

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)
Signalweg kontrolliert das E2F1 Gen im
Pankreaskarzinom**

Carolin Michela Schild

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg kontrolliert das E2F1 Gen im Pankreaskarzinom

Carolin Michela Schild

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. G. Schneider
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 28.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 26.09.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I

Abkürzungsverzeichnis

IV

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

VII

1 Einleitung

1

1.1 Das Pankreaskarzinom

1

1.2 Der PI3K – AKT Signalweg

2

1.3 Die Rolle von AKT bezüglich Zellproliferation und Zellüberleben

3

1.4 Mechanismen der Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs im Pankreaskarzinom

5

1.5 Das Protoonkogen c-Myc

5

1.6 Die E2F Familie und das Pocket Protein RB

7

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

9

2 Material und Methoden

10

2.1 Material

10

2.1.1 Geräte

10

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

10

2.1.3 Chemikalien

11

2.1.4 Kommerziell erhältliche Kits

12

2.1.5 Lösungen und Puffer

13

2.1.6 Antikörper

14

2.1.7 PCR-Primer und Oligonukleotide

14

2.1.8 Small interfering RNA (siRNA)

15

2.1.9 Luziferasereporter-Gen-Analyse

15

2.1.10 Zelllinien

16

2.2 Experimentalmethoden

16

2.2.1 Zellkultur

16

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur	16
2.2.1.2 Chemische Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase	16
2.2.1.3 Chemische Inhibition der c-Myc/Max-Interaktion	17
2.2.1.4 Chemische Inhibition der Glykogensynthasekinase-3	17
2.2.1.5 Chemische Inhibition der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α	17
2.2.1.6 siRNA Transfektion	18
2.2.1.7 Ganzzellextrakte	18
2.2.2 Westernblot	19
2.2.3 Luziferasereportergen Assay	22
2.2.4 Avidin-Biotin-Komplex-DNA-Bindungs-(ABCD) Assay	23
2.2.5 Semiquantitative PCR	24
2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	27
3 Ergebnisse	31
<hr/>	
3.1 E2F1 ist essentiell für die G₁/S-Phasenprogression im Pankreaskarzinom	31
3.1.1 E2F1 induziert die Expression zellzyklusrelevanter Gene	31
3.1.2 E2F1 steuert die Zellzyklusprogression in Abhängigkeit von der PI3-Kinase	32
3.2 E2F1 wird in Pankreaskarzinomzellen verstärkt exprimiert	33
3.3 Der PI3K-Signalweg kontrolliert die Transkription des E2F1Gens in Pankreaskarzinomzellen	34
3.4 c-Myc kontrolliert die E2F1 Expression in den Pankreaskarzinomzellen	36
3.5 E2F1 und c-Myc werden durch die katalytische PI3-Kinase Untereinheit p110α reguliert	39
3.6 Der PI3K-Signalweg kontrolliert die c-Myc Expression durch die Glykogensynthasekinase-3	41
3.7 c-Myc bindet an die E-Box des E2F1 Promotors	42
4 Diskussion	45
<hr/>	
4.1 Der PI3K – AKT – GSK-3 Signalweg reguliert die Expression von c-Myc im Pankreaskarzinom	45
4.2 c-Myc verbindet den PI3K – AKT Signalweg mit dem E2F1 Gen	46
4.3 E2F1 und Zellzyklusprogression in Pankreaskarzinomzellen	48
4.4 E2F1 aktiviert über einen positiven Feedback-Mechanismus den PI3K – AKT Signalweg	49
4.5 Ausblicke	50

Inhaltsverzeichnis	III
5 Zusammenfassung	51
6 Literaturverzeichnis	52
Curriculum vitae	60
Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère	D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
Abb.	Abbildung	DMSO	Dimethylsulfoxid
AFX	acute-lymphocyticleukemia-1 fused gene from chromosome X	DNA	Desoxyribonucleid acid
Ak	Antikörper	DNase	Desoxyribonuklease
AKT	Proteinkinase B	dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
AMPK α 2	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2	DR	Death Receptor
APC	anaphase promoting complex	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor
ATM	ataxia telangiectasia mutated kinase	et al.	et alii (und andere)
ATP	Adenosintriphosphat	Fas	Fibroblast-associated antigen
ATR	ataxia telangiectasia and rad-3-related kinase	FasL	Fas-Ligand
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death	FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
Bax	Bcl-2-associated X protein	FKHR	Family of Forkhead transcription factors
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2	FKHRL1	Forkhead transcription factor like 1
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large	FLICE	Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death	FLIP	FLICE inhibitory protein
BSA	Bovines Serumalbumin	g	Gramm (ng, μ g, mg)
C	Celsius	Gab2	Grb2-associated binder 2
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-specific protease	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Cdk	Cyclin-dependent kinase	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA	G-Phase	Gap-Phase
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	GSK-3	Glykogensynthasekinase-3
CHK1/2	Checkpoint kinase 1/2	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	HMGA1	High mobility group AT-hook 1
cRNA	komplemetäre RNA	IGF-1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor-1
Cyp26b1	Cytochrom P450 26b1	I κ B	Inhibitor of κ B
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	IKK	I κ B Kinase

INK4	Inhibitor of Cdk4	PKB	Proteinkinase B
IP	Immunpräzipitation	PRKAA/2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat-1	PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert in Chromosom 10
kD	Kilodalton	PVDF	Polyvinylidenfluorid
K-Ras	Kirsten Rat Sarcoma	Rb	Retinoblastoma Protein
l	Liter (μ l, ml)	RNA	Ribonucleid Acid
M	Molar (μ M, mM)	RNase	Ribonuklease
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	rpm	rotations per minute
Mdm2	Murine double minute 2	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
M-Phase	Mitose-Phase	SCF	SKP1-Cullin-F-Box Protein
mRNA	Messenger-RNA	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
MTCP1	mature T cell proliferation 1	Ser	Serin
mTOR	Mammalian target of rapamycin	siRNA	Small interfering RNA
NF-ATc1	Nuclear factor of activated T-cells c1	SMAD 4	small mother against decapentaplegia 4
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B	SKP2	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2
nm	Nanometer	S-Phase	Synthese-Phase
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol	Tab.	Tabelle
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese	TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie	Thr	Threonin
PBS	Phosphat Buffered Saline	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TP53	Tumorsuppressorprotein 53
PDAC	Pankreatisch duktales Adenokarzinom	TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Factor
PDK1/2	3-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1/2	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PH	Pleckstrin homolgy	TSC1/2	Tuberous sclerosis 1/2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	UV	ultraviolett
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat	w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen

WB	Westernblot		
----	-------------	--	--

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des PI3K – AKT Signalwegs	4
Abb. 2: Der PI3K/AKT Signalweg steuert SKP2 via E2F1	9
Abb. 3: ABCD-Assay	23
Abb. 4: Prinzip der ChIP	28
Abb. 5: E2F1 steuert die G ₁ /S-Phasenprogression durch Induktion zellzyklusrelevanter Gene	32
Abb. 6: E2F1 induziert die Transkription des Cyclin A Gens in Abhängigkeit von der PI3-Kinase	32
Abb. 7: E2F1 ist im Pankreaskarzinom verstärkt exprimiert	33
Abb. 8: Die PI3-Kinase kontrolliert die E2F1 mRNA-Expression	34
Abb. 9: Die E2F1 Promotoraktivität wird spezifisch durch die PI3-Kinase reguliert	35
Abb. 10: Der PI3K-Signalweg kontrolliert die Transkription von E2F1 und p21 ^{Cip1}	36
Abb. 11: Die PI3-Kinase steuert die Expression von c-Myc und E2F1	37
Abb. 12: Der c-Myc Knockdown inhibiert in PDAC Zellen die E2F1 Expression auf Protein- und mRNA-Ebene	38
Abb. 13: c-Myc kontrolliert die E2F1 Protein- und mRNA-Expression	39
Abb. 14: Die PI3-Kinase reguliert über die katalytische Untereinheit p110 α die Expression von c-Myc und E2F1	40
Abb. 15: Der Knockdown der katalytischen PI3-Kinase Untereinheit p110 α inhibiert die c-Myc E2F1 Expression	41
Abb. 16: Die PI3-Kinase kontrolliert die Expression von c-Myc in Abhängigkeit von der Glykogensynthasekinase-3	42
Abb. 17: Humaner E2F1 Genpromotor	42
Abb. 18: Aktives c-Myc bindet spezifisch an die c-Myc Konsensussequenz innerhalb des E2F1 Promotors	43
Abb. 19: Die PI3-Kinase reguliert die Bindung von c-Myc an die E2F1 E-Box	44
Abb. 20: Der PI3K – AKT Signalweg reguliert die Expression von E2F1 via GSK-3 und c-Myc	47

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Abkürzungsverzeichnis	IV
Tab. 2: Geräte	10
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	10
Tab. 4: Chemikalien	11

Tab. 5: Kommerziell erhältliche Kits	12
Tab. 6: Puffer für ChIP	13
Tab. 7: Puffer für Westernblot	13
Tab. 8: Puffer für Agarosegel	14
Tab. 9: Primäre Antikörper	14
Tab. 10: Sekundäre Antikörper	14
Tab. 11: Primersequenzen für semiquantitative PCR	14
Tab. 12: Oligonukleotidsequenzen für ChIP-PCR	15
Tab. 13: Oligonukleotidsequenzen für ABCD-Assay	15
Tab. 14: siRNA-Sequenzen	15
Tab. 15: Polyacrylamid-Trenngele und Sammelgel	20
Tab. 16: RT-PCR Pipettieransatz	25
Tab. 17: Standard-PCR-Reaktionsansatz	26

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

In über 95% aller exokriner Pankreaskarzinome handelt es sich um das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (Warshaw et Fernández-del Castillo, 1992). Die Prognose des duktales Pankreaskarzinoms ist nahezu immer infaust, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 5% (Schneider et Schmid, 2005). Nach Angaben der American Cancer Society wurde im Jahr 2007 bei 37 170 Amerikanern ein Pankreaskarzinom diagnostiziert. 33 370 der Patienten verstarben noch im selben Jahr daran. Das Pankreaskarzinom stellt damit die 4. häufigste Todesursache unter allen bösartigen Krebserkrankungen dar, bei einer jährlichen Inzidenz von nur 10/100.000 Fällen (Am. Cancer Soc., 2007; Schneider et al., 2005). Das mittlere Überleben für Patienten mit PDAC beträgt 4–6 Monate. Das liegt einerseits an der späten klinischen Manifestation, wenn die Erkrankung bereits weit fortgeschritten ist, andererseits am schlechten Ansprechen des duktales Pankreaskarzinoms auf jegliche Art von Chemo- und Strahlentherapie (Hingorani et al., 2003). Gemcitabin ist bislang das Standardtherapeutikum, die objektiven Ansprechraten liegen jedoch nur bei 10% (Arlt et al., 2003; Ng et al., 2001; Eckel et al., 2006).

Die chirurgisch vollständige Tumoresektion scheint somit bislang die einzige Option auf Heilung zu sein (Sohn et al., 2000; Winter et al., 2006; Li et al., 2004). Allerdings überleben nur annähernd 20% von den 10% der Patienten mit resezierbarem PDAC die nächsten 5 Jahre (Eckel et al., 2006). Die große Mehrheit operierter Patienten mit kleinem Primärtumor (<2cm), tumorfreien Resektionsrändern (R0) sowie negativem Lymphknotenstatus erleidet ein Tumorrezidiv (Allison et al., 1998; Yeo et al., 2002).

Da auch moderne molekulare Therapeutika keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigen, ist ein besseres Verständnis dieser Tumorerkrankung auf molekularer Ebene sowie die präklinische Evaluierung potentieller Zielstrukturen unabdingbar.

Die Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms verläuft über die so genannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Dabei handelt es sich um nicht-invasive präneoplastische Vorläuferläsionen, welche in PanIN-1A/1B (geringe Dysplasie), PanIN-2 (mittelgradige Dysplasie) und PanIN-3 (hochgradige Dysplasie, „Carcinoma-in-situ“) unterteilt werden (Schneider et al., 2005; Koorstra, Feldmann et al., 2008). Dieses morphologische Progressionsmodell zeigt, dass sich das Pankreaskarzinom, ähnlich wie

andere epitheliale Tumore, über fortschreitende, histologische Veränderungen des Epithels entwickelt und wurde mit einem genetischen Progressionsmodell korreliert. Hierbei zeigt sich eine progressive Anhäufung genetischer Veränderungen, die die histologische Entwicklung von der frühen PanIN-1A Läsion zur hochgradigen PanIn-3 Läsion begleiten (Feldmann et al., 2007). Die molekularen Veränderungen in den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien können als „frühe“, „intermediäre“ oder „späte“ genetische Läsionen klassifiziert werden.

Mutationen des Onkogens K-RAS und des Tumorsuppressorgens INK4a wurden entsprechend als frühe genetische Veränderungen beschrieben. Die Hochregulation des Cyclin D1 Gens gilt als intermediäre genetische Läsion. Späte molekulare Läsionen sind Mutationen der Tumorsuppressorgene TP53, BRCA2 und SMAD4 (Schneider et al., 2005; Hezel et al., 2006; Feldmann et al., 2007).

Onkogenes K-RAS (Chromosom 12p) wird in annähernd 90% aller Pankreaskarzinome durch eine Punktmutation, welche am häufigsten in Kodon 12, aber auch in Kodon 13 und 61 auftritt, aktiviert. Ras-Protein, das Genprodukt von K-RAS reguliert die Zellzyklusprogression durch Aktivierung der MAPK- (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und PI3K/AKT-Kaskaden (Feldmann et al., 2007; Koorstra, Hustinx et al., 2008). Hinsichtlich der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms beinhaltet onkogenes K-RAS eine initiiierende Funktion. So konnte an Hand eines genetisch definierten Mausmodells nachgewiesen werden, dass onkogenes K-RAS^{G12D} vom endogenen Promotor aus, pankreas-spezifisch exprimiert wird (Hingorani et al., 2003).

1.2 Der PI3K – AKT Signalweg

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg ist in 60% aller duktaalen Pankreaskarzinome konstitutiv aktiviert und ein typischer „pro-survival pathway“ (Schlieman et al., 2003, Hamacher et al., 2008). PI3K und AKT übermitteln Wachstumssignale an die Zellen und verhindern, dass diese in Apoptose gehen (Takeda et al., 2004; Semba et al., 2003). Die physiologische Aktivierung des PI3K-Signalwegs erfolgt durch Rezeptor-Tyrosinkinasen wie beispielsweise dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktorrezeptor-1 (IGF-1R), durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sowie durch onkogenes Ras (LoPiccolo et al., 2008). Der PI3K–AKT Signalweg spielt im Pankreaskarzinom eine bedeutende Rolle bezüglich Zellüberleben, Proliferation, G₁/S-Phase Transition, Tumorwachstum und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Asano et al., 2005; Liang et Slingerland, 2003; Reichert et al., 2007).

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen bilden eine Familie von Lipidkinasen. Je nach Struktur, Substratspezifität, Gewebsverteilung und Aktivierungsmechanismus werden diese in 3 Klassen unterteilt (Bader et al., 2005). Die Phosphatidylinositol-3-Kinase der Klasse IA ist ein Heterodimer, welches sich aus einer katalytischen Untereinheit (z.B. p110 α) und einer regulatorischen Untereinheit (z.B. p85) zusammensetzt. In nicht teilungsaktiven Zellen bindet p85 stabilisierend an p110 α und hemmt somit dessen Kinaseaktivität. Die aktivierte PI3-Kinase überführt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). PIP₃ bewirkt, dass sämtliche Proteine mit einer so genannten „*pleckstrin homology domain*“ (PH-Domäne) an die Zellmembran translozieren. Zu diesen gehören AKT und die 3-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1), beides Serin/Threonin Kinasen, sowie die 3-Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 2 (PDK2) (Bader et al., 2005; Fresno Vara et al., 2004; Chang et al., 2003). Durch die Interaktion von PIP₃ mit der PH-Domäne von AKT durchläuft AKT eine Konformationsänderung und wird anschließend von der PDK1 am Threonin 308 phosphoryliert und aktiviert (Osaki et al., 2004).

1.3 Die Rolle von AKT bezüglich Zellproliferation und Zellüberleben

Aktiviertes AKT begünstigt das Tumorzellüberleben durch die direkte Phosphorylierung und damit Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine. Darunter fallen Bad aus der Bcl-2 Familie und Caspase-9. Durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (AFX, FKHR und FKHL1) hemmt AKT die Transkription pro-apoptotischer Proteine, wie FasL und Bim (Bader et al., 2005; Fresno Vara et al., 2004).

Durch die Aktivierung der I κ B-Kinase führt AKT indirekt zur nukleären Translokation und Aktivierung von NF κ B (Chang et al., 2003; Osaki et al., 2004). NF κ B wiederum induziert die Transkription anti-apoptotischer Proteine und scheint im Pankreaskarzinom eine essentielle Rolle hinsichtlich der Resistenz gegenüber Gemcitabin zu spielen (Chang et al., 2003; Arlt et al., 2003). AKT reguliert indirekt auch das Tumorsuppressorprotein p53. Durch Phosphorylierung des Mdm-2 Proteins, einem wichtigen negativen Regulator von p53, destabilisiert AKT nukleäres p53 und führt zu dessen Degradation im Zytoplasma (Fresno Vara et al., 2004). Durch die Phosphorylierung von mTOR erhöht AKT die Proteinbiosynthese. Phosphoryliertes, aktiviertes mTOR fördert die mRNA-Translation von Proteinen, die für die Zellzyklusprogression entscheidend sind, wie beispielsweise Cyclin D1. Ein weiteres wichtiges Substrat von AKT ist die Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3). AKT inaktiviert die GSK-3 durch Phosphorylierung am N-Terminus und stabilisiert somit deren

Substrate Cyclin D und c-Myc, welche ansonsten von der GSK-3 phosphoryliert und damit für die proteasomale Degradation markiert werden würden (Osaki et al., 2004; Fresno Vara et al., 2004; Chang et al., 2003; Bader et al., 2005; Asano et al., 2004). Phosphoryliertes AKT fördert demnach einerseits die Zellproliferation, andererseits verhindert es, dass die Zellen in Apoptose gehen. Erhöhte Level an phosphoryliertem AKT, wie man sie im Pankreaskarzinom findet, wirken der durch Zytostatika-induzierten Apoptose entgegen und tragen damit zur therapeutischen Resistenz des duktaalen Pankreaskarzinoms bei (Ng et al., 2001).

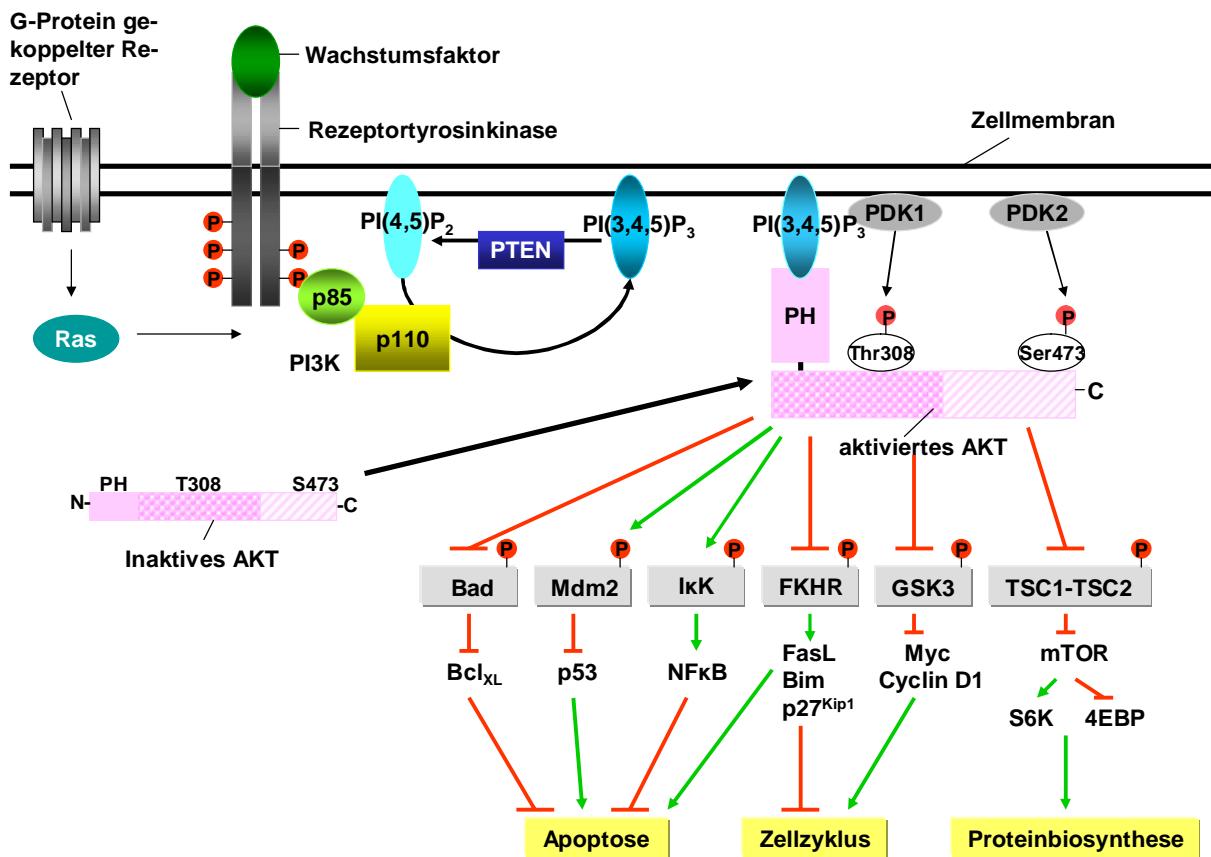


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PI3K–AKT Signalwegs. Modifiziert nach Jiang et Liu, 2008; Fresno Vara et al., 2004 und Osaki et al., 2004.

1.4 Mechanismen der Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs im Pankreaskarzinom

Die anhaltende Aktivierung des PI3K–AKT Signalwegs im Pankreaskarzinom führt zu einem vollständigen Verlust der Wachstumskontrolle und konsekutiv zur neoplastischen Transformation. Wie es zur konstitutiven Aktivierung des PI3K–AKT Signalwegs kommt, ist nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Erklärung ist die niedrige bis fehlende Expression des Tumorsuppressorgens PTEN, dem natürlichen Antagonisten der PI3-Kinase, in 75% aller pankreatischer Adenokarzinome (Asano et al., 2004; Hamacher et al., 2008; Planchon et al., 2008). Darüber hinaus konnte in 10% aller Pankreaskarzinome eine Amplifikation und Überexpression von AKT2 beobachtet werden (Asano et al., 2005).

Die anhaltende Aktivierung des PI3K–AKT Signalwegs scheint durch Rezeptortyrosinkinasen und durch Mediatoren, wie dem Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) gegeben zu sein. IRS-1 wird im Pankreaskarzinom überexprimiert und durch eine bislang nicht ermittelte Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert. Diese phosphoryliert IRS-1 an dessen YXXM-Motiven (Y = Tyrosin, X = beliebige Aminosäure, M = Methionin) und induziert dadurch indirekt die Aktivierung der PI3-Kinase (Bergmann et al., 1996; Asano et al., 2005).

Es wurde gezeigt, dass auch HMGA1 die konstitutive Aktivierung des PI3K–AKT Signalwegs vermittelt. Bei den HMGA1-Proteinen handelt es sich um architekturelle Transkriptionsfaktoren, die im Pankreaskarzinom in stark überexprimierter Form vorliegen und zu unkontrollierter Zellteilung führen. HMGA1 bildet zusammen mit dem Transkriptionsfaktor C/EBP β einen Komplex, der an den Promotor des Insulinrezeptors bindet und somit dessen Transkription aktiviert. Die Aktivierung des Insulinrezeptors bewirkt die Translation von Cyclin D1 und trägt zur Induktion des PI3K–AKT Signalwegs im duktalem Pankreaskarzinom bei (Kolb et al., 2007; Liao et al., 2006; Liao et al., 2007; Hamacher et al., 2008). Zusätzlich fördert HMGA1 über einen AKT-abhängigen Mechanismus die Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin (Liao et Whang, 2008).

Die Überexpression zahlreicher Rezeptor-Tyrosinkinasen und die dauerhafte Aktivierung von onkogenem Ras im Pankreaskarzinom können ebenfalls an der konstitutiven Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs beteiligt sein (Ng et al., 2000).

1.5 Das Protoonkogen c-Myc

Das c-Myc Onkoprotein ist ein basischer Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper (bHLH/LZ) Transkriptionsfaktor. c-Myc heterodimerisiert mit dem kleinen, ubiquitär vorkommenden

bHLH/LZ Protein Max und bindet an das E-Box Motiv CACGTG, welches in zahlreichen Zielgenen von c-Myc, die direkt für die Regulation von Zellwachstum und Proliferation verantwortlich sind, vorkommt. Die Dimerisierung mit Max ist essentiell für die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von c-Myc (Eilers et Eisenman, 2008; Meyer et Penn, 2008; Prendergast, 1999).

Im humanen Pankreaskarzinom findet man sehr häufig eine deregulierte Expression des Protoonkogens c-Myc (Skoudy et al., 2011). Die Beteiligung von c-Myc an der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms konnte an Hand von in-vivo Studien eindeutig nachgewiesen werden. So wurde zunächst mittels chemischer Karzinogenese die Entstehung von Pankreaskarzinomen in Ratten induziert. Hierbei zeigte sich eine Überexpression von c-Myc. Im Weiteren wurde die Bedeutung von c-Myc im PDAC in transgenen Ela-c-Myc Mäusen demonstriert. In diesem transgenen Mausmodell, war c-Myc unter der Kontrolle des Elastase Promotors, welcher konstitutiv im azinären Kompartiment aktiv ist, exprimiert (Skoudy et al., 2011). In den transgenen Ela-c-Myc Mäusen bildete sich in einem Alter von 2–7 Monaten mit einer Inzidenz von 100 Prozent ein azinäres oder gemischt azinär-duktales Pankreaskarzinom (Sandgren et al., 1991). Darüber hinaus fand sich eine gesteigerte c-Myc Expression in den PanIN Läsionen in Kras-Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass c-Myc für die Initiierung einer neoplastischen Zelltransformation und die Tumorprogression im Pankreaskarzinom von essentieller Bedeutung ist (Mazur et al., 2010).

Neben der Zellproliferation kann c-Myc aber auch Apoptose vermitteln. Die Induktion von Apoptose ist eine essentielle intrinsische Funktion von c-Myc, die dessen onkogenes Potential limitiert (Dansen et al., 2006). Mit Hilfe eines abgeänderten MycER^{TAM} Modells konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass für die Einleitung tumorsuppressiver Mechanismen, insbesondere von Apoptose, eine stark erhöhte c-Myc Expression erforderlich ist. Bei gering erhöhter c-Myc Expression kommt es lediglich zu einer Zellproliferation ohne Einleitung von Apoptose (Murphy et al., 2008; Soucek et Evan, 2010).

Biliran et al. konnten zeigen, dass eine ektope Überexpression von c-Myc eine erhöhte Sensitivität muriner und humaner Pankreaskarzinomzellen gegenüber Cisplatin und anderen Chemotherapeutika bewirkt. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus für die gesteigerte Chemosensibilität der Zellen beruht dabei auf einer Inhibition der Cyclin D1 sowie der NFκB Expression (Biliran et al., 2007).

Dennoch ist in humanen Pankreaskarzinomzellen bislang wenig über die genauen molekularen Mechanismen, die den Proteinumsatz von c-Myc kontrollieren sowie die Signalwege, welche c-Myc mit den Zielgenen der Zellzyklusmaschinerie verbinden, bekannt.

1.6 Die E2F Familie und das Pocket Protein RB

Die E2F Familie kann aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten und Homologien in 3 Subfamilien unterteilt werden. Die Mitglieder der E2F1, 2 und 3a Subfamilie beinhalten die Funktion transkriptioneller Aktivatoren von Zielgenen, die für den G₁/S-Phasen-Übergang und folglich für die Zellzyklusprogression relevant sind. Sie werden zellzyklusabhängig exprimiert (Attwooll et al., 2004). Anders als die anderen aktivierenden E2F-Familienmitglieder (E2F2 und 3a), spielt E2F1 auch bei zellulärem Stress eine wichtige Rolle. So bewirkt die DNA-Damage induzierte Aktivierung von ATM, ATR und der Kontrollpunktkinasen CHK2 und CHK1 die spezifische Phosphorylierung und Akkumulation von E2F1, nicht jedoch die von E2F2 oder 3 (Hallstrom et al., 2008, Lin et al., 2001). Die Mitglieder der E2F4 und 5 Subfamilie dagegen wirken repressiv auf die Transkription. Sie verfügen über ein nukleäres Exportsignal und sind vorzugsweise in G₀/G₁-Zellen nukleär lokalisiert, wo sie an RB oder die RB-Homologen p107 und p130 gebunden sind. E2F4 und 5 werden Zellzyklus-unabhängig exprimiert und ihre Hauptaufgabe scheint die Induktion von Zellzyklus-Exit und Differenzierung zu sein (Attwooll et al., 2004). Die Mitglieder der E2F6, 7 und 8 Subfamilie beinhalten ebenfalls Repressorfunktion, obliegen jedoch nicht der Kontrolle durch Mitglieder der Retinoblastoma-Protein (RB) Familie (Attwooll et al., 2004). Paradoxaerweise können die E2F-Transkriptionsfaktoren, insbesondere E2F1, sowohl Zellproliferation als auch den programmierten Zelltod induzieren (Iaquinta et Lees, 2007). So bewirkt die Überexpression der aktivierenden E2F Familienmitglieder (E2F1, 2 und 3a) einerseits den Eintritt in die S-Phase, andererseits führt die forcierte Expression von E2F1 in PDAC Zellen zur Apoptoseinduktion (DeGregori et Johnson, 2006; Elliott et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass E2F1 die Apoptose entweder in Abhängigkeit von p53 oder über p53-unabhängige Mechanismen induziert (Stanelle et Pützer, 2006). Der p53-unabhängige Signalweg wird durch das p53-Homolog p73, dessen Promotor ein transkriptionelles Ziel von E2F1 ist, vermittelt (Singh et al., 2010). Rödicker et al. konnte nachweisen, dass in humanen Pankreaskarzinomzellen die Induktion von TP73 in direktem Zusammenhang mit der apoptotischen Aktivität von E2F1 steht, wohingegen die Aktivierung des p53 Signalwegs nicht in die E2F1-vermittelte Apoptose involviert zu sein scheint. (Rödicker et al., 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der adenovirale Transfer von E2F1 die Induktion des programmierten Zelltods in verschiedenen, humanen Pankreaskarzinomzellen bewirkt. Die pro-apoptotische Wirkung von E2F1 konnte durch die Kombination mit Gemcitabin sogar signifikant verstärkt werden (Rödicker et al., 2001). Interessanterweise wird die pro-apoptotische Funktion von E2F1 durch den aktivierten PI3K-

Signalweg gehemmt. Ferner werden Zielgene von E2F1, die für die E2F1-abhängige Apoptose benötigt werden, wie PRKAA2/AMPK α 2, Nr4a3, Cyp26b1 und p27^{KIP1}, durch den PI3K – AKT Signalweg reprimiert. Dadurch wird während der normalen Proliferationsphase das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und programmierten Zelltod gewährleistet. Wird E2F1 dagegen in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren exprimiert oder kommt es zu einer Schädigung der DNA, vermittelt E2F1 die Induktion von Apoptose (Hallstrom et Nevins, 2003; Hallstrom et al., 2008; Polager et Ginsberg, 2008).

Das Retinoblastoma-Tumorsuppressorprotein (RB) bildet zusammen mit RB2/p130 und p107 die Pocket-Protein-Familie, welche eine Schlüsselposition in der Zellzykluskontrolle einnimmt. So beinhaltet das Retinoblastoma-Protein die Funktion eines transkriptionellen Regulators. RB, RB2/p130 und p107 interagieren mit den verschiedenen Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und inhibieren deren E2F-Promotorfunktion mit konsekutiver Hemmung der transkriptionellen Aktivität. Dies bewirkt eine Inhibition der Zellzyklusprogression und unterdrückt die E2F-induzierte Apoptose (Genovese et al., 2006). Neben der Kontrolle von G₁/S-Phasenprogression und Apoptose, beeinflusst RB auch diverse andere zelluläre Prozesse wie Differenzierung, DNA-Replikation, DNA-damage Response, Aufrechterhaltung der chromosomalen Integrität und Seneszenz. Nahezu alle soliden Tumore weisen eine inaktivierte RB Funktion auf (Zhu, 2005).

So findet sich auch im humanen, duktalem Pankreaskarzinom eine funktionelle Inaktivierung von RB. Paradoxerweise konnte zugleich eine Überexpression des Retinoblastoma-Tumorsuppressorgens nachgewiesen werden. Diese steht in Verdacht an der Resistenz gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose im Pankreaskarzinom durch die Sequestration von E2F1 beizutragen. (Plath et al., 2002; Rozenblum et al., 1997). Dennoch ist die Funktion des überexprimierten Retinoblastoma-Proteins im Pankreaskarzinom nicht erforscht. Roig et al. konnten jedoch im Jahr 2004 zeigen, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven RB Mutante in Pankreaskarzinomzellen mit einer reduzierten Proliferation, bedingt durch eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, assoziiert ist. Darüber hinaus wurde durch den Gentransfer der RB 94 Mutante die Apoptose induziert (Roig et al., 2004).

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das S-Phase Kinase assoziierte Protein 2 (SKP2) Gen zusammen mit weiteren Genen, die den G₁-S-Phasenübergang im Zellzyklus steuern, durch den PI3K-Signalweg reguliert wird. Dies erfolgt durch die Bindung von E2F1 an die Promotoren der entsprechenden Zielgene in Abhängigkeit der PI3-Kinase. E2F1 fördert dadurch die Zellzyklusprogression in den pankreatischen, duktalem Adenokarzinomzellen (Reichert et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es nun die molekularen Mechanismen, die den PI3K – AKT Signalweg mit E2F1 verknüpfen, herauszufinden.

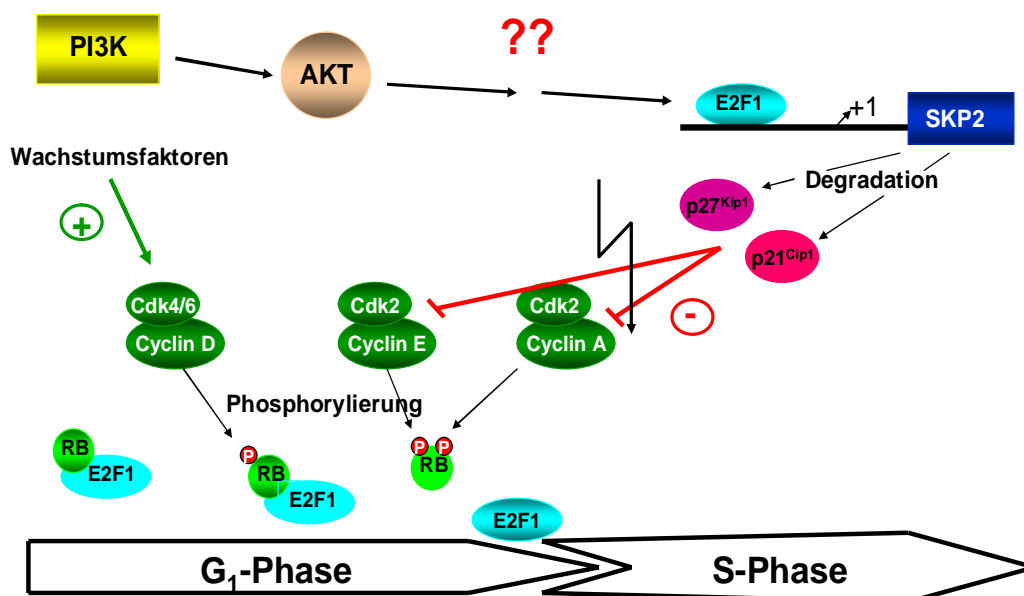


Abbildung 2: Der PI3K/AKT Signalweg steuert SKP2 via E2F1. Das F-Box Protein S-Phase Kinase assoziierte Protein (SKP2) und sein Cofaktor Cks1 (cyclin kinase subunit 1) sind die substratspezifischen Untereinheiten des SCF^{Skp2-Cks1} Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der den Eintritt in die S-Phase reguliert (Bashir et al., 2004).

SKP2 induziert die Degradation der Cyclin-abhängigen Proteinkinase-Inhibitoren p27^{Kip1} und p21^{Cip1} (Carrano et al., 1999; Bornstein et al., 2003). Durch Proteolyse von p27^{Kip1} in der späten G₁-Phase kommt es zu einer maximalen Aktivierung des CyclinE-Cdk2 Komplexes (Shim et al., 2003; Nakayama et al., 2001). Der proteosomale Abbau von p21^{Cip1} sowie p27^{Kip1} bewirkt die Aktivierung des CyclinA-Cdk2 Komplexes (Graña et Reddy, 1995; Sutterlüty et al., 1999). Die CyclinE-Cdk2 und CyclinA-Cdk2 Komplexe veranlassen in der späten G₁-bzw. S-Phase die Hyperphosphorylierung und damit Inaktivierung des Retinoblastoma-Proteins (RB). Die Hyperphosphorylierung von RB in der frühen G₁-Phase erfolgt durch die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen vom D-Typ, welche wiederum durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Keenan et al., 2004; Ohtani et al., 1995). Hyperphosphoryliertes RB dissoziiert von seinem Interaktionspartner E2F1. E2F1 kann daraufhin die Transkription von Genen, die für den G₁-S-Phasenübergang relevant sind, induzieren (Dyson, 1998).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoreseapparatur	Hofer
Elektroblot-Kammer für Western-Blot	Biometra
Elektrophoreseapparaturen	Hofer/Pharmacia
Heizblöcke	Eppendorf
Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Imagemaster	QuantityOne, BioRad
Luminometer Mumat LB 9501	Berthold
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
Photometer	NanoTrop NP-10, PEQLAB
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner
Spannungsgeräte	Hofer/Pharmacia
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	Biometra
Ultraschallgerät	Bandelin electronic Sonopuls
Waagen/Feinwaage	Sartorius
Westernblotapparatur	Biometra
Zellkultur-Inkubatoren	Heraeus
Zentrifugen	Heraeus/Eppendorf

Tabelle 2: Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore
Einfrierröhrchen	Nunc
Einmalpipetten (5, 10, 25, 50ml)	Falcon, Greiner

Luminometer-Röhrchen	Sarstedt
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent
Pipettenspitzen	PEQLAB
Reaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße für PCR	Biozym
Whatman-Papier	Biometra
Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten, Zellkulturschalen	Greiner
Zellschaber	TPP® AG

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**2.1.3 Chemikalien**

Agarose	PEQLAB
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Blotting Grade – Blocker – Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth
c-Myc Inhibitor 10058-F4	Calbiochem
D-MEM Medium	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth
DNA-Leiter	PEQLAB
D-PBS	Invitrogen
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie
FCS	Biochrom
FuGene6	Roche
Glycin	Fluka Chemie
HEPES	Carl Roth
H ₂ O, entionisiert	DeltaSelect
InSolution™ GSK-3 Inhibitor IX	Calbiochem

LY294002	Sigma-Aldrich
Natriumzitat Dihydrat	Merck
Nonidet P40 (NP-40)	Roche
Oligofectamin TM	Invitrogen
OptiMEM [®]	Invitrogen
Orange G	Sigma-Aldrich
Passiv Lyse Puffer	Promega
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	EMD Biosciences
PI-103	Echelon Biosciences
Precision Plus Protein TM All Blue Standards	Bio-Rad
Protease Inhibitor Cocktail Set I	EMD Biosciences
Proteinase K	PEQLAB
Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth
Salmon Sperm DNA Protein G/A Agarose	Upstate
Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure (SDS)	ICN Biomedicals
Streptavidin-Agarose-Beads	Invitrogen
TEMED	Fluka Chemie
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth
tRNA	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Invitrogen

Tabelle 4: Chemikalien

Die Chemikalien Ethanol, Isopropanol, Methanol, Salzsäure, Natronlauge, Glycerin (Glycerol), Eisessig, NaCl, KCl, KH₂PO₄ und Na₂HPO₄ wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und trugen den Reinheitsgrad „reinst“.

2.1.4 Kommerziell erhältliche Kits

Luciferase Assay System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix mit MgCl ₂ Kit	Sigma-Aldrich

TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
---------------------------------------	--------------------

Tabelle 5: Kommerziell erhältliche Kits

2.1.5 Lösungen und Puffer

Puffer für Chromatinimmunpräzipitation

L1-Puffer	TRIS pH 8,0 50mM; EDTA pH 8,0 2mM; NP-40 0,1% (v/v); Glycerol 10% (v/v)
L2-Puffer	TRIS pH 8,0 50mM; EDTA 5mM; SDS 1% (w/v)
Dilutions-Puffer	TRIS pH 8,0 50mM; EDTA 0,5mM; NP-40 0,5% (v/v); NaCl 200mM
Hochsalz-Puffer	TRIS pH 8,0 20mM; EDTA 2mM; NP-40 1% (v/v), NaCl 500mM; SDS 0,1% (w/v)
LiCl-Puffer	TRIS pH 8,0 20mM; EDTA 1mM; NP-40 0,5% (v/v); LiCl 250mM; Natriumdeoxycholat 0,5% (w/v)
Niedrigsalz-Puffer (1xTE, pH 8,0)	TRIS pH 8,0 10mM; EDTA 1mM
Elutions-Puffer	TRIS pH 8,0 10mM; EDTA 1mM; SDS 1% (w/v)

Tabelle 6: Puffer für ChIP

Puffer für Westernblot

Trenngelpuffer	TRIS-HCl 1,5M; pH 8,8
Sammelgelpuffer	TRIS-HCl 0,5M; pH 6,8
Laufpuffer (10fach)	SDS 35mM; TRIS-HCl 0,25M; Glycin 2M
Transferpuffer	Glycin 39mM; TRIS-HCl 48mM; SDS 0,037 (w/v); Ethanol 20% (v/v); pH 8,3
PBS (10fach)	NaCl 1,4M; KCl 27mM; Na ₂ HPO ₄ 40mM; KH ₂ PO ₄ 18mM; pH 7,4
IP-Puffer	HEPES 50mM pH 7,9; NaCl 150mM; EDTA 1mM pH 8,0; NP-40 0,5% (v/v); Glycerol 10% (v/v)
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	SDS 0,35M; Glycerol 50% (v/v); TRIS-HCl 0,3M; Bromphenolblau 0,7mM; β -Mercaptoethanol 5% (w/v), pH 6,8
Stripping-Puffer	Glycin 25mM; SDS 1-2% (w/v); pH 2,0
Waschpuffer	1x PBS; NP-40 0,1% (v/v)
TBST	TRIS-HCl 10mM; pH 8,0; NaCl 150mM; Tween 20 0,05%

Tabelle 7: Puffer für Westernblot

Puffer für Agarosegel

Loading Buffer Orange G (6fach)	Glycerin 60% (v/v); EDTA 60mM; Orange G 0,24% (w/v); SDS 0,12% (w/v)
TAE-Puffer (10fach)	TRIS Base 0,4M; EDTA 0,01M; Eisessig 0,2M; pH 8,0

Tabelle 8: Puffer für Agarosegel**2.1.6 Antikörper****Primäre Antikörper**

Spezifität	Verwendung	Wirt	Hersteller
β-Aktin	WB	Maus	Sigma-Aldrich
c-Myc	WB/ABCD	Kaninchen	Cell Signaling #9402
Cyclin A	WB	Kaninchen	Santa Cruz H-432
Cyclin E	WB	Maus	Santa Cruz N-20
E2F1	ChIP/ WB	Kaninchen	Santa Cruz C-20
p110α	WB	Ziege	Santa Cruz N-20
RelA/ p65	WB	Kaninchen	Santa Cruz C-20
RNA Polymerase II	ChIP	Kaninchen	Santa Cruz N-20

Tabelle 9: Primäre Antikörper**Sekundäre Antikörper**

Spezifität	Verwendung	Hersteller
Alexa Fluor 680 coupled	WB	Molecular Probes

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper**2.1.7 PCR-Primer und Oligonukleotide**

Die folgenden Primer wurden von der Firma Eurofins MWG synthetisiert.

Primer für die semiquantitative PCR

E2F1	E2F1-FW	5'-ACCTCCGACAGCTGCAGGAGAG-3'
	E2F1-RV	5'-ACATGCTCCAGGAGCGAGTCG-3'
Cyclophilin	Cyclophilin-FW	5'-ATGGTCAACCCACCGTG-3'
	Cyclophilin-RV	5'-TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC-3'

Tabelle 11: Primersequenzen für semiquantitative PCR

Oligonukleotide für die ChIP-PCR

Cyclin A	Cyclin A-FW	5'-CAATAGTCGCGGGATACTTGAAGTGC-3'
	Cyclin A-RV	5'-ACTCGCACCGACCCGGCCA-3'
E2F1	E2F1-FW	5'-GGGTCCGGCGCGTTAAAGCC-3'
	E2F1-RV	5'-CATGGCGGCAGGCCTCGGC-3'
GAPDH	GAPDH-FW	5'-AGCTCAGGCCTCAAGACCTT-3'
	GAPDH-RV	5'-AAGAAGATGCGGCTGACTGT-3'
p21	p21-FW	5'-ACCGGCTGGCCTGCTGGAAGT-3'
	p21-RV	5'-TCTGCCGCCGCTCTCTCACCT-3'

Tabelle 12: Oligonukleotidsequenzen für ChIP-PCR**Biotinylierte Oligonukleotide für den ABCD-Assay**

E2F1 E-Box sense	5'-GCTACAGGTTGAGGGTCACGTGCAGAAGAGAGGCTC-3'
E2F1 E-Box antisense	5'-GAGCCTCTCTTCTGCACGTGACCCTCAACCTGTAGC-3'
E2F1 E-Box _{mut} sense	5'-GCTACAGGTTGAGGGTCA _{TTT} TGCAGAAGAGAGGCTC-3'
E2F1 E-Box _{mut} antisense	5'-GAGCCTCTCTTCTGCA _{AA} TGACCCTCAACCTGTAGC-3'

Tabelle 13: Oligonukleotidsequenzen für ABCD-Assay**2.1.8 Small interfering RNA (siRNA)**

Die folgenden siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG synthetisiert.

siRNA	siRNA-Zielsequenz (Matrizenstrang)
scramble duplex I (SDI)	5'-CAGTCGCGTTTGCGACTGGdtdt-3'
c-Myc	5'-CTTCTACCAGCAGCAGCAGdtdt-3'
p110 α	5'-GGTTAAAGATCCAGAAGTAdtdt-3'

Tabelle 14: siRNA-Sequenzen**2.1.9 Luziferasereporteragen-Analyse**

Das in dieser Arbeit verwendete humane E2F1 Promotor Luziferase-Konstrukt (-1340 bis +60 des E2F1 Promotors) wurde freundlicherweise von Dr. B. Yung und seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (Lin, Liang et Yung, 2006). Der zur Kontrolle dienende pGL3 Promotor wurde von der Firma Promega bezogen.

2.1.10 Zelllinien

Es wurden die beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und Panc1 verwendet. Die Zellen wurden von ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA; USA) (LGC Promochem, Wesel, Deutschland) bezogen.

Die Kultivierung von MiaPaCa2 und Panc1-Zellen erfolgte in DMEM Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (w/v) Penicillin/ Streptomycin bei 37°C und unter 5% CO₂-Begasung.

2.2 Experimentalmethoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Um ein steriles Arbeiten zu gewährleisten, erfolgte die Handhabung der Zellen ausschließlich in Sterilwerkbänken. Die Zellen wurden in 75 cm² großen Kulturflaschen ausgesät und mit 15 ml des angegebenen Mediums im Brutschrank bei 37°C und mit 5% CO₂-Begasung kultiviert. Der regelmäßige Wechsel des Mediums sorgte für optimale Wachstumsbedingungen. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen schließlich passagiert. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml einer Trypsin-EDTA Lösung für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dies bewirkte die proteolytische Ablösung der adhären Zellen. Durch Resuspension in 5 ml Nährmedium wurden die Zellen vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für die Kryokonservierung wurden Aliquote von etwa 4 Millionen Zellen in Einfriermedium langsam bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.2 Chemische Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase

Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen entweder in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm oder in 6-Wellplatten ausgesät.

Als spezifischer, zellpermeabler, chemischer Hemmstoff der PI3-Kinase wurde LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) verwendet. Dieser wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt. Die

10 mM Stock-Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Zur Behandlung der Zellen verdünnte man die eingestellte Konzentration mit frischem Nährmedium auf 25 µM. Das alte Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für 24 Stunden auf den Zellen belassen.

2.2.1.3 Chemische Inhibition der c-Myc/Max-Interaktion

Je nach Versuchsanordnung wurden die Zellen entweder in 6-Wellplatten oder in 10 cm-Kulturschalen ausplattiert.

Zur spezifischen Hemmung der c-Myc/Max-Interaktion wurde der zellpermeable c-Myc Inhibitor 10058-F4 (Z,E)-5-(4-Ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one) verwendet. Dieser wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 20 mM eingestellt. Ein Teil des gelösten Inhibitors wurde bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Die restliche Stock-Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

Zur Behandlung der Zellen wurde mit dem verwendeten Nährmedium eine Verdünnung auf 40 µM bzw. 80 µM hergestellt. Der Ansatz wurde, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, auf die Zellen gegeben und für den angegebenen Zeitraum dort belassen.

2.2.1.4 Chemische Inhibition der Glykogensynthasekinase-3

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen in 6-Wellplatten ausgesät. Als selektiver, hoch wirksamer, zellpermeabler Hemmstoff der Glykogensynthasekinase-3 α/β fand der GSK-3 Inhibitor IX (2'Z,3'E-6-Bromoindirubin-3'-oxime) Verwendung. Dieser wurde als 10mM Stock in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Durch Verdünnung mit dem Nährmedium wurden die zur Behandlung der Zellen benötigten Konzentrationen 2,5 µM und 5 µM hergestellt. Den Ansatz gab man nach Entfernung des alten Mediums auf die Zellen und beließ ihn dort für 24 Stunden.

2.2.1.5 Chemische Inhibition der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen in 10 cm Kulturschalen ausplattiert.

Als selektiver chemischer Hemmstoff der katalytischen Untereinheit p110 α wurde PI-103 (3-(4-(4-Morpholinyl)pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidin-2-yl)phenol) verwendet. Dabei handelt es sich um einen dualen Inhibitor der p110 α -Isoform der Phosphatidylinositol-3-

Kinase sowie von mTOR. Dieser wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zur Behandlung der Zellen, stellte man aus der 10 mM Stock-Lösung eine $1\ \mu\text{M}$ Verdünnung her. Die Verdünnung wurde, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, auf die Zellen gegeben und dort für den angegebenen Zeitraum belassen.

2.2.1.6 siRNA Transfektion

Die siRNA Transfektion wurde in 6-Wellplatten durchgeführt. Um einen möglichst effizienten Knockdown durch die siRNA zu erzielen, wurde auf eine geringe Zelldichte sowie eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Wells geachtet. Pro Well im 6-Well wurden 50.000 Zellen ausgesät (Wirth et al., 2011). Stunden nach Aussaat der Zellen begann man mit der Transfektion. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und um sämtliche Serumrückstände zu entfernen die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je Well $800\ \mu\text{l}$ Medium ohne FCS vorgelegt.

Mittels OligofectAMINTM erfolgte die Transfektion von siRNA in die Zellen. Dabei kamen pro Well $50\ \text{nM}$ siRNA zum Einsatz. Für 1 Well der 6-Wellplatte wurden $1,25\ \mu\text{l}$ der siRNA-Lösung ($40\ \mu\text{M}$ Stock) mit $183,75\ \mu\text{l}$ Opti-MEM[®] gemischt. Parallel dazu wurden $2,5\ \mu\text{l}$ OligofectAMINTM und $12,5\ \mu\text{l}$ Opti-MEM[®] gemischt. Beide Lösungen wurden nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur vereinigt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die \approx Well $200\ \mu\text{l}$ umfassende Transfektionslösung wurde anschließend gleichmäßig und tropfenweise auf den Zellen verteilt. Nach einer vorsichtigen Durchmischung wurden die Zellen für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und im Anschluss $1\ \text{ml}$ Medium mit 20% FCS zugegeben.

Nach 24 Stunden erhielten die transfizierten Zellen beider Zelllinien frisches Medium mit 10% FCS. Die Analyse des Knockdowns erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion mittels Westernblot-Analyse.

2.2.1.7 Ganzzellextrakte

Für die Präparation von Ganzzellextrakten wurde das Kulturmedium von den Zellen abgezogen und diese gründlich mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhärenen Zellen vom Boden der Kulturschale wurde anschließend IP-Puffer auf die Zellen gegeben. Um die beginnende Proteindegradation in den Zellen zu verhindern, wurde dem IP-Puffer kurz vor seiner Verwendung ein Protease-Phosphatase-Inhibitor-Cocktail zugesetzt. Entsprechend der

vom Hersteller empfohlenen Verdünnung von 1:100, kamen dabei auf 1 ml Lyse-Puffer 10 µl Protease- bzw. 10 µl Phosphatase-Inhibitor. Die Inhibitoren entstammten dem Protease Inhibitor Cocktail Set I bzw. dem Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II von EMD Biosciences. Beide wurden bei -20°C gelagert. Zusätzlich wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt.

Die Zellen wurden mit dem Gummi-Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, wurde das Zelllysate bei 4°C und 13.200 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentration des Zellüberstands wurde nach der Methode von Bradford (Bradford et al., 1976) bestimmt. Hierfür wurde das Protein Assay Farbstoffkonzentrat im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden in eine Mikrotiterplatte je Well 300 µl des verdünnten Bradford-Reagenzes pipettiert. Zur Erstellung der Standardreihe, wurde bovines Serumalbumin (BSA) der Konzentration 1 mg/ml in der aufsteigenden Reihenfolge 0 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 µl zu der vorgelegten Farbstofflösung pipettiert. Danach wurden die verschiedenen Proben jeweils im Triplet aufgetragen. Mit Hilfe des Mikroplatten Absorptionsphotometers Anthos 2001 wurde die Absorption der Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. An Hand der Standardreihe erfolgte die Umrechnung der Absorptionswerte der Untersuchungslösungen in die Proteinkonzentration.

Im Anschluss daran wurden alle Proben durch Verdünnung mit IP-Puffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Zellextrakte wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Western-Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Einzelne Proteine können damit aus Gesamt-Zellprotein nachgewiesen werden.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine aus den Ganzzellextrakten entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierbei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld in vertikaler Richtung durch die Gelmatrix. Um eine hohe Bandenschärfe zu

erreichen, wurde die diskontinuierliche Elektrophorese angewandt. Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf die unterschiedlichen pH-Werte mehrerer, verschiedener Puffersysteme (Sammelgel-, Trenngel- und Elektrodenpuffer). So war bei der Herstellung der Pufferlösungen auf eine genaue Einstellung des pH-Wertes zu achten (Trenngelpuffer: pH 8,8/ Sammelgelpuffer: pH 6,8). Das Gelmaterial Polyacrylamid wurde aus den giftigen Monomeren Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid, sowie aus Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxidisulfat (APS) hergestellt. TEMED und APS fungierten dabei als Starter einer radikalischen Reaktion im Zuge derer ein vernetztes Polymer gebildet wurde. In diesem fand anschließend die Elektrophorese statt. Der Vernetzungsgrad und damit auch die Porengröße waren von der Acrylamidkonzentration abhängig. Je nach Molekulargewicht der Proteine wurden deshalb Trenngele zwischen 7,5% und 12% Acrylamid verwendet. Durch die Zugabe von Sodiumdodecylsulfat (SDS), welches die Eigenladungen von Proteinen überdeckt, kam es bei allen Proteinen zu einer konstanten negativen Ladungsverteilung. Die Wanderung im elektrischen Feld war somit nicht von der Ladung der Proteinuntereinheit sondern lediglich von der Proteingröße abhängig.

	Trenngele					Sammelgel
	7,5%	9%	10%	12%	15%	4%
ddH ₂ O	2450µl	2350µl	2050µl	1700µl	1250µl	1500µl
Trenngel-/Sammelgelpuffer	1300µl	1300µl	1300µl	1300µl	1300µl	650µl
Acrylamidlösung 30%	1250µl	1350µl	1650µl	2000µl	2500µl	375µl
SDS 10%	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	25µl
APS 10%	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	12,5µl
TEMED	7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl	7,5µl	5µl

Tabelle 15: Polyacrylamid-Trenngele und Sammelgel. Die Mengenangaben beziehen sich auf Gele der Größe 5,5 x 8,5 x 0,075cm.

Zunächst wurde das Trenngel vorbereitet. Anschließend wurde die fertige Trenngellösung in eine HoeferTM Dual Gel Caster gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Dies diente zum einen zu einer Glättung der Gelgrenze, zum anderen wurde dadurch der Kontakt mit Luftsauerstoff vermieden, welcher die korrekte Polymerisation des Gels stören würde. Nach etwa 30 bis 45 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte entfernt werden. Anschließend wurde die fertige Sammelgellösung etwa einen Zentimeter hoch über das Trenngel pipettiert und ein spezieller Probenkamm eingeführt. Das

Auspolymerisieren des Sammelgels dauerte etwa 20 Minuten. Nach Entfernen des Kammes wurden die Probenaschen mit Laufpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte schließlich in einer Gel-Laufapparatur HoeferTM SE 250 bzw. SE 260 bei einer konstanten Spannung zwischen 80-100 V.

Blotten. Mit Hilfe einer Semi-Dry-Blottapparatur wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel auf eine Immobilon-P PVDF Membran übertragen. Durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld wanderten hierbei die Proteine aus dem Gel auf die Membran und blieben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. In Vorbereitung auf den Blottvorgang wurde das Trenngel aus der Laufvorrichtung genommen und für 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Die Membran wurde zuerst in Methanol aktiviert, dann in ddH₂O gewaschen und danach ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde beides in die Blottapparatur gegeben. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² und dauerte je nach Proteingröße zwischen 20 und 45 Minuten.

Immundetektion. Um einen spezifischen Antigennachweis zu ermöglichen, wurden nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF Membran zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Hierfür wurde 5% Magermilchpulver, dessen Proteine für die Antikörper nicht detektierbar sind, in PBS gelöst und die Membran darin für 45 Minuten geblockt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in 4 ml der 5%igen Milchpulverlösung verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran 3 mal für 10 Minuten in PBS gewaschen um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Für den Nachweis des Primärantikörpers, wurde ein Sekundärantikörper verwendet. Dabei handelte es sich um einen Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden war. Die 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur und in der Verdünnung 1:2.000 (wiederum in 5%iger Milchpulverlösung). Nach weiteren, lichtgeschützten Waschschritten in PBS erfolgte schließlich die Detektion. Dazu wurde die Intensität der Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen 700 nm bzw. 800 nm mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System gescannt und gebundener Sekundärantikörper sichtbar gemacht.

Strippen. Um die Membran für weitere Analysen mit anderen Antikörpern einsetzen zu können, wurde der gebundene Antikörper nach der Immundetektion wieder entfernt (Strippen). Dazu wurde die Membran mit Stripping-Lösung (pH 2,2) bedeckt und darin für 5

bis maximal 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erneuerung der Stripping-Lösung wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die Stripping-Lösung entfernt und die Membran zweimal für 10 Minuten in PBS sowie zweimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Danach wurde die Membran 60 Minuten in 5%iger Milchpulverlösung geblockt und konnte im Anschluss daran für eine erneute Immundetektion verwendet werden.

2.2.3 Luziferasereportergergen Assay

Mit Hilfe von Reportergergenkonstrukten kann die Aktivität von Promotor- und Enhancer-Elementen ermittelt werden. Der zu untersuchende Promotor wird dazu vor das so genannte Reportergergen (Firefly-Luciferase) kloniert, dessen Proteinaktivität (durch Lumineszenz) leicht nachzuweisen ist. Die Aktivität von Promotor und Protein sind dabei direkt proportional zueinander. Die Promotorgengergenkonstrukte (zu untersuchender Promotor + Luziferase-Gen) werden durch Transfektion in die Zellen gebracht. Für die Messung der Transfektionseffizienz wurde der pGL3-Promotor verwendet.

Zur Durchführung des Assays wurden in 12-Wellplatten 40.000 Zellen pro Well ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit den Reportergergenkonstrukten. Die Zellen wurden zuvor einmal mit Medium gewaschen und anschließend pro Well mit 1 ml Kulturmedium bedeckt. Die Transfektion der Plasmide in die Zellen wurde mit Hilfe von FuGene6 bewerkstelligt. Dabei wurden pro Well 500 ng Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt. Um die gewünschte Menge an pDNA zu erhalten, wurde diese zuvor mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers 1000 V3.1 gemessen und entsprechend mit sterilem ddH₂O verdünnt. Pro Well wurden 100 µl Ansatz, bestehend aus pDNA, FuGene6 und serumfreien Medium, hergestellt und nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur gleichmäßig über die Zellen verteilt. Der Transfektionsansatz wurde für 48 Stunden auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Medium abgezogen und die Zellen für weitere 24 Stunden mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. Am Tag der Ernte, wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und mit Passiv-Lyse-Puffer 20 Minuten auf einem Schwenker inkubiert. Die Zellysate wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und nach 30 Minuten auf Eis bei 4°C und 13.200rpm 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Expression des Firefly Luziferase-Reportergergens zu detektieren, wurden 50 µl des Lysatüberstands zu 50 µl vorgelegtem Luziferase-Assay-Reagenz pipettiert und anschließend die Lumineszenz im LB 9501 Luminometer bestimmt. Die Versuche wurden als Triplikat durchgeführt.

2.2.4 Avidin-Biotin-Komplex-DNA-Bindungs- (ABCD) Assay

Der ABCD-Assay ist eine Methode zur Analyse der DNA-Bindung von Proteinen. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Form der Immunpräzipitation. Diese basiert auf der Bildung stabiler Antigen-Antikörperkomplexe die durch Bindung an präzipitierbare Trägerpartikel aus einem komplexen Proteingemisch selektiv ausgefällt werden können. Während bei der Immunpräzipitation jedoch die Protein-Protein Interaktion analysiert wird, wird mit Hilfe des ABCD-Assays die Interaktion zwischen Protein und DNA untersucht.

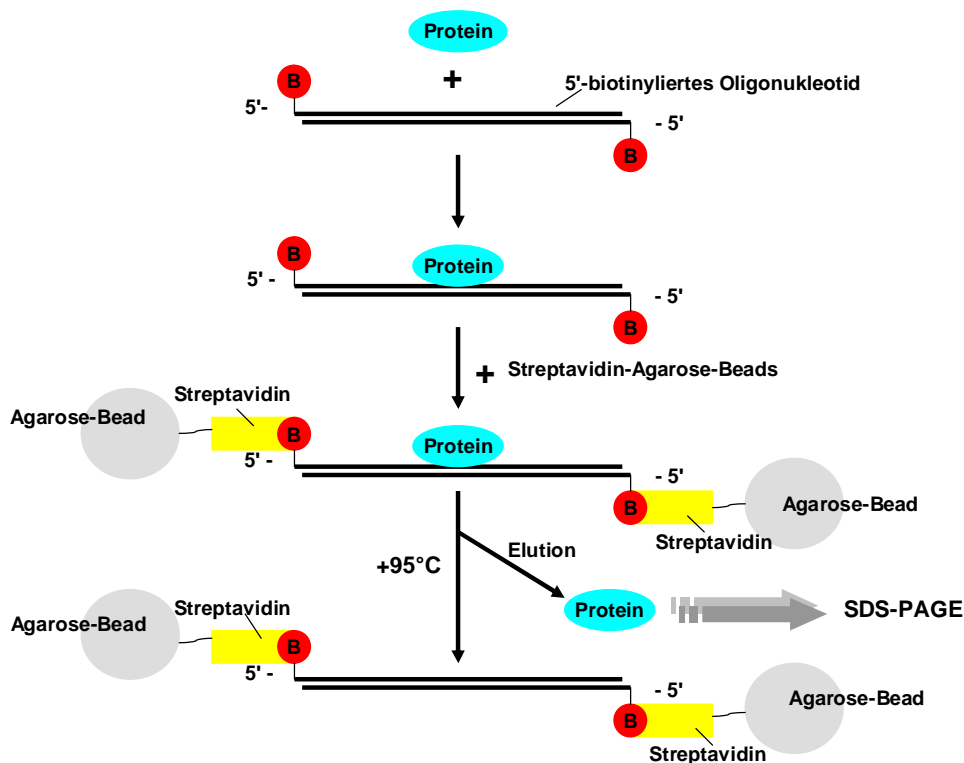


Abbildung 3: ABCD-Assay. Modifiziert nach Shibusawa et al., 2003.

Hierfür wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm je 1.000.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 bzw. mit dem c-Myc-Inhibitor 10058-F4 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zellernte, wie unter 2.2.1.7 beschrieben. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde nach Bradford bestimmt. Anschließend wurde 1 mg Proteinextrakt mit 3 µg eines 5'-biotinylierten DNA-Oligonukleotids (1 µg/µl) in einem Endvolumen von maximal 400 µl IP-Puffer für 4 Stunden bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Die verwendeten 5'-biotinylierten Oligonukleotide enthielten entweder die spezifischen Proteinbindungssequenzen oder eine mutierte Abwandlung dieser als Kontrolle.

Für den Input (100 µg) wurde Proteinextrakt, welcher nicht zuvor mit DNA versetzt worden war, auf eine einheitliche Konzentration eingestellt, in Laemmli aufgenommen und anschließend 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Nach Ablauf der 4-stündigen Inkubationszeit wurden die Proben mit je 100 µl gewaschenen Streptavidin-Agarose-Beads über Nacht bei 4°C im Drehrad inkubiert. Die Agarose-Beads waren zuvor in 500 µl IP-Puffer suspensiert und dann bei 4°C und 2.600rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert worden. Der Überstand war daraufhin vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen worden. Das Waschen der Beads war insgesamt dreimal wiederholt worden. Am folgenden Morgen wurden die Proben bei 4°C und 2.600rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Kontrolle bei -80°C aufbewahrt. Um alle nicht an die Streptavidin-Agarose-Beads gebundenen Moleküle zu entfernen, wurde das Pellet in 500 µl IP-Puffer suspensiert und wie bereits beschrieben, insgesamt dreimal gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 45 µl 2fach-Laemmli aufgenommen. Die an das DNA-Oligonukleotid gebundenen Proteine wurden durch 5-minütiges Aufkochen der Probe denaturiert und dadurch eluiert. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurden die Proteine schließlich entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Der Proteinnachweis erfolgte durch einen Immunoblot.

2.2.5 Semiquantitative PCR

RNA Isolierung. Für die Durchführung der semiquantitativen PCR wurde RNA aus den Kontroll- und den behandelten Zellen isoliert. Um eine RNA-Kontamination zu vermeiden, wurden alle verwendeten Geräte und Materialien vor Arbeitsbeginn mit RNase Zap (Sigma) gereinigt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits nach dem Protokoll des Herstellers. Entsprechend wurde das Nährmedium von den Zellen abgezogen und diese mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lysierung der Zellen, indem diese mit RLP-Puffer (200-300 µl pro 6-Well) versetzt wurden. Das Zelllysate wurde zum Homogenisieren in eine QIAshredder Spinsäule überführt und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Um eine möglichst selektive Bindung der RNA an die RNeasy Silicagel-Membran zu erzielen, wurde dem Lysat je 1 Volumen (z.B. 600 µl) 70%iger Ethanol zugefügt. Anschließend wurden jeweils 700 µl des Zelllysats in eine RNeasy Mini-Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei etwa 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt solange wiederholt bis kein Zelllysate mehr vorhanden war.

Um die an der Membran gebundene RNA zu waschen, wurden je 350 µl RW1 Puffer in die RNeasy Mini-Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung

restlicher genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNase-free DNase Sets ein DNA-Verdau. Hierfür wurde jede Membran mit 80 µl DNase-I-Mischung (70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase I Stock-Lösung) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden je 350 µl RW1 Puffer in die RNeasy Mini-Säule pipettiert und diese für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die DNase wurde dadurch wieder von der Membran entfernt. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer, wobei zuerst für 15 Sekunden und dann für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Zum Trocknen der Membran wurde die RNeasy Mini-Säule daraufhin bei maximaler Drehzahl 1 Minute zentrifugiert. Die Eluierung der mRNA erfolgte mittels kurzer Inkubation der Membran mit 30 µl RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 Minute. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung der RNA. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt und anschließend im Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Semiquantitative PCR. Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Reaktion wurden unter Verwendung des TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems) jeweils 1 µg der isolierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche bei Vorliegen einer doppelsträngigen Startersequenz eine einzelsträngige RNA in eine doppelsträngige Kopie (cDNA) überführt.

Es wurde folgender Pipettieransatz für die RT-PCR hergestellt:

Reagenz	µl/Ansatz
10xRT-Puffer	5,0
dNTP	11,0
MgCl ₂	10,0
Hexamere	2,5
RNA-Inhibitor	1,0
Multiscribe RT (50U/µl)	1,25
RNA	1,0 µg
ddH ₂ O	x

Tabelle 16: RT-PCR Pipettieransatz

Die RT-PCR erfolgte in der PCR-Maschine nach folgendem Programm: 10 min bei 25°C, 1h bei 48°C, 5 min bei 95°C und Pause bei 4°C. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Mittels semiquantitativer PCR erfolgte indirekt die relative Quantifizierung der ursprünglichen mRNA-Menge des zu untersuchenden Gens. Hierfür wurde unter Verwendung spezifischer Primer die gewonnene cDNA amplifiziert. Um eine Vergleichbarkeit der Expression zu ermöglichen, diente parallel amplifizierte cDNA des Housekeeping-Referenzgens Cyclophilin als Kontrolle. Endogenes Referenzgen und Zielgen wurden jeweils aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert. Um Linearität zu gewährleisten wurde ein Zyklus Range 24 bis 36 Zyklen gefahren und ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Standard-PCR-Reaktionsansatz:

Reagenz	µl/Ansatz
cDNA (100 ng)	1,0
Primer FW (10 pmol)	1,0
Primer RV (10 pmol)	1,0
Red Taq Ready Mix	25,0
ddH ₂ O	ad 50µl Gesamtvolumen

Tabelle 17: Standard-PCR-Reaktionsansatz

PCR-Programm:

	3	Minuten	95°C	Initiale Denaturierung
24-36 Zyklen	{	30	Sekunden	95°C Denaturierung
		30	Sekunden	60°C Annealing
		30	Sekunden	72°C Extension
		7	Minuten	72°C Terminale Extension

Anschließend wurden die Proben mit Loading Buffer Orange G (6-fach) versehen und auf ein 1-2%iges TAE-Agarose-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V in einer mit 1xTAE-Puffer und Ethidiumbromid gefüllten Horizontalapparatur. Zur

Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel mit einer Digitalkamera unter UV-Licht (302 nm) aufgenommen.

2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation handelt es sich um eine sensitive Methode zur Darstellung der Interaktion zwischen spezifischen Proteinen und der DNA. Das funktionelle Zusammenspiel zwischen Transkriptionsfaktoren und den entsprechenden Promotorelementen der DNA wird hierbei durch die sequentielle Anwendung von Immunpräzipitation und PCR analysiert.

Prinzip. Um die DNA-gebundenen Proteine direkt an ihrer Bindungsstelle im Chromatin zu fixieren, wurden die Zellen mit Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% behandelt. Nach Diffusion des Formaldehyds in den Zellkern, kam es durch Ausbildung kovalenter Bindungen zur Quervernetzung (Crosslinking) von DNA und Protein, sowie von Proteinen untereinander. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Chromatin mit Hilfe von Ultraschall in DNA-Fragmente einer Länge von durchschnittlich 400-500 Basenpaaren eingestellt. Die DNA-Protein-Komplexe wurden mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper angereichert. Zur Fällung der entstandenen Immunkomplexe wurden diese mit Protein-G/A-Agarose-Beads versetzt. Daraufhin wurden die präzipitierten DNA-Protein-Komplexe erhitzt und die formaldehydinduzierte Quervernetzung von DNA und Protein rückgängig gemacht (reverses Crosslinking). Die DNA wurde somit von gebundenem Protein befreit und aufgereinigt. Mit Hilfe promotorspezifischer Primer-Paare wurde die DNA im Anschluss daran in einer PCR-Analyse amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese detektiert. Zur Input-Referenz wurden parallel dazu Kontrollreaktionen unter identischen Bedingungen aber ohne primären Antikörper durchgeführt.

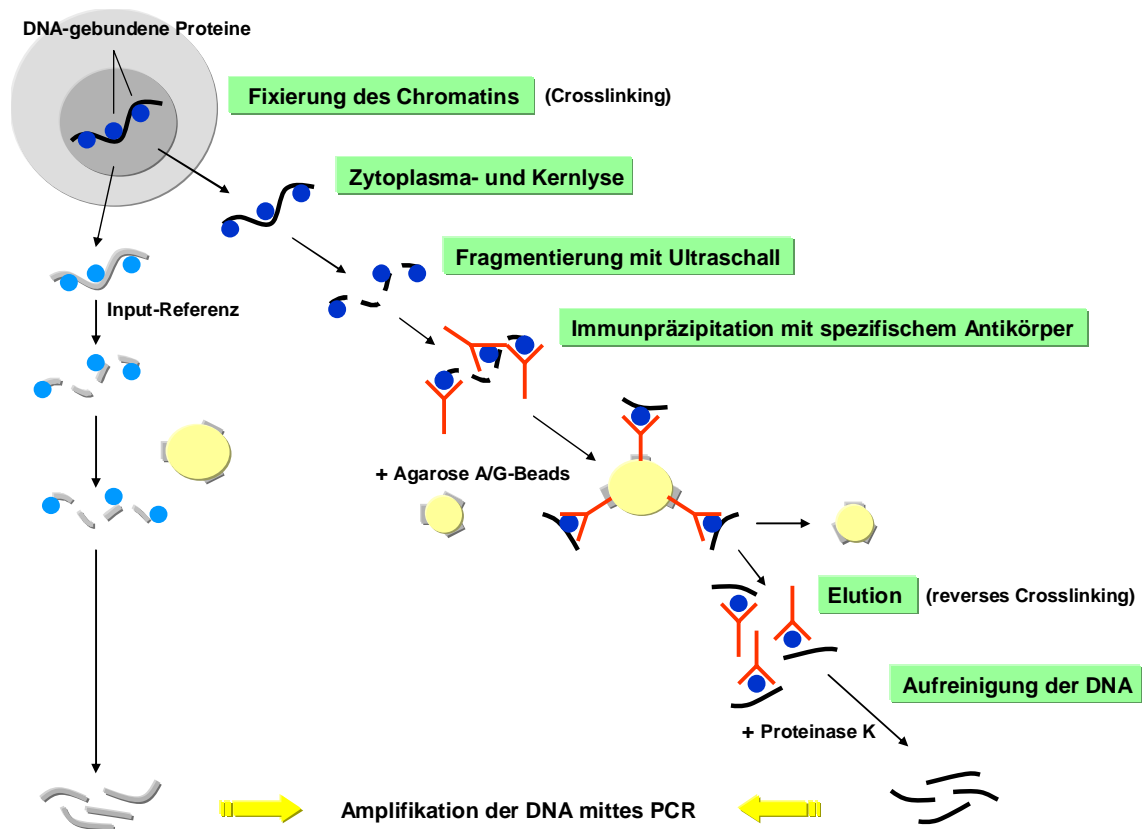


Abbildung 4: Prinzip der ChIP. Modifiziert nach Carter et al., 2004.

Durchführung. In 6-Wellplatten wurden pro Well 50.000 Zellen ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 für weitere 24 Stunden behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% inkubiert. Um weitere Vernetzungsreaktionen zu unterbinden, erfolgte anschließend die Behandlung mit 1,25 M Glycin, welches ebenfalls für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen wurde. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Dieses wurde erneut abgesaugt und die Zellen pro Well mit 80 μ l eiskühlem PBS bedeckt. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Gummi-Zellschabers abgekratzt und in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1.600rpm in der Tischzentrifuge wurde der Überstand (PBS) abgenommen und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 500 μ l L1-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dies bewirkte die Zellyse. Um einer Proteindegradation vorzubeugen, war der L1-Puffer zuvor mit einem Protease-Phosphatase-Inhibitor Cocktail der Verdünnung 1:100 versetzt worden. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit einer G25-Spritze durch 3maliges Aufziehen mechanisch lysiert und die Zellkerne bei 4°C,

3.000 rpm und 2 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, diesmal aus Cytoplasma bestehend, wurde erneut verworfen. Zur Zellkern-Lyse wurde das Sediment (Kernmaterial) in 700 µl L2-Puffer (ebenfalls mit Protease-Phosphatase-Inhibitoren versetzt) gut resuspendiert, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Dann erfolgte der Aufschluss mit Ultraschall. Jede Probe wurde 5 mal für 30 Sekunden bei einer Intensität von 60% beschallt (Ultraschallgerät der Firma Bandelin electronic Sonopuls; Leistung: 70 W, Frequenz: -20kHz, Netzspannung 230 V, Stromaufnahme: 0,4 A). Unlösliche Bestandteile wurden mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit sedimentiert und der Überstand in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration des Probenüberstands mit dem Photometer bestimmt und pro Immunpräzipitation 50 bis 100 µg Chromatin eingesetzt. Dieses wurde mit Dilutionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 500 µl gebracht. Als Input-Referenz wurde eine Chromatinmenge von 10 bis 20 µg verwendet, welche mit Elutionspuffer auf ein Endvolumen von 550 µl verdünnt wurde. Die Input-Probe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Zur Vorreinigung der Chromatin-Lösung wurden zu den Proben jeweils 120 µl mit Dilutionspuffer verdünnte Agarose A/G gegeben und das Chromatin-Agarose-Gemisch für 2 bis 4 Stunden bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Danach wurden die Proben für 1 Minute bei 4°C und 800 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit dem aufgereinigten Chromatin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht mit 3-5 µg eines spezifischen Antikörpers auf dem Rotor inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben erneut mit 120 µl verdünnter Agarose A/G versetzt und für 2 bis 4 Stunden bei 4°C auf dem Rotor inkubiert. Mittels einminütiger Zentrifugation bei 4°C und 800 rpm wurden die DNA-Protein-Agarose Komplexe sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 3 x 700 µl Hochsalz-Puffer, 3 x 700 µl LiCl sowie 3 x 700 µl Niedrigsalz-Puffer (1 min, 800 rpm, 4°C) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der DNA (reverses Crosslinking). Dazu wurden die Proben mit jeweils 300 µl Elutionspuffer versetzt, kurz gevortext und dann bei 65°C für 15 bis 30 Minuten im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Agarose-Beads bei 4°C und 5.000 rpm für 2 Minuten abzentrifugiert, 250 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Das Pellet wurde in 250 µl Elutionspuffer aufgenommen, wieder für 15 bis 30 Minuten bei 65°C inkubiert und erneut abzentrifugiert (2 min, 5.000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde zum vorherigen Überstand dazu pipettiert und das Pellet verworfen. Anschließend wurden zu den insgesamt 500 µl Eluat sowie zur aufgetauten Input-Probe 30 µl 5 M NaCl gegeben und bei 65°C über Nacht im Thermoschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 µl Proteinase K zu den Proben pipettiert und diese für 2 Stunden bei 45°C

inkubiert. Dadurch wurden die Proteine, die zuvor durch reverses Crosslinking von der DNA abgelöst worden waren, verdaut. Die Extraktion der DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Fällung. Dazu wurden die Proben in 2 ml-Phase-Lock-Gel Reaktionsgefäße überführt, jeweils 600 µl Phenol/Chloroform zugegeben, kurz gevortext und bei 14.000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch konnte eine Phasentrennung erreicht werden. Anschließend wurden 530 µl des wässrigen Überstands in ein neues Phase-Lock-Gefäß überführt und ein gleicher Anteil Chloroform zugegeben. Das Probe-Chloroform-Gemisch wurde wie zuvor gevortext und abzentrifugiert. Danach wurden 470 µl des wässrigen Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Hilfe von Ethanol ausgefällt. Hierfür wurden 10% NaAc (3 M, pH 5,2), 1 ml 100% Ethanol sowie 2 µl tRNA zugegeben und gründlich durchmischt. Die Proben wurden für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert und danach bei 4°C und 14.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und für 1 Stunde bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100 ml TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht gelöst.

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit spezifischen Primern für die jeweiligen Promotorsequenzen unter Verwendung des REDTaq ReadyMix. Für jede PCR-Reaktion wurden 5% des ausgefallten Chromatins eingesetzt.

PCR-Programm:

	80°C Pause
2 Minuten	94°C Initiale Denaturierung
45 Sekunden	94°C Denaturierung
45 Sekunden	60-64°C je nach Annealing-Temperatur d. Primerpaars
45 Sekunden	72°C Extension
10 Minuten	72°C Terminale Extension
	4°C Pause

Um Linearität zu gewährleisten wurden 34 bis 38 Zyklen durchgeführt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte nachgewiesen.

3 Ergebnisse

3.1 E2F1 ist essentiell für die G₁/S-Phasenprogression im Pankreaskarzinom

Im Jahr 2007 konnte gezeigt werden, dass E2F1 an den Promotor von SKP2 bindet und dessen Transkription in Abhängigkeit von der PI3-Kinase induziert. SKP2 wiederum spielt eine wichtige Rolle bezüglich der Progression der Pankreaskarzinomzellen von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus (Reichert et al., 2007).

In der Vorarbeit zu den, im Folgenden, erhobenen Daten wurde der Einfluss von E2F1 auf die G₁/S-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen deshalb ausführlicher untersucht. So konnte Reichert et al. nachweisen, dass in MiaPaCa2-Zellen der G₁/S-Phasen-Übergang in Abhängigkeit von E2F1 erfolgt (Reichert et al., 2007).

3.1.1 E2F1 induziert die Expression zellzyklusrelevanter Gene

Die Progression von Säugerzellen durch die G₁-Phase und der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus werden durch die Cyclin A-Cdk2 und Cyclin E-Cdk2 Komplexe reguliert (Graña et Reddy, 1995). Um die zeitliche Induktion von E2F1-, Cyclin E- und Cyclin A-Expression innerhalb des Zellzyklus zu untersuchen, wurden Panc1 Zellen mittels Serumentzug in der G_{0/1}-Phase arretiert. Anschließend wurde die FCS-induzierte G₀/S-Phasenprogression im Western-Blot detektiert.

Die Westernblot-Analyse zeigte 2 Stunden nach Stimulation der Zellen mit Serum eine deutliche Induktion von E2F1, sowie eine schwache Induktion der Cyclin A bzw. E Proteinexpression (Abbildung 5). E2F1 wird demnach vor der Expression von Cyclin E und A exprimiert. In der G_{0/1}-Phase kommt es zu keiner Expression von E2F1, Cyclin E und Cyclin A.

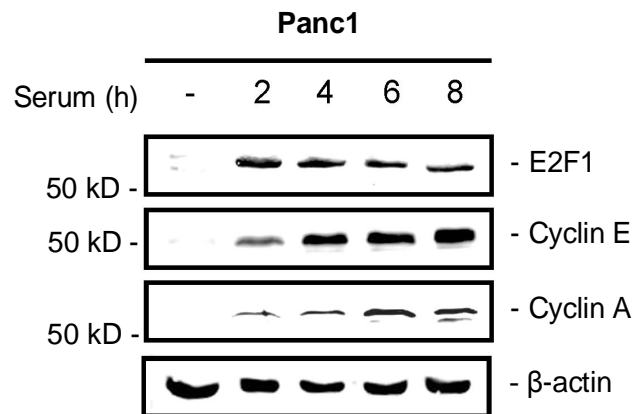


Abbildung 5: E2F1 steuert die G₁/S-Phasenprogression durch Induktion zellzyklusrelevanter Gene. Westernblot-Analyse von Panc1 Zellen im Stimulationsversuch. 48 Stunden nach Serumentzug wurden die Zellen mit 20-prozentigem FCS über 2,4,6 und 8 Stunden stimuliert oder blieben unstimuliert (-). Anschließend Detektion der E2F1, Cyclin A und Cyclin E Proteinexpression. Um eine gleiche Proteinbeladung sicherzustellen, wurde die Membran gestripped und mit β -Aktin behandelt.

3.1.2 E2F1 steuert die Zellzyklusprogression in Abhängigkeit von der PI3-Kinase

Nachdem E2F1 die Transkription von SKP2 in Abhängigkeit von der PI3-Kinase induziert (Reichert et al., 2007), sollte dieser regulatorische Mechanismus für ein zusätzliches, zellzyklusrelevantes E2F-Zielgen in den Pankreaskarzinomzellen validiert werden.

Dazu wurde mittels ChIP-Assay die Bindung von E2F1 an den Cyclin A Promotor nach PI3K-Inhibition untersucht. 24 Stunden nach Behandlung der MiaPaCa2 Zellen mit 25 μ M LY294002, einem spezifischen PI3-Kinase Inhibitor, fand man eine deutliche Abnahme der E2F1 Bindung an den Cyclin A Promotor (Abbildung 6).

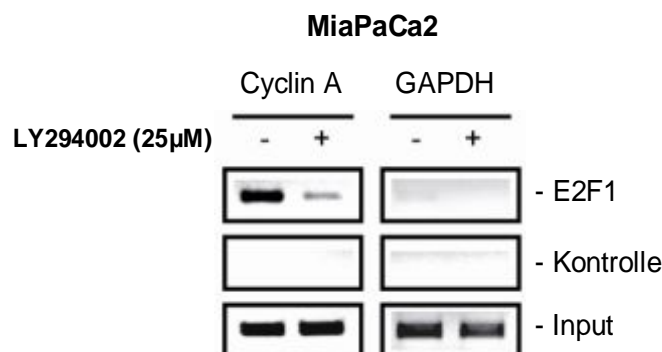


Abbildung 6: E2F1 induziert die Transkription des Cyclin A Gens in Abhängigkeit von der PI3-Kinase. Chromatinimmunopräzipitationsanalyse des Cyclin A Gens. Chromatin von MiaPaCa2 Zellen wurde für 24 Stunden mit 25 μ M LY294002 behandelt oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Die Immunpräzipitation wurde mit einem E2F1-spezifischen Antikörper oder zur Negativkontrolle mit einem polyklonalen IgG

Antikörper vom Kaninchen durchgeführt. Die präzipitierte DNA oder 10% des Chromatin-Inputs wurden mit genspezifischen Primern des Cyclin A bzw. den GAPDH Promotors amplifiziert.

3.2 E2F1 wird in Pankreaskarzinomzellen verstärkt exprimiert

Mittels Mikroarray-basierter Transkriptomanalysen erstellten Logsdon et al. (2003) und Buchholz et al. (2005) kürzlich ein umfassendes Genexpressionsmuster des duktales Pankreaskarzinoms. Begleitend dazu wurden auch die Genexpressionsprofile des normalen Pankreas sowie der chronischen Pankreatitis und den pankreatischen, intraepithelialen Neoplasien (PanIN) ermittelt. Unter Verwendung von OncomineTM, einer molekularbiologischen Datenbank, die die Ergebnisse von Mikroarraystudien aus der Onkologie zusammenstellt und auswertet, konnte Einblick in die Datensätze gewonnen werden. Für die Erhebung der E2F1-Expression im Pankreaskarzinom wurden mikrodyssezierte, normale Pankreasgangzellen aus 11 verschiedenen, gesunden Pankreata mit mikrodyssezierten duktales Pankreaskarzinomzellen aus 18 verschiedenen pankreatischen Adenokarzinomen hinsichtlich ihrer Genexpression verglichen.

Hieraus wurde ersichtlich, dass E2F1 im Pankreaskarzinom (n=18) auf mRNA Ebene signifikant (P= 0,0127) stärker exprimiert wird als im normalen Pankreasgewebe (n=11) (Abbildung 7).

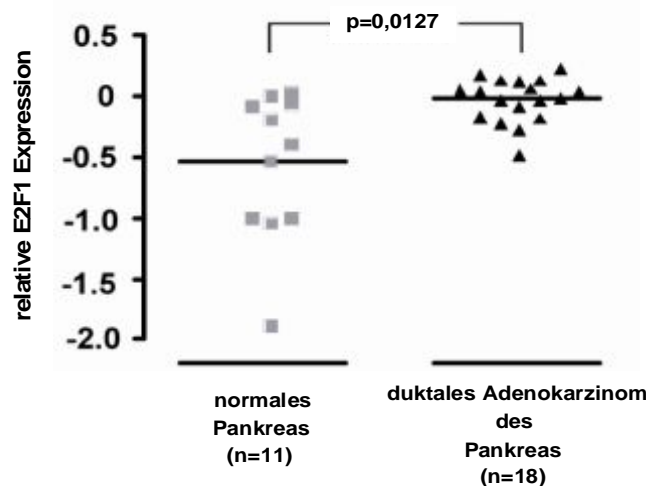


Abbildung 7: E2F1 ist im Pankreaskarzinom verstärkt exprimiert. Unter Verwendung der OncomineTM – Datenbank wurde Zugang zu den von Logsdon et al. (2003) und Buchholz et al. (2005) publizierten Microarray Datensätzen gewonnen. Durch Kombination der Datensätze wurde die E2F1 mRNA Expression im normalen Pankreas (n=11) und im Pankreaskarzinom (n=18) ermittelt. Die relative Expression wurde auf einer

logarithmischen Skala aufgetragen. Der p-Wert wurde mittels zweiseitigem Student T-Signifikanz Test bestimmt.

3.3 Der PI3K-Signalweg kontrolliert die Transkription des E2F1 Gens in Pankreaskarzinomzellen

Um den Einfluss des PI3K-Signalwegs auf die Regulation von E2F1 zu erforschen, wurde die Expression von E2F1 auf mRNA-Ebene nach spezifischer Hemmung der PI3-Kinase bestimmt.

Dazu wurden die beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und Panc1 über eine Dauer von 24 Stunden mit dem spezifischen PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert. Eine semiquantitative PCR-Analyse zeigt eine signifikante Abnahme der E2F1 mRNA-Expression in den mit LY294002 behandelten Zellen (Abbildung 8).

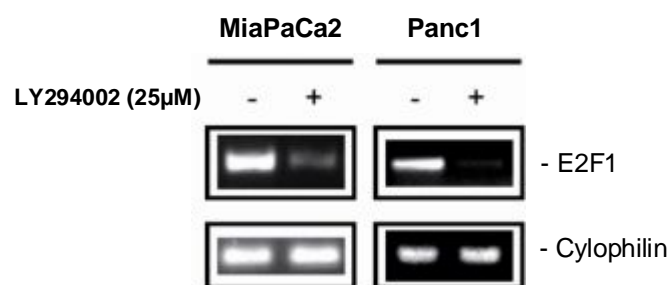


Abbildung 8: Die PI3-Kinase kontrolliert die E2F1 mRNA-Expression. Semiquantitative PCR-Analyse der E2F1 mRNA Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen, die über 24 Stunden entweder mit 25 μM LY294002 behandelt wurden oder als Kontrolle unbehandelt blieben. Die Cyclophilin mRNA diente dabei als Kontrolle.

Mittels Luziferase-Reporterassays sollte der Nachweis einer Regulation des E2F1 Promotors durch die PI3-Kinase erbracht werden.

Hierfür wurden MiaPaCa2 und Panc1 Zellen entweder mit einem pGL3 Promotor-Kontrollvektor oder einem E2F1 Reportergenkonstrukt (-1340 bis + 60 des E2F1 Promotors) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit LY294002 inkubiert. Daraufhin konnte in den MiaPaCa2 Zellen eine Aktivitätsabnahme des E2F1 Promotor-Reportergens auf 47,5% und in den Panc1 Zellen auf 51,8% gemessen werden. Im Gegensatz dazu kam es zu keiner signifikanten Regulation des pGL3 Kontroll-Reportergens

nach Behandlung mit LY294002. Dies zeigt, dass die PI3-Kinase spezifisch die Aktivität des E2F1 Promotors kontrolliert (Abbildung 9).

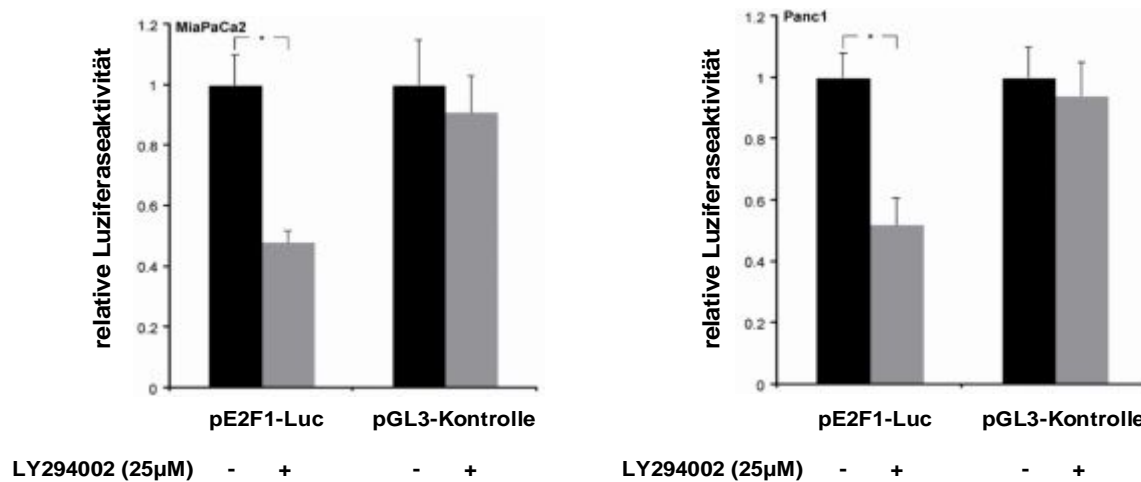


Abbildung 9: Die E2F1 Promotoraktivität wird spezifisch durch die PI3-Kinase reguliert. 500 ng der pGL3 Promotorkontrolle bzw. des pE2F1-Luc Reportergenkonstrukts (- 1340 bis + 60 des E2F1 Promotors) wurden in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 25 µM LY294002 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit LY294002 wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Student T-Test: *P < 0,05 gegenüber den Kontrollen.

Um letztendlich zu beweisen, dass die PI3-Kinase für die transkriptionelle Regulation des E2F1 Gens verantwortlich ist, wurden ChIP-Assays durchgeführt.

Hierfür wurden MiaPaCa2 und Panc1 Zellen über 24 Stunden mit LY294002 inkubiert und anschließend die Bindung der RNA Polymerase II an den E2F1 Promotor analysiert.

In beiden Zelllinien war nach LY294002 Behandlung deutlich weniger RNA Polymerase II am E2F1 Promotor gebunden als dies in der unbehandelten Kontrollgruppe der Fall war.

Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der PI3-Kinase zu einer Hochregulation der p21^{Cip1} Expression führt (Reichert et al., 2007), wurde als Kontrolle der p21^{Cip1} Promotor verwendet. Im Gegensatz zum E2F1 Promotor, war sowohl in den MiaPaCa2 als auch in den Panc1 Zellen nach Behandlung mit LY294002 die Bindung der RNA Polymerase II an den p21^{Cip1} Promotor deutlich erhöht. Die Bindung der RNA Polymerase II an den Promotor von GAPDH dagegen blieb unbeeinflusst (Abbildung 10).

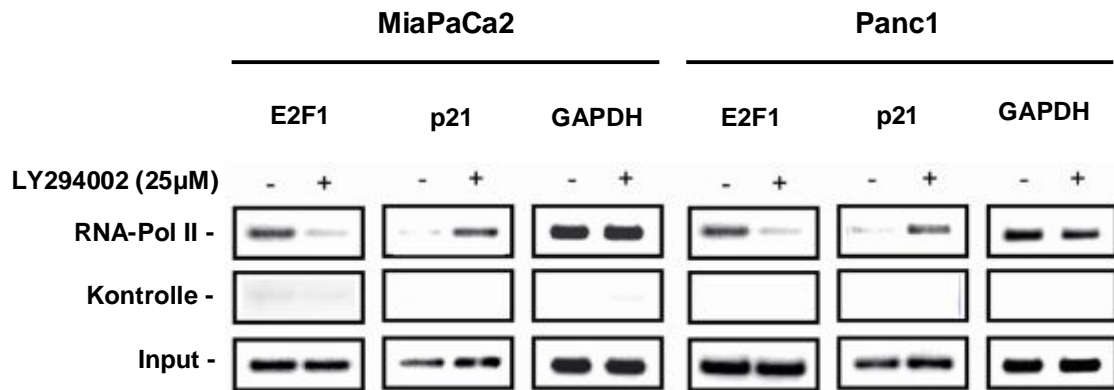


Abbildung 10: Der PI3K-Signalweg kontrolliert die Transkription von E2F1 und p21^{Cip1}. Chromatinimmunopräzipitationsanalyse des E2F1 und p21^{Cip1} Gens. Chromatin von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen, die 24 Stunden mit 25 μM LY294002 behandelt wurden oder als Kontrolle unbehandelt blieben, wurde mit einem RNA Polymerase II-spezifischen Antikörper oder zur Negativkontrolle mit einem polyklonalen IgG Antikörper vom Kaninchen immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA bzw. 10% des Chromatin-Inputs wurden mit genspezifischen Primern für den E2F1, p21^{Cip1} oder GAPDH Promotor amplifiziert.

Dies zeigt, dass die Transkription des E2F1 bzw. des p21^{Cip1} Gens spezifisch durch die PI3-Kinase geregelt wird.

3.4 c-Myc kontrolliert die E2F1 Expression in den Pankreaskarzinomzellen

Die bislang angestellten Untersuchungen zeigten zwar, dass E2F1 über den PI3K-Signalweg reguliert wird. Es bleibt jedoch nach wie vor unklar, wie diese Regulation erfolgt.

Asano et al. fanden heraus, dass auch die beiden Transkriptionsfaktoren c-Myc und NFκB im Pankreaskarzinom in Abhängigkeit des PI3K-Signalwegs reguliert werden (Asano et al., 2004).

Daher wurde die Expression von c-Myc und NFκB nach spezifischer Hemmung der PI3-Kinase mittels Westernblot-Analysen bestimmt. Hierbei zeigte sich, 24 Stunden nach LY294002 Behandlung, eine deutliche Reduktion der c-Myc Proteinexpression sowohl in MiaPaCa2 als auch in Panc1 Zellen. Zugleich fand man eine eindeutig verminderte Proteinexpression von E2F1, die in Korrelation zu der von c-Myc stand. Dagegen blieb die RelA/p65 Expression von der Inhibition der PI3-Kinase unbeeinflusst. RelA/p65 diente somit als Kontrolle und verwies auf die spezifische Regulation von c-Myc und E2F1 durch die PI3-Kinase in Pankreaskarzinomzellen (Abbildung 11).

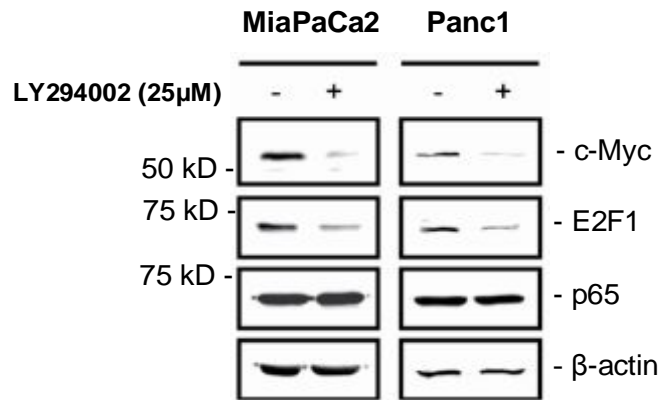
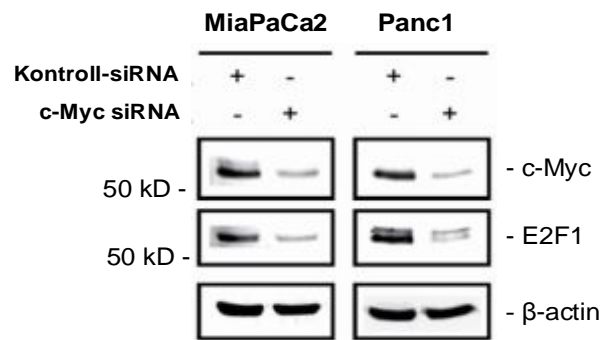


Abbildung 11: Die PI3-Kinase steuert die Expression von c-Myc und E2F1. Western-Blot der c-Myc, E2F1 und p65/RelA Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 25 μ M LY294002. Mittels β -Aktin wurde die Beladung gleicher Proteinmengen kontrolliert.

Um die Regulation von E2F1 durch c-Myc auf genetischer Ebene zu demonstrieren, wurde RNA-Interferenz verwendet. 72 Stunden nach der Transfektion einer c-Myc-spezifischen siRNA zeigte sich in der durchgeführten Westernblot-Analyse eine deutliche Abnahme der c-Myc Proteinexpression. Abermals war in Korrelation dazu auch die E2F1 Proteinmenge stark vermindert (Abbildung 12 a).

Eine semiquantitative RT-PCR Analyse der E2F1 mRNA-Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen 72 Stunden nach Transfektion einer c-Myc-spezifischen siRNA ergab eine deutliche Reduktion von E2F1 (Abbildung 12 b). Dies legt nahe, dass E2F1 in Pankreaskarzinomzellen durch c-Myc transkriptionell reguliert wird.

a)



b)

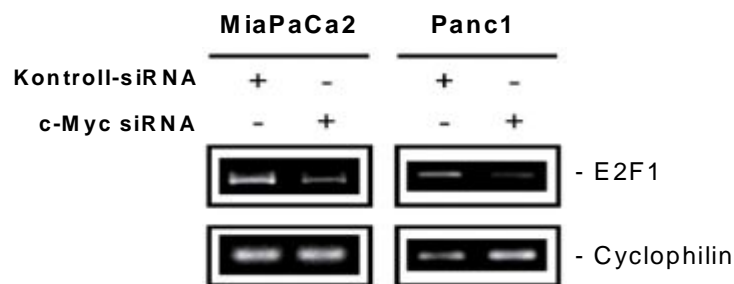


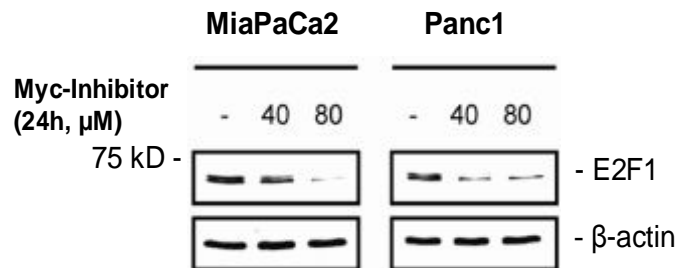
Abbildung 12: Der c-Myc Knockdown inhibiert in PDAC Zellen die E2F1 Expression auf Protein- und mRNA-Ebene. a) Westernblot-Analyse der c-Myc und E2F1 Proteinlevel 72 Stunden nach Transfektion von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen mit c-Myc-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA. Um die die gleiche Proteinbeladung sicherzustellen wurde die Membran gestripped und anschließend β -Aktin nachgewiesen. b) Semiquantitative PCR-Analyse der E2F1 mRNA-Level in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen nach 72-stündiger Transfektion der Zellen mit c-Myc-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA. Die Cyclophilin mRNA diente dabei als Kontrolle.

Um die Rolle, die c-Myc in der Regulation des E2F1 Gens spielt, weiter zu validieren, wurde der niedermolekulare Myc Inhibitor 10058-F4 verwendet. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieser die Dimerisierung von c-Myc mit Max hemmt. Dadurch unterbleibt die Bindung von c-Myc an die DNA der Zielgene und nachfolgend deren Transaktivierung (Yin et al., 2003).

Der Myc Inhibitor wurde in einer Konzentration von 40 μ M oder 80 μ M verwendet. Nach 24 Stunden Inkubationszeit konnte für beide Konzentrationen sowohl in MiaPaCa2 als auch in Panc1 Zellen eine deutliche Verminderung der E2F1 Proteinmenge nachgewiesen werden (Abbildung 13 a). Daraufhin wurde die E2F1 mRNA-Expression nach Myc-Inhibition mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Auch auf mRNA-Ebene konnte in beiden Zelllinien eine verminderte E2F1 Expression nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente hierbei die

mRNA Expression von Cyclophilin (Abbildung 13 b). Dies zeigt, dass c-Myc in den Pankreaskarzinomzellen wichtig für die Transkription des E2F1 Gens ist.

a)



b)

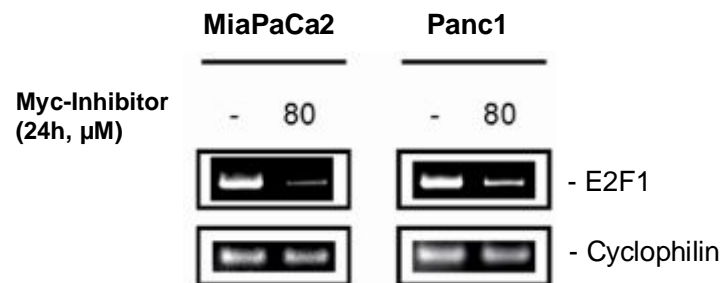


Abbildung 13: c-Myc kontrolliert die E2F1 Protein- und mRNA-Expression. a) Western-Blot der c-Myc und E2F1 Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 40 und 80 μM Myc-Inhibitor. Mittels β-Aktin wurde die Beladung gleicher Proteinmengen nachgewiesen. b) Semiquantitative RT-PCR Analyse der E2F1 mRNA-Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 80 μM Myc-Inhibitor. Die Cyclophilin mRNA diente dabei als Kontrolle.

3.5 E2F1 und c-Myc werden durch die katalytische PI3-Kinase Untereinheit p110α reguliert

Die PI3-Kinasen der Klasse I sind heterodimere Proteine, bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Die katalytische Untereinheit verfügt über 4 Isoformen (p110α, p110β, p110δ und p110γ), die regulatorische Untereinheit kann durch p85α, p85β oder p55γ gestellt werden (Zhao et Vogt, 2008; Engelman et al., 2006).

Um herauszufinden welche der 4 katalytischen Untereinheiten der Klasse I PI3-Kinase für die Regulation von E2F1 verantwortlich ist, wurde ein weiterer PI3K-Inhibitor sowie RNA-Interferenz verwendet.

Nachdem LY294002, der Standardinhibitor der PI3-Kinase, nicht isoformenspezifisch ist, wurde PI-103 verwendet, ein dual-spezifischer Hemmer von p110α und mTOR. Nach 24-

stündiger Behandlung von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen mit 1 μ M PI-103 wurde in der Westernblot-Analyse die Expression von c-Myc und E2F1 ermittelt. Hier konnte eine signifikante Minderung der Proteinexpression sowohl von c-Myc als auch von E2F1 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 14). Dadurch wurden die Ergebnisse, die durch den Einsatz von LY294002 gewonnen werden konnten (Knight et al., 2006), bestätigt und das bislang erarbeitete Konzept bezüglich der Regulation von E2F1 untermauert.

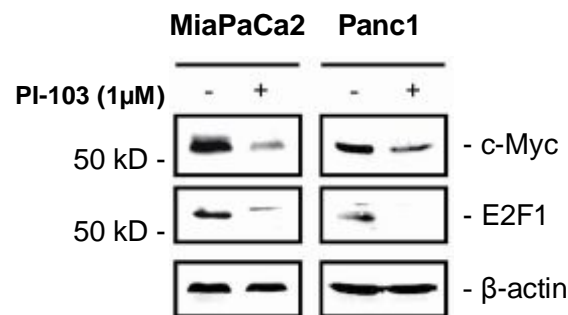


Abbildung 14: Die PI3-Kinase reguliert über die katalytische Untereinheit p110 α die Expression von c-Myc und E2F1. Westernblot-Analyse von c-Myc und E2F1 Expression in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit 1 μ M PI-103 Inhibitor. Mittels β -Aktin wurde die Beladung gleicher Proteinmengen gezeigt.

Anschließend wurde mittels RNA-Interferenz der Einfluss der katalytischen PI3-Kinase Untereinheit p110 α auf die Regulation von c-Myc und E2F1 validiert.

Hierfür wurden MiaPaCa2 und Panc1 Zellen mit p110 α -spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert.

72 Stunden nach Transfektion der Zellen mit p110 α -spezifischer siRNA konnte eine reduzierte Proteinexpression von c-Myc und E2F1 in der Westernblot-Analyse beobachtet werden (Abbildung 15). Dies war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die zuvor durch den Einsatz von PI-103 erlangt worden waren und deutet auf eine Regulation von c-Myc und E2F1 durch p110 α hin.

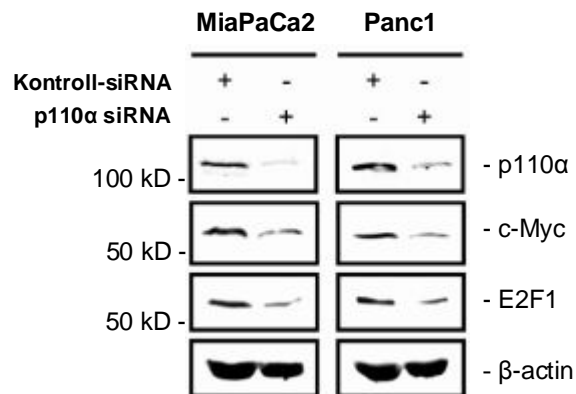


Abbildung 15: Der Knockdown der katalytischen PI3-Kinase Untereinheit p110 α inhibiert die c-Myc und E2F1 Expression. Westernblot-Analyse der p110 α , c-Myc und E2F1 Proteinexpression 72 Stunden nach Transfektion von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen mit einer p110 α -spezifischen siRNA.

3.6 Der PI3K-Signalweg kontrolliert die c-Myc Expression durch die Glykogensynthasekinase-3

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in Pankreaskarzinomzellen die E2F1 Expression in Abhängigkeit von der PI3-Kinase durch c-Myc kontrolliert wird, sollten die molekularen Mechanismen, die den PI3K-Signalweg mit c-Myc verbinden, untersucht werden.

Basierend auf dem Wissen, dass die Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3), ein AKT Substrat, durch die Hemmung des PI3K-Signalwegs aktiviert wird und den proteasomalen Abbau des c-Myc Proteins durch Phosphorylierung an Thr58 initiiert, sollte der Einfluss einer GSK-3-Inhibition auf die Regulation von c-Myc und E2F1 in Pankreaskarzinomzellen erforscht werden (Cross et al., 1995; Pap and Cooper, 1998; Sears et al., 2000).

Hierfür wurde der GSK-3-Inhibitor (2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime (BIO) verwendet.

Durch die gleichzeitige Hemmung der PI3-Kinase und der Glykogensynthasekinase-3 konnte die durch die PI3K-Inhibition induzierte Herunterregulation von E2F1 und c-Myc verhindert werden (Abbildung 16).

Dies deutet daraufhin, dass ein PI3K – AKT – GSK-3 Signalweg für die Expression von c-Myc verantwortlich ist.

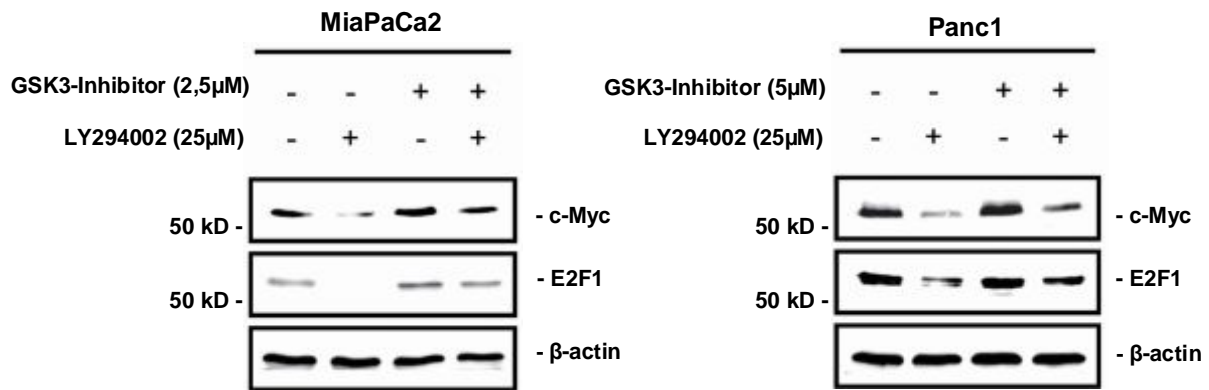


Abbildung 16: Die PI3-Kinase kontrolliert die Expression von c-Myc in Abhängigkeit von der Glykogensynthasekinase-3. MiaPaCa2 und Panc1 Zellen wurden über 24 Stunden entweder mit LY294002 (25 μM), GSK-3-Inhibitor (2,5 μM bzw. 5 μM) oder der Kombination aus LY294002 und GSK-3-Inhibitor behandelt. Als Kontrolle blieb ein Teil der Zellen unbehandelt. Anschließend wurden Westernblot-Analysen zur Detektion der c-Myc und E2F1 Proteinlevel durchgeführt. Mittels β-Aktin wurde die Beladung gleicher Proteinmengen überprüft.

3.7 c-Myc bindet an die E-Box des E2F1 Promotors

Um herauszufinden, ob die Regulation von E2F1 direkt durch Bindung des Transkriptionsfaktors c-Myc an den E2F1 Promotor erfolgt, wurden Avidin-Biotin-Komplex-DNA (ABCD)-Assays durchgeführt.

Das humane E2F1 Gen enthält innerhalb der Promotorregion eine E-Box mit der Konsensussequenz CACGTG. Durch den Austausch zweier Basen innerhalb dieser Konsensussequenz entstand das E2F1 E-Box_{mut} Oligonukleotid CATTTG (Abbildung 17).



Abbildung 17: Humaner E2F1 Genpromotor. Dargestellt sind der Abschnitt des E2F1 Promotors, der die E-Box enthält sowie die Mutation der E-Box, die in den ABCD-Assays verwendet wird.

Mit Hilfe der ABCD-Assays konnte gezeigt werden, dass c-Myc sowohl in den MiaPaCa2 als auch in den Panc1 Zellen an die E-Box des E2F1 Gens bindet. Eine Bindung von c-Myc an das biotinylierte, mutierte E2F1 E-Box Oligonukleotid dagegen war nicht nachweisbar. Dies zeigt, dass c-Myc spezifisch an die E-Box des E2F1 Promotors bindet (Abbildung 14).

Da die DNA-Bindung von c-Myc entscheidend von der Dimerisierung mit dem c-Myc Interaktionspartner Max abhängt (Prendergast et al.,1999), wurde der Einfluss des Myc-Inhibitors 10058-F4 auf die Bindung von c-Myc an die E2F1 E-Box untersucht. Wie erwartet, fand man nach 24-stündiger Inkubation mit dem Myc-Inhibitor, sowohl in MiaPaCa2 als auch in Panc1 Zellen eine eindeutige Reduktion der c-Myc Bindung (Abbildung 18).

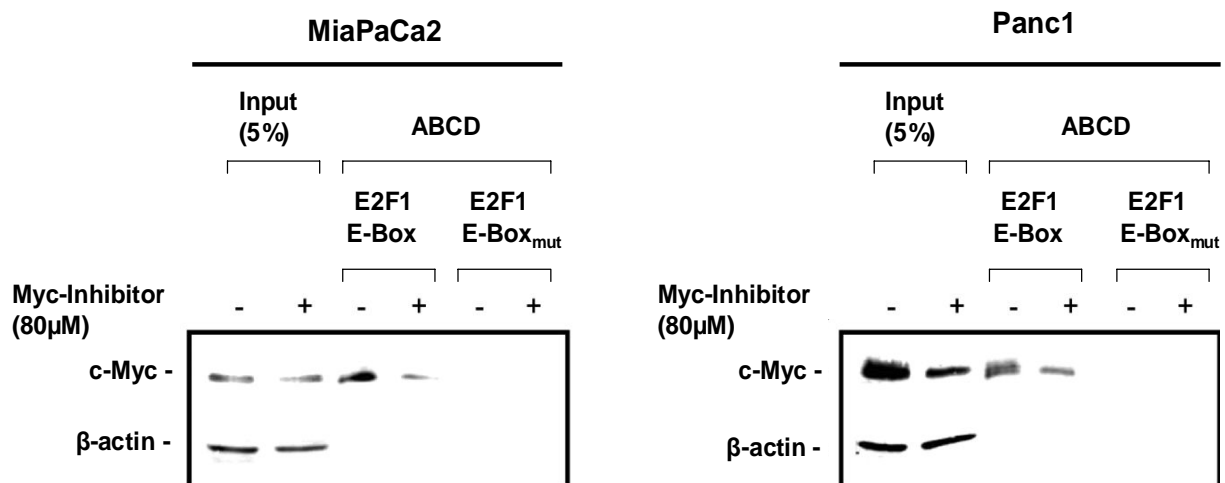


Abbildung 18: Aktives c-Myc bindet spezifisch an die c-Myc Konsensussequenz innerhalb des E2F1 Promotors. Avidin-Biotin-Komplex-DNA-Assay von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen, die 24 Stunden mit 80 μ M Myc-Inhibitor behandelt wurden oder als Kontrolle unbehandelt blieben. Für die Durchführung der Assays wurden 5'-biotinylierte Oligonukleotide verwendet, die entweder mit der E2F1 E-Box übereinstimmten oder als Kontrolle einer mutierten Form der E-Box (E2F1 E-Box_{mut}) entsprachen.

Anschließend wurde ermittelt, inwiefern die Bindung von c-Myc an die E2F1 E-Box durch eine Inhibition der PI3-Kinase beeinflusst wird. Nach 24-stündiger Behandlung mit LY294002 konnte in beiden Zelllinien eine deutlich verminderte Bindung von c-Myc an die E2F1 E-Box beobachtet werden (Abbildung 19).

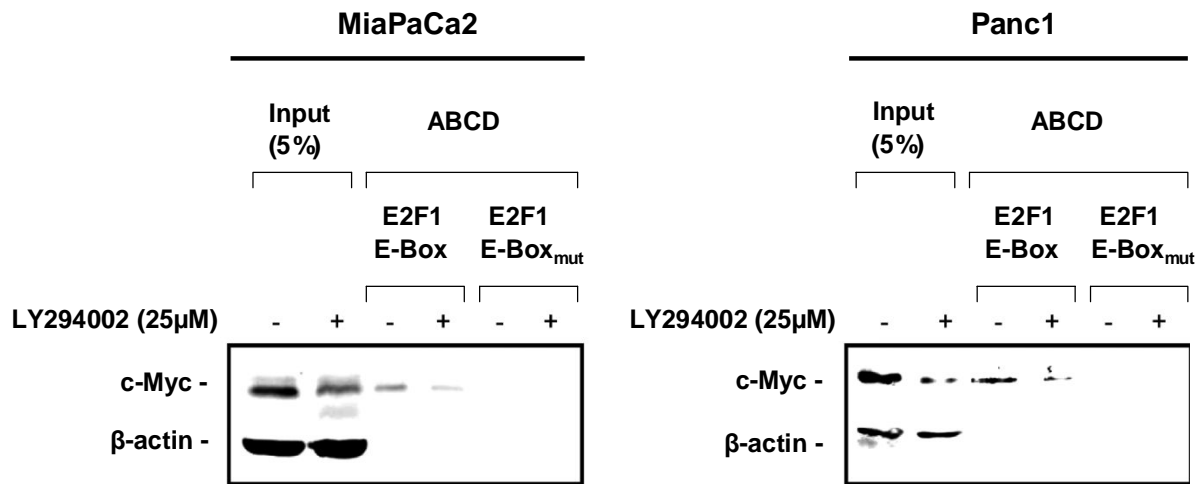


Abbildung 19: Die PI3-Kinase reguliert die Bindung von c-Myc an die E2F1 E-Box. Avidin-Biotin-Komplex-DNA-Assay von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen, die 24 Stunden mit 25 μ M LY294002 behandelt wurden oder als Kontrolle unbehandelt blieben. Für die Durchführung der Assays wurden 5'-biotinylierte Oligonukleotide verwendet, die entweder mit der E2F1 E-Box übereinstimmten oder als Kontrolle einer mutierten Form der E-Box (E2F1 E-Box_{mut}) entsprachen.

Zusammenfassend ergaben diese Daten, dass c-Myc an die E2F1 E-Box bindet und somit für die Regulation des E2F1 Gens in den Pankreaskarzinomzellen verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bindung von c-Myc an die E-Box des E2F1 Gens durch den PI3K-Signalweg gesteuert wird.

4 Diskussion

4.1 Der PI3K – AKT – GSK-3 Signalweg reguliert die Expression von c-Myc im Pankreaskarzinom

Die Expression des c-Myc Gens ist in einer großen Anzahl von humanen Krebserkrankungen dereguliert. Dies ist oftmals mit der Entstehung aggressiver und schlecht differenzierter Tumore assoziiert (Vita et al., 2006). c-Myc reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Darunter fallen Zellwachstum, Zellzyklusprogression, Energiemetabolismus, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose (Dansen et al., 2006; Eilers et al., 2008). Die konstitutive Aktivierung von c-Myc kann im Zuge einer gesteigerten Proteintranslation oder Proteininstabilität auftreten oder durch Translokation, Überexpression, Punktmutation bzw. Genamplifikation erfolgen (Nilsson et al., 2003; Vita et al., 2006). In ungefähr 30% der pankreatischen, duktaalen Adenokarzinome findet man eine Amplifikation des c-Myc Gens (Schleger et al., 2002), wohingegen das c-Myc Protein in annähernd 70% der Fälle überexprimiert wird (Li et al., 2005). Demnach scheint im Pankreaskarzinom vorzugsweise eine Fehlsteuerung transkriptioneller Mechanismen für die Überexpression des c-Myc Proteins verantwortlich zu sein. Der Transkriptionsfaktor NF-ATc1 (nuclear factor of activated T cells) ist im Pankreaskarzinom für gewöhnlich überexprimiert und trägt durch die transkriptionelle Aktivierung des c-Myc Onkogens entscheidend zur Malignität der Tumorzellen bei (Buchholz et al., 2006).

Neben der Amplifikation des c-Myc Gens und der NF-ATc1 abhängigen Aktivierung des c-Myc Promotors, kontrolliert in Pankreaskarzinomzellen der aktivierte PI3K Signalweg die Expression von c-Myc auf Proteinebene, wie in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Asano et al., 2004). Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass die Serin-Threonin Kinase GSK-3 an der Regulation der c-Myc Proteinexpression beteiligt ist und dadurch die Transkription von E2F1 und die Zellzyklusprogression in humanen Pankreaskarzinomzellen steuert.

In Säugerzellen besteht die Glykogensynthasekinase-3 (GSK3) aus zwei Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β , die sehr große Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Die GSK-3 ist ein wichtiges Enzym der Glykogenbiosynthese, welches die Phosphorylierung der Glykogensynthase, dem Schlüsselenzym der Glykogensynthese, katalysiert. Mittlerweile weiß man jedoch, dass die GSK-3 darüber hinaus essentiell für die Regulation von Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellüberleben sowie zahlreicher anderer zellulärer Funktionen ist. So ist gezeigt worden, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter c-Myc und NF- κ B, welche im

Pankreaskarzinom Proliferation und Zellüberleben vermitteln, von der Glykogensynthasekinase-3 kontrolliert werden (Pulverer et al., 1994; Hoeflich et al., 2000; Jope et Johnson, 2004; Ougolkov et al., 2005; Ougolkov et al., 2006; Wilson IIIrd et Baldwin 2008; Zhou et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die GSK-3 an der Regulation der Proteinexpression von c-Myc in humanen Pankreaskarzinomzellen beteiligt ist. Neben der GSK-3, tragen auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die PIM Kinasen zur Kontrolle der Proteinexpression und der Aktivität von c-Myc bei, so dass eine Beteiligung dieser Kinasen an der Aktivierung von c-Myc in Pankreaskarzinomzellen nicht ausgeschlossen werden kann (Pulverer et al., 1994; Zhang et al., 2008).

Nachdem durch eine verstärkte Expression von c-Myc Apoptose induziert wird und die Inhibition der GSK-3 eine apoptotische Antwort der Pankreaskarzinomzellen bedingt, könnte c-Myc nach Hemmung der GSK-3 zur Induktion von Apoptose im Pankreaskarzinom beitragen (Meyer et Penn, 2008; Ougolkov et al., 2005; Wilson IIIrd et Baldwin, 2008; Nieminen et al., 2007). Erst kürzlich wurde in Gliomzellen nach Inhibition der GSK-3 eine Hochregulation der c-Myc Aktivität beobachtet, welche eine verstärkte Expression der Apoptose-relevanten Moleküle Bax, TRAIL und des TRAIL-Rezeptors DR5 sowie eine Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins FLIP, allesamt bekannte Zielgene von c-Myc, zur Folge hatte (Ricci et al., 2004; Sheikh, 2004; Kotliarova et al., 2008).

Die inhibitorische Phosphorylierung der GSK-3 α an Serin 21 sowie der GSK-3 β an Serin 9 durch AKT in Pankreaskarzinomzellen ist bereits beschrieben worden (Asano et al., 2004). Weiterhin fand man heraus, dass durch Hemmung des PI3K – AKT Signalwegs c-Myc an Threonin 58 phosphoryliert und dadurch für den proteasomalen Abbau markiert wird (Asano et al., 2004). Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, liefert dies den Nachweis, dass die Expression von c-Myc in humanen Pankreaskarzinomzellen durch den linearen PI3K/p110 α – AKT – GSK-3 Signalweg reguliert wird. Über die Zielgene von c-Myc im Pankreaskarzinom ist bislang allerdings wenig bekannt.

4.2 c-Myc verbindet den PI3K – AKT Signalweg mit dem E2F1 Gen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das E2F1 Gen als Downstream-Effektor des PI3K/p110 α – AKT – GSK-3 – c-Myc Signalwegs in Pankreaskarzinomzellen identifiziert werden. Diese Erkenntnis beruht auf den Daten verschiedener Experimente. Dabei zeigte sich zum einen, dass der PI3K-Signalweg die Transkription von E2F1 kontrolliert. Darüber hinaus konnte

man nach Hemmung der PI3-Kinase mittels LY294002 eine verminderte c-Myc Proteinexpression in PDAC Zellen beobachten. Zellen, die zuvor entweder mit dem Myc-Inhibitor 10058-F4 oder einer c-Myc-spezifischen siRNA behandelt worden waren, wiesen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene eine verminderte E2F1 Expression auf. Passend zu den erhobenen Ergebnissen, wurde abschließend gezeigt, dass c-Myc spezifisch an die E-Box des E2F1 Promotors bindet. Diese Bindung konnte durch Einsatz des c-Myc Inhibitors bzw. durch PI3K-Hemmung reguliert werden.

Die in ChIP – Analysen gewonnenen Ergebnisse bestätigten die Beobachtung, dass c-Myc direkt an den E2F1 Promotor bindet. Ebenso konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Expression von c-Myc in ruhenden Zellen die Transkription des E2F1 Gens induziert (Leone et al., 1997; Fernandez et al., 2003; Leung et al., 2008).

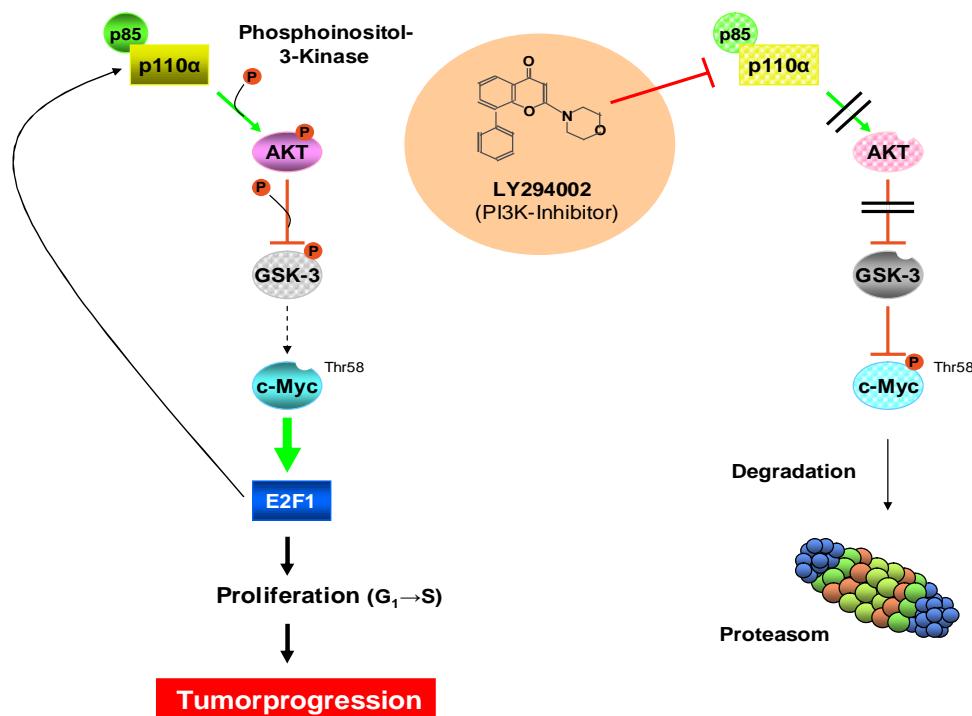


Abbildung 20: Der PI3K – AKT Signalweg reguliert die Expression von E2F1 via GSK-3 und c-Myc.

In einer kürzlich erschienenen Untersuchung zeigen Leung et al., dass die Bindung von c-Myc an die E2F Gene (E2F1, E2F2 und E2F3) eine Öffnung der Chromatinstruktur, gemessen am Azetylierungsstatus von Histon H4, bewirkt. Dies wiederum ermöglicht E2F1 die Bindung an die E2F Gene (Leung et al., 2008).

Ob c-Myc allerdings auch während der G₀/S-Phasenprogression in PDAC Zellen die Chromatinstruktur der E2F Gene öffnet und damit Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität

von E2F1 nimmt, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Ebenso ist unklar, ob c-Myc auch die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren, welche die Expression des E2F1 Gens regulieren, an die E2F Gene im Pankreaskarzinom ermöglicht. So steuert in Blasenkarzinomzellen neben E2F1 auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B direkt die E2F1- Promotoraktivität (Lin et al., 2006).

4.3 E2F1 und Zellzyklusprogression in Pankreaskarzinomzellen

Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren besteht aus 8 Mitgliedern (E2F1-E2F8), die an der Tumorentwicklung zahlreicher humaner Karzinome beteiligt sind (Polager et al., 2008). E2F1, E2F2 und E2F3a aktivieren pro-proliferative E2F-Zielgene, wie beispielsweise Cyclin E, auf transkriptioneller Ebene und werden innerhalb des Zellzyklus periodisch exprimiert. Die maximale Proteinmenge wird in der späten G₁ und der frühen S-Phase beobachtet. Durch die Überexpression von E2F1, E2F2 oder E2F3a kann in Nager-Fibroblasten unter Serumentzug, welcher sich für gewöhnlich hemmend auf die Zellproliferation auswirkt, die Zellzyklusprogression induziert werden (DeGregori et al., 2006).

Die Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren ist in humanen Tumoren oftmals dereguliert (Ginsberg, 2002). Im humanen Pankreaskarzinom zeigt sich, insbesondere in schlecht differenzierten Tumoren, eine Überexpression des E2F1 Gens. Bis zu 71,4% aller Pankreaskarzinomzellen färben sich im histologischen Schnitt positiv für E2F1 an. Die Überexpression von E2F1 ist mit der Expression verschiedener Proliferationsmarker assoziiert. Daraus lässt sich folgern, dass E2F1 eine wichtige Rolle für die Zellzyklusprogression in Pankreaskarzinomzellen spielt. Entsprechend dazu, ist die Überlebensrate von Patienten mit E2F1-positiven Tumoren nach R0-Resektionen deutlich verkürzt (Yamazaki et al., 2003). Die Funktion der weiteren E2F-Familienmitglieder ist in Pankreaskarzinomzellen bislang nicht untersucht.

Beweisend für die zentrale Rolle von E2F1 hinsichtlich Proliferation und G₀/S-Phasenübergang in Pankreaskarzinomzellen, konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass E2F1-depletierte MiaPaCa2 Zellen eine verzögerte Progression von der G₀- in die S-Phase im „Starvation-release“ Experiment aufwiesen. In dieser Arbeit zeigt sich in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 eine Induktion der zellzyklusrelevanten Gene Cyclin A und Cyclin E am G₁/S-Phasenübergang. Vor der Expression der Cyclin-Gene, wird E2F1 exprimiert, was die direkte Regulation von Cyclin A und E durch E2F1 in Panc1 Zellen nahe legt. Die Bindung von E2F1 am Cyclin A Promotor aktiviert die Transkription von Cyclin A.

Ist dagegen die E2F-Bindungsstelle im Cyclin A Promotor mutiert, kommt es nicht zu einer G₁/S-Phase spezifischen Induktion von Cyclin A (Schulze et al., 1995). Auch die Transkription von Cyclin E wird durch E2F1 kontrolliert (Ohtani et al., 1995).

Die E2F Transkriptionsfaktoren sind einer strengen Kontrolle durch Mitglieder der „pocket protein“ Familie, wie beispielsweise dem Retinoblastoma (RB)-Tumorsuppressorgen, unterworfen. Während der G₀- und frühen G₁-Phase werden E2F-abhängige Gene in der Regel über einen E2F4 bzw. E2F5/Pocket-Protein (Rb, Rb2, p107) -haltigen Komplex reprimiert, wohingegen die aktivierenden E2Fs an Pocket-Proteine gebunden inaktiviert sind (Tsantoulis et Gorgoulis, 2005). Durch die Phosphorylierung der Pocket-Proteine durch die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) kommt es zur Freisetzung der aktivierenden E2Fs und zur transkriptionellen Aktivierung eines genetischen Programms, das zur S-Phasenprogression benötigt wird (Attwooll et al., 2004). Obgleich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Transkription des E2F1 Gens direkt durch den PI3K-Signalweg kontrolliert wird, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der PI3K-Signalweg einen direkten Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des RB-Proteins nimmt und dadurch eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von E2F bedingt.

4.4 E2F1 aktiviert über einen positiven Feedback-Mechanismus den PI3K – AKT Signalweg

Das Zusammenspiel zwischen dem PI3K – AKT Signalweg und E2F1 ist komplex und kürzlich durchgeführte Untersuchungen konnten eindeutig nachweisen, dass E2F1 an der Aktivierung von PI3K und AKT beteiligt ist. So induziert E2F1 direkt die Transkription des Adaptorproteins Grb-associated binder 2 (Gab2) sowie des Proteins mature T cell proliferation 1 (p13 MTCP1), welche beide die Aktivierung von AKT beziehungsweise der PI3-Kinase vermitteln. Während p13 MTCP1 direkt an AKT bindet und die Aktivität der AKT-Kinase erhöht, wird Gab2 zunächst durch eine große Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an Tyrosin phosphoryliert und assoziiert daraufhin mit der p85 Untereinheit der PI3-Kinase. Dies stellt die Voraussetzung für die Aktivierung des PI3K – AKT Signalwegs dar (Chaussepied et Ginsberg, 2004; Laine et al., 2000; Nishida et Hirano, 2003; Nyga et al., 2005). Ferner fand man vor kurzem in einer in vivo-Studie heraus, dass die transgene Expression von E2F1 in der Leber die Expression von Gab2 sowie der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α induziert. Dies bewirkt konsekutiv die Aktivierung des AKT Signalwegs (Ladu et al., 2008).

Diese Beobachtungen verbunden mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, welche klar die transkriptionelle Induktion von E2F1 durch den PI3K – AKT Signalweg zeigen, weisen auf einen positiven Feedback-Mechanismus hin, der die gesteigerte Aktivität des PI3K – AKT Signalwegs sowie die erhöhte Expression von E2F1 in der Tumorentwicklung und im Malignom sicherstellt.

4.5 Ausblicke

Das duktales Pankreaskarzinom ist ein äußerst bösartiger Tumor mit infauster Prognose, welcher aufgrund meist fehlender klinischer Beschwerden sowie einem Mangel an effizienten Screeningmethoden oftmals erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Die Behandlungsmöglichkeiten haben sich obgleich immenser wissenschaftlicher Bemühungen während der letzten Jahrzehnte nicht wesentlich verbessert und führen kaum zu einer Verlängerung der Überlebensraten (Mitry et al., 2008). Um geeignete Therapieansätze zu entwickeln ist es daher umso wichtiger das molekulare Verständnis der Karzinogenese im Pankreaskarzinom weiter voranzutreiben.

Der PI3K – AKT Signalweg vermittelt Zellwachstum, Proliferation, Zellüberleben sowie Zellmotilität und ist in zahlreichen duktales Pankreaskarzinomen konstitutiv aktiv. Die Aktivierung dieses Signalwegs trägt in PDAC Zellen wesentlich zur Inhibition der durch Zytostatika induzierten Apoptose bei (West et al., 2002; Vivanco et Sawyers, 2002; Katso et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PI3K eine Herunterregulation von c-Myc und E2F1 bewirkt. Dies führt konsekutiv zu einer verminderten Zellproliferation. Andererseits wird jedoch auch die pro-apoptotische Funktion, die durch E2F1 und c-MYC vermittelt werden kann, reduziert. Inwieweit dies eine Limitation der therapeutischen Effizienz einer PI3K Inhibition im Pankreaskarzinom darstellt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Dennoch ist der PI3K – AKT Signalweg ein attraktiver Angriffspunkt für zukünftige pharmakotherapeutische Therapieoptionen.

Ob sich nun allerdings die alleinige Inhibition der PI3-Kinase mit konsekutiver Herunterregulation der pro-proliferativen E2F1-Funktion oder aber die kombinierte Hemmung von PI3K und GSK-3 mit Selektion der pro-apoptotischen E2F1-Wirkung als bessere Strategie zur Behandlung des duktales Pankreaskarzinoms erweist, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Der PI3K – AKT Signalweg ist in Pankreaskarzinomzellen mit der Zellzyklusprogression verknüpft, obgleich die genauen molekularen Mechanismen bislang nicht vollständig geklärt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde schwerpunktmäßig die Regulation des E2F1 Gens durch PI3K/AKT analysiert.

Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass E2F1 an den proximalen Genpromotor des F-Box Proteins S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) bindet und dessen Aktivität kontrolliert. SKP2 wiederum, ein Onkogen, welches den G₁-S-Phasenübergang in PDAC Zellen induziert, wird transkriptionell durch den PI3K – AKT Signalweg reguliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erbrachten, dass die Transkription des E2F1 Gens ebenfalls durch den PI3K-Signalweg reguliert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc in Pankreaskarzinomzellen an die E-Box des E2F1 Gens bindet und diese Bindung der Kontrolle des PI3K-Signalwegs unterliegt. Auf molekularer Ebene steuert der PI3K-Signalweg den Proteinumsatz von c-Myc in Abhängigkeit von der Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3). Zusammenfassend bedeutet dies, dass die PI3K – GSK-3 abhängige Regulation der c-Myc Proteinexpression mit der Transkription des E2F1 Gens in Pankreaskarzinomzellen verknüpft ist und dadurch der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus induziert wird.

6 Literaturverzeichnis

- Allison, D.C., Piantadosi, S., Hruban, R.H., Dooley, W.C., Fishman, E.K., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Pitt, H.A., Lin, P. & Cameron J.L. (1998). *DNA content and other factors associated with ten-year survival after resection of pancreatic carcinoma*. *J. Surg. Oncol.*, **67**: 151-159.
- Am. Cancer Soc. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, GA: *Am. Cancer Soc.*, 2007.
- Arlt, A., Gehrz, A., Mürköster, S., Vorndamm, J., Kruse, M.L., Fölsch, U.R. & Schäfer, H. (2003). *Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death*. *Oncogene*, **22**: 3243-3251.
- Asano, T., Yao, Y., Zhu, J., Li, D., Abbruzzese, J.L. & Reddy, S.A. (2004). *The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF- κ B and c-Myc in pancreatic cancer cells*. *Oncogene*, **23**: 8571-8580.
- Asano, T., Yao, Y., Shin, S., McCubrey, J., Abbruzzese, J.L. & Reddy, S.A. (2005). *Insulin receptor substrate is a mediator of phosphoinositide 3-kinase activation in quiescent pancreatic cancer cells*. *Cancer Research*, **65**: 9164-9168.
- Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E. & Helin, K. (2004). *The E2F family: specific functions and overlapping interests*. *EMBO J.*, **23**: 4709-4716.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. & Vogt, P.K. (2005). *Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation*. *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 921-929.
- Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D. & Pagano, M. (2004). *Control of the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C (Cdh1) ubiquitin ligase*. *Nature*, **428**: 190-193.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Kornmann, M., Beger, H.G. & Korc, M. (1996). *Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**: 886-890.
- Biliran, H. Jr., Banerjee, S., Thakur, A., Sarkar, F.H., Bollig, A., Ahmed, F., Wu, J., Sun, Y. & Liao, J.D. (2007). *c-Myc-induced chemosensitization is mediated by suppression of cyclin D1 expression and nuclear factor- κ B activity in pancreatic cancer cells*. *Clin. Cancer Res.*, **13**: 2811-2823.
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M. & Hershko, A. (2003). *Role of the SCF^{Skp2} ubiquitin ligase in the degradation of p21^{Cip1} in S phase*. *J. Biol. Chem.*, **278**: 25752-25757.
- Bradford, M.M. (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.
- Buchholz, M., Braun, M., Heidenblut, A., Kestler, H.A., Klöppel, G., Schmiegel, W., Hahn, S.A., Lüttges, J. & Gress, T.M. (2005). *Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions*. *Oncogene*, **24**: 6626-6636.

- Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T.M. & Ellenrieder, V. (2006). *Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway.* EMBO J., **25**: 3714-3724.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. & Pagano, M. (1999). *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27.* Nat. Cell. Biol., **1**: 193-199.
- Carter, N.P. & Vetrie, D. (2004). *Applications of genomic microarrays to explore human chromosome structure and function.* Hum. Mol. Genet., **13**: 297-302.
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A. & McCubrey, J.A. (2003). *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy.* Leukemia, **17**: 590-603.
- Chaussepied, M. & Ginsberg, D. (2004). *Transcriptional regulation of AKT activation by E2F.* Mol. Cell., **16**: 831-837.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. (1995). *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.* Nature, **378**: 785-789.
- Dansen, T.B., Whitfield, J., Rostker, F., Brown-Swigart, L. & Evan, G.I. (2006). *Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo.* J. Biol. Chem., **281**: 10890-10895.
- DeGregori, J. & Johnson, D.G. (2006). *Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis.* Curr. Mol. Med., **6**: 739-748.
- Dyson, N. (1998). *The regulation of E2F by pRB-family proteins.* Genes Dev., **12**: 2245-2262.
- Eckel, F., Schneider, G. & Schmid, R.M. (2006). *Pancreatic cancer: a review of recent advances.* Expert Opin. Investig. Drugs, **15**: 1395-1410.
- Eilers, M. & Eisenman, R.N. (2008). *Myc's broad reach.* Genes Dev., **22**: 2755-2766.
- Elliott, M.J., Farmer, M.R., Atienza, C. Jr., Stilwell, A., Dong, Y.B., Yang, H.L., Wong, S.L. & McMasters, K.M. (2002). *E2F-1 gene therapy induces apoptosis and increases chemosensitivity in human pancreatic carcinoma cells.* Tumour Biol., **23**: 76-86.
- Engelman, J.A., Luo, J. & Cantley, L.C. (2006). *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.* Nat. Rev. Genet., **7**: 606-619.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. & Amati, B. (2003). *Genomic targets of the human c-Myc protein.* Genes Dev., **17**: 1115-1129.
- Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R.H. & Maitra, A. (2007). *Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia.* J Hepatobiliary Pancreat Surg., **14**: 224-232.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. & González-Barón, M. (2004). *PI3K/Akt signalling pathway and cancer.* Cancer Treat. Rev., **30**: 193-204.
- Genovese, C., Trani, D., Caputi, M. & Claudio, P.P. (2006). *Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family.* Oncogene, **25**: 5201-5209.
- Ginsberg, D. (2002). *E2F1 pathways to apoptosis.* FEBS Lett., **529**: 122-125.

- Graña, X. & Reddy, E.P. (1995). *Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. Oncogene, **11**: 211-219.
- Hallstrom, T.C. & Nevins, J.R. (2003). *Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **100**: 10848-10853.
- Hallstrom, T.C., Mori, S. & Nevins, J.R. (2008). *An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death*. Cancer Cell, **13**: 11-22.
- Hamacher, R., Schmid, R.M., Saur, D. & Schneider, G. (2008). *Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mol Cancer, **7**:64.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N. & Depinho, R.A. (2006). *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev, **20**: 1218-1249.
- Hingorani, S.R., Petricoin III, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V., Hruban, R.H., Lowy, A.M. & Tuveson, D.A. (2003). *Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in mouse*. Cancer Cell, **4**: 437-450.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. & Woodgett, J.R. (2000). *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, **406**: 86-90.
- Iaquinta, P.J. & Lees, J.A. (2007). *Life and death decisions by the E2F transcription factors*. Curr. Opin. Cell Biol., **19**: 649-657.
- Jiang, B.H. & Liu, L.Z. (2008). *PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis*. Biochim. Biophys. Acta, **1784**: 150-158.
- Jope, R.S. & Johnson, G.V. (2004). *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends Biochem. Sci., **29**: 95-102.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J. & Waterfield, M.D. (2001). *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **17**: 615-675.
- Keenan, S.M., Lents, N.H. & Baldassare, J.J. (2004). *Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression*. J. Biol. Chem., **279**: 5387-5396.
- Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., Balla, T., Weiss, W.A., Williams, R.L. & Shokat, K.M. (2006). *A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling*. Cell, **125**: 733-747.
- Kolb, S., Fritsch, R., Saur, D., Reichert, M., Schmid, R.M. & Schneider, G. (2007). *HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells*. Cancer Res., **67**: 4679-4686.
- Koorstra, J.M., Hustinx, S.R., Offerhaus, G.J. & Maitra, A. (2008). *Pancreatic carcinogenesis*. Pancreatology, **8**: 110-125.

- Koorstra, J.M., Feldmann, G., Habbe, N. & Maitra, A. (2008). *Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs)*. Langenbecks Arch Surg., **393**: 561-570.
- Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L.C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., Bailey, R., Maric, D., Zenklusen, J.C., Lee, J. & Fine, H.A. (2008). *Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation*. Cancer Res., **68**: 6643-6651.
- Ladu, S., Calvisi, D.F., Conner, E.A., Farina, M., Factor, V.M. & Thorgeirsson, S.S. (2008). *E2F1 inhibits c-Myc-driven apoptosis via PIK3CA/Akt/mTOR and COX-2 in a mouse model of human liver cancer*. Gastroenterology, **135**: 1322-1332.
- Laine, J., Künstle, G., Obata, T., Sha, M. & Noguchi, M. (2000). *The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator*. Mol. Cell., **6**: 395-407.
- Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L. & Nevins, J.R. (1997). *Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F*. Nature, **387**: 422-426.
- Leung, J.Y., Ehmann, G.L., Giangrande, P.H. & Nevins, J.R. (2008). *A role for Myc in facilitating transcription activation by E2F1*. Oncogene, **27**: 4172-4179.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R. & Abbruzzese, J.L. (2004). *Pancreatic cancer*. Lancet, **363**: 1049-1057.
- Li, Y.J., Wei, Z.M., Meng, Y.X. & Ji, X.R. (2005). *β -catenin up-regulates the expression of cyclin D1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis*. World J. Gastroenterol., **11**: 2117-2123.
- Liang, J. & Slingerland, J.M. (2003). *Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression*. Cell Cycle, **2**: 339-345.
- Liau, S.S., Jazag, A. & Whang, E.E. (2006). *HMGAI is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res., **66**: 11613-11622.
- Liau, S.S., Jazag, A., Ito, K. & Whang, E.E. (2007). *Overexpression of HMGA1 promotes anoikis resistance and constitutive Akt activation in pancreatic adenocarcinoma cells*. Br. J. Cancer, **96**: 993-1000.
- Liau, S.S. & Whang, E. (2008). *HMGAI is a molecular determinant of chemoresistance to Gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma*. Clin. Cancer Res., **14**: 1470-1477.
- Lin, C.Y., Liang, Y.C. & Yung, B.Y. (2006). *Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF-kappaB, E2F1 and pRB*. Cell Signal, **18**: 2041-2048.
- Lin, W.C., Lin, F.T. & Nevins, J.R. (2001). *Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation*. Genes Dev., **15**: 1833-1844.
- Logsdon, C.D., Simeone, D.M., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, J.K., Giordano, T.J., Misek, D.E., Kuick, R. & Hanash, S. (2003). *Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer*. Cancer Res., **63**: 2649-2657.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G.M., Bernstein, W.B. & Dennis, P.A. (2008). *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. Drug Resist. Updat., **11**: 32-50.

- Mazur, P.K., Einwächter, H., Lee, M., Sipos, B., Nakhai, H., Rad, R., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., Klöppel, G., Schmid, R.M. & Siveke, J.T. (2010). *Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma.* Proc Natl Acad Sci USA, **107**: 13438-13443.
- Meyer, N. & Penn, L.Z. (2008). *Reflecting on 25 years with MYC.* Nat. Rev., **8**: 976-990.
- Mitry, E., Racht, B., Quinn, M.J., Cooper, N. & Coleman, M.P. (2008). *Survival from cancer of the pancreas in England and Wales up to 2001.* Br. J. Cancer, **99 Suppl 1**: 24-25.
- Murphy, D.J., Junttila, M.R., Pouyet, L., Karnezis, A., Shchors, K., Bui, D.A., Brown-Swigart, L., Johnson, L. & Evan, G.I. (2008). *Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo.* Cancer Cell, **14**: 447-457.
- Nakayama, K.I., Hatakeyama, S. & Nakayama, K. (2001). *Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27^{Kip1}.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **282**: 853-860.
- Ng, S.S.W., Tsao, M.-S., Chow, S. & Hedley, D.W. (2000). *Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances Gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells.* Cancer Res., **60**: 5451-5455.
- Ng, S.S.W., Tsao, M.-S., Nicklee, T. & Hedley, D.W. (2001). *Wortmannin inhibits PKB/Akt phosphorylation and promotes Gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice.* Clinical Cancer Research, **7**: 3269-3275.
- Nieminen, A.I., Partanen, J.I. & Klefstrom, J. (2007). *c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc.* Cell Cycle, **6**: 2464-2472.
- Nilsson, J.A. & Cleveland, J.L. (2003). *Myc pathways provoking cell suicide and cancer.* Oncogene, **22**: 9007-9021.
- Nishida, K. & Hirano, T. (2003). *The role of Gab family scaffolding adapter proteins in the signal transduction of cytokine and growth factor receptors.* Cancer Sci., **94**: 1029-1033.
- Nyga, R., Pecquet, C., Harir, N., Gu, H., Dhennin-Duthille, I., Régnier, A., Gouilleux-Gruart, V., Lassoued, K. & Gouilleux, F. (2005). *Activated STAT5 proteins induce activation of the PI 3-kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab2 scaffolding adapter.* Biochem J., **390**: 359-366.
- Ohtani, K., DeGregori, J. & Nevins, J.R. (1995). *Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **92**: 12146-12150.
- Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. (2004). *PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer.* Apoptosis, **9**: 667-676.
- Ougolkov, A.V., Fernandez-Zapico, M.E., Savoy, D.N., Urrutia, R.A. & Billadeau, D.D. (2005). *Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells.* Cancer Res., **65**: 2076-2081.
- Ougolkov, A.V., Fernandez-Zapico, M.E., Bilim, V.N., Smyrk, T.C., Chari, S.T. & Billadeau, D.D. (2006). *Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation.* Clin. Cancer Res., **12**: 5074-5081.

- Pap, M. & Cooper, G.M. (1998). *Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway.* J. Biol. Chem., **273**: 19929-19932.
- Planchon, S.M., Waite, K.A. & Eng, C. (2008). *The nuclear affairs of PTEN.* J. Cell. Sci., **121**: 249-253.
- Plath, T., Peters, M., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Radke, C., Wiedenmann, B. & Rosewicz, S. (2002). *Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis.* J. Natl. Cancer Inst. **94**: 129-142.
- Polager, S. & Ginsberg, D. (2008). *E2F – at the crossroads of life and death.* Trends Cell Biol., **18**: 528-535.
- Prendergast, G.C. (1999). *Mechanisms of apoptosis by c-Myc.* Oncogene, **18**: 2967-2987.
- Pulverer, B.J., Fisher, C., Vousden, K., Littlewood, T., Evan, G. & Woodgett, J.R. (1994). *Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo.* Oncogene, **9**: 59-70.
- Reichert, M., Saur, D., Hamacher, R., Schmid, R.M. & Schneider, G. (2007). *Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.* Cancer Res., **67**: 4149-4156.
- Ricci, M.S., Jin, Z., Dews, M., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., Dicker, D.T. & El-Deiry, W.S. (2004). *Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity.* Mol. Cell. Biol., **24**: 8541–8555.
- Rödicker, F., Stiewe, T., Zimmermann, S. & Putzer, B.M. (2001). *Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction.* Cancer Res., **61**: 7052-7055.
- Roig, J.M., Molina, M.A., Cascante, A., Calbó, J., Carbó, N., Wirtz, U., Sreedharan, S., Fillat, C. & Mazo, A. (2004). *Adenovirus-mediated retinoblastoma 94 gene transfer induces human pancreatic tumor regression in a mouse xenograft model.* Clin. Cancer Res., **10**: 1454-1462.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J. & Kern, S.E. (1997). *Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.* Cancer Res., **57**: 1731-1734.
- Sandgren, E.P., Quaife, C.J., Paulovich, A.G., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1991). *Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 93-97.
- Schleger, C., Verbeke, C., Hildenbrand, R., Zentgraf, H. & Bleyl, U. (2002). *c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance.* Mod. Pathol., **15**: 462-469.
- Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamooj, R., Beckett, L. & Bold, R.J. (2003). *Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer.* Br. J. Cancer, **89**: 2110-2115.
- Schneider, G. & Schmid, R.M. (2005). *Pathogenesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma: implications for future therapies?* Internist (Berl.), **46**: 157-165.
- Schneider, G., Siveke, J.T., Eckel, F. & Schmid, R.M. (2005). *Pancreatic cancer: basic and clinical aspects.* Gastroenterology, **128**: 1606-1625.

- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Bergès, J., Helin, K., Jansen-Dürr, P. & Henglein, B. (1995). *Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **92**: 11264-11268.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K. & Nevins, J.R. (2000). *Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability*. Genes Dev., **14**: 2501-2514.
- Semba, S., Moriya, T., Kimura, W. & Yamakawa, M. (2003). *Phosphorylated Akt/PKB controls cell growth and apoptosis in intraductal papillary-mucinous tumor and invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas*. Pancreas, **26**: 250-257.
- Sheikh, M.S. (2004). *Myc tagging along the TRAIL to death receptor 5*. Cell Cycle, **3**: 920-922.
- Shibusawa, N., Hollenberg, A.N. & Wondisford, F.E. (2003). *Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation*. J. Biol. Chem., **278**: 732-738.
- Shim, E.H., Johnson, L., Noh, H.L., Kim, Y.J., Sun, H., Zeiss, C. & Zhang, H. (2003). *Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate*. Cancer Res., **63**: 1583-1588.
- Singh, S., Johnson, J. & Chellappan, S. (2010). *Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription*. Biochim. Biophys. Acta., **1799**: 788-794.
- Skoudy, A., Hernández-Muñoz, I. & Navarro, P. (2011). *Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: role of c-Myc*. J. Gastrointest. Canc., **42**: 76-84.
- Sohn, T.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R.A., Sauter, P.K., Coleman, J., Hruban, R.H. & Lillemoe, K.D. (2000). *Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators*. J. Gastrointest. Surg., **4**: 567-579.
- Soucek, L. & Evan G.I. (2010). *The ups and downs of myc biology*. Curr Opin Genet Dev., **20**: 91-95.
- Stanelle, J. & Pützer, B.M. (2006). *E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics*. Trends Mol Med., **12**: 177-185.
- Sutterlüty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Müller, U. & Krek, W. (1999). *p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells*. Nat. Cell. Biol., **1**: 207-214.
- Takeda, A., Osaki, M., Adachi, K., Honjo, S. & Ito, H. (2004). *Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines*. Pancreas, **28**: 353-358.
- Tsantoulis, P.K. & Gorgoulis, V.G. (2005). *Involvement of E2F transcription factor family in cancer*. Eur. J. Cancer., **41**: 2403-2414.
- Vita, M. & Henriksson, M. (2006). *The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer*. Semin. Cancer Biol., **16**: 318-330.
- Vivanco, I. & Sawyers, C.L. (2002). *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat. Rev. Cancer, **2**: 489-501.

- Warshaw, A.L. & Fernández-del Castillo, C. (1992). *Pancreatic carcinoma*. N. Engl. J. Med., **326**: 455-465.
- West, K.A., Castillo, S.S. & Dennis, P.A. (2002). *Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance*. Drug Resist. Updat., **5**: 234-248.
- Wilson, W. IIIrd & Baldwin, A.S. (2008). *Maintenance of constitutive IkappaB kinase activity by glycogen synthase kinase-3alpha/beta in pancreatic cancer*. Cancer Res., **68**: 8156-8163.
- Winter, J.M., Cameron, J.L., Campbell, K.A., Arnold, M.A., Chang, D.C., Coleman, J., Hodgins, M.B., Sauter, P.K., Hruban, R.H., Riall, T.S., Schulick, R.D., Choti, M.A., Lillemoe, K.D. & Yeo, C.J. (2006). *1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: a single-institution experience*. J. Gastrointest. Surg., **10**: 1199-1210.
- Wirth, M., Fritsche, P., Stojanovic, N., Brandl, M., Jaeckel, S., Schmid, R.M., Saur, D. & Schneider, G. *A simple and cost-effective method to transfect siRNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine (PEI)*. Pancreas (2011), **40**: 144-150.
- Yamazaki, K., Yajima, T., Nagao, T., Shinkawa, H., Kondo, F., Hanami, K., Asoh, A., Sugano, I. & Ishida, Y. (2003). *Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study*. Pathol. Res. Pract., **199**: 23-28.
- Yeo, T.P., Hruban, R.H., Leach, S.D., Wilentz, R.E., Sohn, T.A., Kern, S.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Maitra, A., Goggins, M., Canto, M.I., Abrams, R.A., Laheru, D., Jaffee, E.M., Hidalgo, M. & Yeo, C.J. (2002). *Pancreatic cancer*. Curr. Probl. Cancer, **26**: 176-275.
- Yin, X., Giap, C., Lazo, J.S. & Prochownik, E.V. (2003). *Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function*. Oncogene, **22**: 6151-6159.
- Zhang, Y., Wang, Z., Li, X. & Magnuson, N.S. (2008). *Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation*. Oncogene, **27**: 4809-4819.
- Zhao, L. & Vogt, P.K. (2008). *Class I PI3K in oncogenic cellular transformation*. Oncogene, **27**: 5486-5496.
- Zhou, F., Zhang, L., Wang, A., Song, B., Gong, K., Zhang, L., Hu, M., Zhang, X., Zhao, N. & Gong, Y. (2008). *The association of GSK3 beta with E2F1 facilitates nerve growth factor-induced neural cell differentiation*. J. Biol. Chem., **283**: 14506-14515.
- Zhu, L. (2005). *Tumour suppressor retinoblastoma protein Rb: a transcriptional regulator*. Eur. J. Cancer, **41**: 2415-2427.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Arbeit im Labor und beim Verfassen dieser Dissertationsarbeit gefördert und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Günter Schneider, meinem Doktorvater, für seine uneingeschränkte Unterstützung und Förderung sowie die Überlassung dieser Promotionsarbeit. Er stand mir mit seinem außergewöhnlichen Wissensschatz stets zur Seite und vermittelte mir mit großer Geduld und Hilfsbereitschaft die Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit. Seine zahlreichen neuen Ideen sowie der Freiraum, den er mir bei meiner Arbeit ließ, haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Roland M. Schmid danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit in seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu können.

Für die geduldige Einweisung in sämtliche notwendige Arbeitstechniken sowie die ständige Unterstützung und Hilfe bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Kerstin Hoffmann, Frau Birgit Kohnke-Ertel und Frau Tatjana Netz.

Des Weiteren möchte mich bei allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern und insbesondere bei Herrn Matthias Wirth für die ausgezeichnete und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Abschließend danke ich von Herzen meinen Eltern, die mir durch ihren Rückhalt und die fortwährende Unterstützung das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben.