov A, Imai Y, Koeffler HP (2007) Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* **121**(3): 656-665
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* **21**(11): 2672-2681
- Lallemand C, Blanchard B, Palmieri M, Lebon P, May E, Tovey MG (2007) Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene* **26**(3): 328-338
- Langer R, Mutze K, Becker K, Feith M, Ott K, Hofler H, Keller G (2010) Expression of class I histone deacetylases (HDAC1 and HDAC2) in oesophageal adenocarcinomas: an immunohistochemical study. *J Clin Pathol* **63**(11): 994-998
- Lehmann A, Denkert C, Budczies J, Buckendahl AC, Darb-Esfahani S, Noske A, Müller BM, Bahra M, Neuhaus P, Dietel M, Kristiansen G, Weichert W (2009) High class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **9**: 395
- Liu G, McDonnell TJ, Montes de Oca Luna R, Kapoor M, Mims B, El-Naggar AK, Lozano G (2000) High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4174-4179
- Lund AH, van Lohuizen M (2004) Epigenetics and cancer. *Genes Dev* **18**(19): 2315-2335
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R (2005) Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* **25**(3): 261-309
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Münster PN (2005a) In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates. *Mol Cancer Ther* **4**(12): 1993-2000
- Marchion DC, Bicaku E, Turner JG, Daud AI, Sullivan DM, Münster PN (2005b) Synergistic interaction between histone deacetylase and topoisomerase II inhibitors is mediated through topoisomerase IIbeta. *Clin Cancer Res* **11**(23): 8467-8475

- Marchion DC, Bicaku E, Turner JG, Schmitt ML, Morelli DR, Münster PN (2009) HDAC2 regulates chromatin plasticity and enhances DNA vulnerability. *Mol Cancer Ther* **8**(4): 794-801
- Martin AG, Trama J, Crighton D, Ryan KM, Fearnhead HO (2009) Activation of p73 and induction of Noxa by DNA damage requires NF-kappa B. *Aging (Albany NY)* **1**(3): 335-349
- Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(1): 38-51
- Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, Sugimoto K, Batmunkh E, Kanemura H, Morine Y, Shimada M (2008) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* **36**(3): e1-9
- Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN (2007) Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* **21**(14): 1790-1802
- Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN (2009) Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(19): 7876-7881
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W (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. *J Clin Oncol* **25**(15): 1960-1966
- Münster P, Marchion D, Bicaku E, Lacevic M, Kim J, Centeno B, Daud A, Neuger A, Minton S, Sullivan D (2009a) Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res* **15**(7): 2488-2496
- Münster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush R, Sullivan D, Daud A (2007) Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol* **25**(15): 1979-1985
- Münster PN, Marchion D, Thomas S, Egorin M, Minton S, Springett G, Lee JH, Simon G, Chiappori A, Sullivan D, Daud A (2009b) Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. *Br J Cancer* **101**(7): 1044-1050
- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GI, Schmid RM (2007) Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* **134**(6): 1151-1160
- Neureiter D, Zopf S, Leu T, Dietze O, Hauser-Kronberger C, Hahn EG, Herold C, Ocker M (2007) Apoptosis, proliferation and differentiation patterns are influenced by Zebularine and SAHA in pancreatic cancer models. *Scand J Gastroenterol* **42**(1): 103-116
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM (2006) Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 125-136

- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468): 1053-1058
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T (2004) Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**(6): 847-860
- Ouaissi M, Cabral S, Tavares J, da Silva AC, Mathieu Daude F, Mas E, Bernard J, Sastre B, Lombardo D, Ouaissi A (2008a) Histone deacetylase (HDAC) encoding gene expression in pancreatic cancer cell lines and cell sensitivity to HDAC inhibitors. *Cancer Biol Ther* **7**(4): 523-531
- Ouaissi M, Sielezneff I, Silvestre R, Sastre B, Bernard JP, Lafontaine JS, Payan MJ, Dahan L, Pirro N, Seitz JF, Mas E, Lombardo D, Ouaissi A (2008b) High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. *Ann Surg Oncol* **15**(8): 2318-2328
- Piacentini P, Donadelli M, Costanzo C, Moore PS, Palmieri M, Scarpa A (2006) Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation. *Virchows Arch* **448**(6): 797-804
- Richter A, Niedergethmann M, Sturm JW, Lorenz D, Post S, Trede M (2003) Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience. *World J Surg* **27**(3): 324-329
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386
- Ruggeri B, Zhang SY, Caamano J, DiRado M, Flynn SD, Klein-Szanto AJ (1992) Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene* **7**(8): 1503-1511
- Ryu JK, Lee WJ, Lee KH, Hwang JH, Kim YT, Yoon YB, Kim CY (2006) SK-7041, a new histone deacetylase inhibitor, induces G2-M cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett* **237**(1): 143-154
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**(16): 2861-2874
- Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T (2008) Histone deacetylase inhibitor FK228 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. *Mol Cancer Ther* **7**(4): 779-787
- Sato N, Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Ninomiya I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Miwa K (2004) FR901228, a novel histone deacetylase inhibitor, induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in refractory human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* **24**(3): 679-685
- Sauer B (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**(4): 381-392

- Schneider G, Krämer OH, Fritsche P, Schüler S, Schmid RM, Saur D (2010) Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* **14**(6A): 1255-1263
- Schneider G, Krämer OH, Schmid RM, Saur D (2011) Acetylation as a Transcriptional Control Mechanism-HDACs and HATs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Gastrointest Cancer* **42**(2): 85-92
- Schneider G, Reichert M, Saur D, Hamacher R, Fritsch R, Schmid RM (2007) HDAC3 is linked to cell cycle machinery in MiaPaCa2 cells by regulating transcription of *skp2*. *Cell Prolif* **40**(4): 522-531
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* **128**(6): 1606-1625
- Schüler S, Fritsche P, Diersch S, Arlt A, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2010) HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* **9**: 80
- Seidler B, Schmidt A, Mayr U, Nakhai H, Schmid RM, Schneider G, Saur D (2008) A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10137-10142
- Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**(18): 2233-2238
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**(9): 834-839
- Takeuchi O, Akira S (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* **227**(1): 75-86
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF (2003) Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **983**: 84-100
- Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, Zhang M, Zhu W, Wang T, Floss T, Göttlicher M, Noppinger PR, Wurst W, Ferrari VA, Abrams CS, Gruber PJ, Epstein JA (2007) Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med* **13**(3): 324-331
- Tsai SC, Valkov N, Yang WM, Gump J, Sullivan D, Seto E (2000) Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet* **26**(3): 349-353
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**(5647): 1036-1038
- von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D (2009) E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* **137**(1): 361-371, 371 e361-365
- Wang W, Gao J, Man XH, Li ZS, Gong YF (2009) Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. *Oncol Rep* **21**(6): 1439-1447

- Weichert W (2009) HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett* **280**(2): 168-176
- Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Rocken C (2008a) Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* **9**(2): 139-148
- Weichert W, Röske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C (2008b) Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **14**(6): 1669-1677
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* **281**(19): 13548-13558
- Wilting RH, Yanover E, Heideman MR, Jacobs H, Horner J, van der Torre J, DePinho RA, Dannenberg JH (2010) Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *EMBO J* **29**(15): 2586-2597
- Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, Brandl M, Jaeckel S, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2011) A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. *Pancreas* **40**(1): 144-150
- Yamaguchi T, Cubizolles F, Zhang Y, Reichert N, Kohler H, Seiser C, Matthias P (2010) Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. *Genes Dev* **24**(5): 455-469
- Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 206-218
- Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR (2009) HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* **12**(7): 829-838
- Zhu P, Huber E, Kiefer F, Göttlicher M (2004a) Specific and redundant functions of histone deacetylases in regulation of cell cycle and apoptosis. *Cell Cycle* **3**(10): 1240-1242
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M (2004b) Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**(5): 455-463
- Zimmermann S, Kiefer F, Prudenziati M, Spiller C, Hansen J, Floss T, Wurst W, Minucci S, Göttlicher M (2007) Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice. *Cancer Res* **67**(19): 9047-9054
- Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T, Seiser C (2006) Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* **26**(21): 7913-7928

8. Eigene Veröffentlichungen

Fritsche P, Seidler B, Schüler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2009) HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut* **58**(10): 1399-1409

Schneider G, Krämer OH, Fritsche P, Schüler S, Schmid RM, Saur D (2010) Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* **14**(6A): 1255-1263

Schüler S, Fritsche P, Diersch S, Arlt A, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2010) HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* **9**: 80

Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, Brandl M, Jaeckel S, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2011) A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. *Pancreas* **40**(1): 144-150

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Günter Schneider für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des spannenden Themas. Seine exzellente Betreuung sowie die zahlreichen konstruktiven Ideen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Auch Frau Prof. Angelika Schnieke danke ich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens und das große Interesse an meiner Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Dieter Saur bedanke ich mich für die umfangreiche Anleitung im Umgang mit den Mäusen und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit.

Dankbar bin ich auch Herrn Dr. Jörg Mages für die Fertigstellung und Auswertung der Microarrays sowie Frau Sandra Baumann, Frau Sandra Diersch und Frau Annika Henrich für die kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor ein herzliches Dankeschön für die freundschaftliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die Unterstützung während der Zeit der Erstellung dieser Dissertation und meines Studiums.