

Technische Universität München
Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Untersuchungen zum Wechselspiel zwischen
NFκB/p65 und dem Tumorsuppressor p53 *in vitro*
sowie zur Rolle des NFκB-Inhibitors beta (IκBβ)
in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms *in vivo*

Annika Henrich

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schemann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.
2. Priv.-Doz. Dr. Günter Schneider

Die Dissertation wurde am 10.11.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.09.2016 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2 Das Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.....	2
1.3 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms.....	3
1.4 Der Transkriptionsfaktor NFκB.....	4
1.4.1 Funktion und Struktur.....	4
1.4.2 Aktivierung und Regulation von NFκB.....	5
1.5 Inhibitoren von NFκB: Die IκB-Proteine.....	7
1.5.1 Funktion und Struktur.....	7
1.5.2 Die typischen IκB-Proteine.....	8
1.6 Die Rolle von NFκB in Tumoren.....	10
1.6.1 NFκB im Pankreaskarzinom.....	11
1.6.2 NFκB im murinen Pankreaskarzinom.....	11
1.7 Der Tumorsuppressor p53.....	12
1.7.1 Funktion und Struktur.....	12
1.7.2 Aktivierung und Regulation.....	13
1.8 p53 in Tumoren.....	14
1.9 Wechselspiel zwischen p53 und NFκB.....	15
1.10 Zielsetzungen der Arbeit.....	16
2 MATERIAL	18
2.1 Geräte.....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.3 Allgemeine Reagenzien.....	20
2.4 Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur.....	22
2.4.1 Verwendete Reagenzien in der Zellkultur.....	23
2.4.2 Zusammensetzung der Medien.....	24
2.5 Kommerziell erhältliche Kits.....	24
2.6 Microarray Chips.....	24
2.7 Puffer und Lösungen.....	24
2.8 Oligonukleotide.....	27
2.9 Antikörper.....	28
2.10 Reagenzien für Immunhistochemie.....	29
3 METHODEN	30
3.1 Zellbiologische Methoden.....	30

3.1.1	Kultivierung und Aussaat von Zellen	30
3.1.2	Einfrieren von Zellen.....	30
3.1.3	siRNA-Transfektionen	30
3.1.4	Behandlung von Zellen mit Zytostatika/Chemotherapeutika.....	31
3.1.5	Behandlung der Zellen mit TNF α	32
3.1.6	Hoechst-Färbung.....	32
3.1.7	MTT-Assay	32
3.1.8	Caspase-Assay	33
3.2	Molekularbiologische Methoden	33
3.2.1	Ganzzellextrakte.....	33
3.2.2	Zytosolische und nukleäre Extrakte	34
3.2.3	ABCD-Assay.....	34
3.2.4	<i>Western Blot</i>	35
3.2.5	Chromatin-Immunpräzipitation	36
3.2.6	Agarosegele	39
3.2.7	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>qRT-PCR</i>).....	39
3.2.8	Transkriptomanalyse mittels <i>Microarray</i>	42
3.3	<i>In vivo</i> -Methoden.....	42
3.3.1	Haltung der Mäuse	42
3.3.2	Mauslinien	42
3.3.3	Kreuzen und Genotypisierung der Mauslinien	44
3.3.4	Töten der Mäuse und Organentnahme	46
3.3.5	Isolation von Primärzellen aus Pankreastumoren.....	46
3.3.6	Isolation von RNA aus Pankreasgewebe	47
3.3.7	Mikrotomschnitte von Organen	47
3.3.8	H&E-Färbung.....	47
3.3.9	Immunhistochemie	48
3.4	Statistische Analysen	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Wechselspiel zwischen stimuliertem NF κ B und dem Tumorsuppressor p53	50
4.1.1	Murine p53 ^{R172H} -exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber Doxorubicin und Etoposid.....	50
4.1.2	Murine p53 ^{R172H} -exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind auch weniger sensitiv gegenüber TNF α	51
4.1.3	p53 ^{R172H} verstärkt die Expression des antiapoptotischen NF κ B-Zielgens <i>Survivin</i> in murinen Pankreaskarzinomzellen.....	52
4.1.4	Die Herunterregulation von p53 ^{R172H} und p65 sensitiviert gegenüber TNF α	53
4.1.5	Die Behandlung von TNF α führt zu einer gemeinsamen Bindung von p53 ^{R172H} und NF κ B/p65 an eine κ B-Konsensussequenz	53
4.1.6	Hydroxyurea induziert die Bildung eines DNA-Komplexes aus NF κ B/p65 und p53-Wildtyp	54

4.1.7	Humane p53-defiziente Kolonkarzinomzellen sind sensitiver gegenüber TNF α	55
4.1.8	Die Regulation des p53-Zielgens <i>PUMA</i> durch Etoposid ist NF κ B/p65- unabhängig.	56
4.2	Einfluss des NF κ B-Inhibitors beta (I κ B β) auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms	57
4.2.1	Der Verlust von I κ B β im Pankreas von <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen korreliert mit einer verminderten Zytokinexpression.....	57
4.2.2	Der Verlust von I κ B β im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell hat keinen Einfluss auf die PanIN-Progression	59
4.2.3	Die I κ B β -Defizienz im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell hat keinen Einfluss auf das Überleben der Mäuse	61
4.2.4	Der Verlust von I κ B β im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell erhöht die I κ B α -Proteinexpression <i>in vitro</i>	62
4.2.5	Die Überexpression von I κ B α führt nicht zu einer verminderten Translokation von NF κ B/p65-Expression in den Nukleus	63
4.2.6	Die Hochregulation von I κ B α sensitiviert nicht gegenüber Doxorubicin bzw. Etoposid..	64
4.2.7	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} und <i>p53</i> ^{R172H/+} akzelerieren die Progression der <i>Kras</i> ^{G12D} -induzierten Tumorgenese	66
4.2.8	Die I κ B β -Defizienz im <i>Kras</i> ^{G12D} und <i>p53</i> ^{R172H} exprimierenden Pankreaskarzinommodell akzeleriert nicht die PanIN-Progression	68
4.2.9	Die I κ B β -Defizienz führt zu einer verstärkten Translokation von NF κ B/p65 in den Nukleus muriner <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+} -Pankreaskarzinomzellen	69
4.2.10	Identifizierung signifikanter E2F-Gensignaturen in murinem <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+} -Pankreaskarzinomgewebe	71
5	DISKUSSION.....	73
5.1	Wechselspiel zwischen dem Transkriptionsfaktor NF κ B und dem Tumorsuppressor p53..	73
5.1.1	Wechselspiel zwischen <i>p53</i> ^{R172H} und NF κ B/p65	73
5.1.2	Wechselspiel zwischen p53-Wildtyp und NF κ B/p65	75
5.1.3	Modelle und Auswirkungen des Wechselspiels zwischen NF κ B/p65 und p53	77
5.1.4	Zusammenfassung und Ausblick	78
5.2	Einfluss des NF κ B-Inhibitors beta (I κ B β) auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms	79
5.2.1	Verminderte Zytokinexpression in <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen hat keinen Einfluss auf die Karzinogenese eines Pankreaskarzinoms	79
5.2.2	Der Verlust von I κ B β im murinen <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell scheint durch I κ B α kompensiert zu werden	81
5.2.3	I κ B β -Defizienz verstärkt die nukleäre Translokation von NF κ B/p65 in <i>Kras</i> ^{G12D} - und <i>p53</i> ^{R172H} -exprimierenden Pankreaskarzinomzellen	82
5.2.4	Ausblick und therapeutische Ansätze	84
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
7	SUMMARY.....	88
8	LITERATUR	89

9	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	104
10	DANKSAGUNG.....	105
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.....	2
Abbildung 1.2: Die Mitglieder der NFκB-Familie.....	4
Abbildung 1.3: Der atypische, der klassische (kanonische) und der alternative (nicht-kanonische) NFκB-Signalweg.....	5
Abbildung 1.4: Die Familie der IκB-Proteine.....	8
Abbildung 1.5: Durch den Transkriptionsfaktor NFκB regulierte onkogene Zielgene.....	10
Abbildung 1.6: Der Tumorsuppressor p53.....	12
Abbildung 1.7: Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen... ..	13
Abbildung 4.1: p53 ^{R172H} -exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber Topoisomerase II-Inhibitoren als p53-defiziente Zellen.....	50
Abbildung 4.2: p53 ^{R172H} -exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber TNFα als p53-defiziente Zellen.....	51
Abbildung 4.3: Murines p53 ^{R172H} begünstigt die Expression des antiapoptotischen NFκB-Zielgens <i>Survivin</i>	52
Abbildung 4.4: Die Herunterregulation von p53 ^{R172H} und NFκB/p65 führt zu einer Sensitivierung gegenüber TNFα.....	53
Abbildung 4.5: TNFα führt zu einer gemeinsamen Bindung von p53 ^{R172H} und NFκB/p65 an eine κB-Konsensussequenz.....	54
Abbildung 4.6: HU-induzierte Bindung von NFκB/p65 und p53WT an die Genpromotoren der NFκB-Zielgene <i>FASL</i> und <i>MnSOD</i>	54
Abbildung 4.7: p53-defiziente HCT116-Zellen sind sensitiver gegenüber TNFα als p53-profiziente HCT116-Zellen.....	55
Abbildung 4.8: Die Etoposid-induzierte Expression von PUMA und p21 ist von NFκB/p65 unabhängig.....	56
Abbildung 4.9: IκBβ und IL-1β werden im murinen <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell hoch exprimiert.....	57
Abbildung 4.10: Die mRNA-Expression der Zytokine IL-6, KC und TNFα ist in <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Tumormäusen herunterreguliert.....	58
Abbildung 4.11: Verstärkte Makrophagenrekrutierung im pankreatischen Gewebe von <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Tumormäusen.....	59
Abbildung 4.12: Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) vier und zwölf Wochen alter IκBβ-defizienter Mäuse im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Modell.....	60
Abbildung 4.13: Überleben und Morphologie des Pankreas IκBβ-defizienter Tumormäuse im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Pankreaskarzinommodell.....	61
Abbildung 4.14: Erhöhte IκBα-Proteinexpression in IκBβ-defizienten p53WT-Pankreaskarzinomzellen.....	62
Abbildung 4.15: Intrazelluläre Lokalisation von NFκB/p65.....	64

Abbildung 4.16: Verstärkte I κ B α -Expression in p53WT-exprimierenden <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{<i>Cre/+</i>} ; <i>LSL-Kras</i> ^{<i>G12D/+</i>} -Pankreaskarzinomzellen hat keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Etoposid.	65
Abbildung 4.17: I κ B β -Defizienz in Kooperation mit <i>Kras</i> ^{<i>G12D</i>} und p53 ^{<i>R172H</i>} akzeleriert die Entwicklung des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas.	66
Abbildung 4.18: Die Pankreastumore der <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{<i>G12D/+</i>} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{<i>R172H/+</i>} -Mäuse unterscheiden sich in Volumen und Größe nicht von den Pankreastumoren der <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{<i>G12D/+</i>} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{<i>R172H/+</i>} -Mäuse.	67
Abbildung 4.19: PanIN-Progression in <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{<i>G12D/+</i>} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{<i>R172H/+</i>} -Mäusen.	68
Abbildung 4.20: NF κ B/p65 ist im Nukleus der <i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{<i>G12D/+</i>} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{<i>R172H/+</i>} -Zellen lokalisiert.	69
Abbildung 4.21: NF κ B/p65-abhängige Expression Zellzyklus-regulierender Proteine wird durch verstärkte NF κ B/p65-Expression im Nukleus nicht beeinflusst.	70
Abbildung 4.22: GSEA - <i>Gene set enrichment analysis</i>	71
Abbildung 5.1: Modelle für das NF κ B/p65 - p53 Wechselspiel.	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Übersicht der Laborgeräte.....	18
Tabelle 2.2: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2.3: Übersicht der allgemeinen Reagenzien.....	20
Tabelle 2.4: Humane Karzinomzelllinien.....	22
Tabelle 2.5: Primäre Zellen aus murinen Pankreastumoren (PPT).....	23
Tabelle 2.6: Murine, stabil transfizierte PPT-Zellen.....	23
Tabelle 2.7: Übersicht der Medien und Reagenzien in der Zellkultur.....	23
Tabelle 2.8: Übersicht der Medien-Zusammensetzung.....	24
Tabelle 2.9: Übersicht der kommerziell erhältlichen Kits.....	24
Tabelle 2.10: Microarray Chip.....	24
Tabelle 2.11: Verwendete Puffer/Lösungen und ihre Zusammensetzung.....	24
Tabelle 2.12: Übersicht der Oligonukleotide.....	27
Tabelle 2.13: Übersicht der verwendeten Antikörper.....	28
Tabelle 2.14: Übersicht der Immunhistochemie-Reagenzien.....	29
Tabelle 3.1: Ansätze für Transfektionen von Zellen.....	31
Tabelle 3.2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.....	35
Tabelle 3.3: PCR-Bedingungen für ChIP.....	38
Tabelle 3.4: Reaktionsmix und Synthese-Bedingungen.....	40
Tabelle 3.5: Verdünnungen der cDNA.....	41
Tabelle 3.6: Nomenklatur der Mauslinien.....	44
Tabelle 3.7: PCR-Reaktionsansätze und ihre Bedingungen.....	45
Tabelle 3.8: Verwendete Antikörper und ihre Gebrauchsbedingungen.....	48
Tabelle 4.1: Metastasenrate in <i>Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i> - und <i>Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i> -Mäusen.....	67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm	DMSO	Dimethylsulfoxid
µl	Mikroliter	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
µm	Mikrometer	DSB	<i>double-strand breaks</i>
µM	Mikromolar	DTT	DL-Dithiothreitol
ABCD	<i>Avidin-Biotin-Complex-DNA</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ADM	Azinär-dukta Metaplasie	EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ALL	akute lymphatische Leukämie	ELAM-1	<i>endothelial-leukocyte adhesion molecule 1</i>
AML	akute myeloische Leukämie	EMR1	<i>EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat	ES	<i>enrichment score</i>
AR	<i>ankyrin repeats</i>	FasL	Fas Ligand
ATR	<i>ataxia telangiectasia mutated ATM- and Rad3-related</i>	FCS	<i>fetal calf serum</i>
BAFF	<i>B cell activating factor of the TNF family</i>	FDR	<i>false discovery rate</i>
BAX	<i>Bcl2-associated X protein</i>	FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
BCL	<i>B-cell lymphoma</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
bp	Basenpaare	GRR	glycinreiche Region
BSA	Bovines Serumalbumin	GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
°C	Grad Celsius	HAT	Histon-Acetyltransferasen
CBP	<i>cAMP-responsive element-binding protein-binding protein</i>	HCl	<i>hydrochloric acid</i>
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i>	HCT116	<i>human colon cancer cells</i>
CDKN	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>	HEK293	<i>Human Embryo Kidney 293 cells</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CD40L	CD40 Ligand	Hes1	<i>hairy and enhancer of split-1</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Chk	<i>checkpoint kinase</i>	HU	Hydroxyurea
ciAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis proteins</i>	IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
cm	Zentimeter	ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
CML	chronische myeloische Leukämie	IHC	Immunhistochemie
Ct	<i>cycle threshold</i>	IκBβ	NFκB-Inhibitor beta
CTD	<i>C-terminal regulatory domain</i>	IL	Interleukin
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>	IPMN	intra-dukta papillär-muzinöse Neoplasie
DBD	<i>DNA-binding domain</i>	KC	<i>keratinocyte-derived cytokine</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	KCl	Kalziumchlorid
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>		

kDa	Kilodalton	nm	Nanometer
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>	NOM	<i>nominal</i>
Kras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	NOXA	NADPH oxidase activator 1
LiCl	Lithiumchlorid	OD	<i>oligomerization domain</i>
LPS	Lipopolysaccharid	OD	optische Dichte
LSL	loxP-Stop-loxP	p53AIP1	<i>p53-regulated apoptosis-inducing protein1</i>
LTβ	Lymphotoxin-beta	PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
M	Molar	PARP	Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
MCN	muzinös zystische Neoplasie	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
MDMX	<i>mouse double minute x homolog</i>	PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>	PEI	Polyethylenimin
MEK1	<i>MAP2K1, Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1</i>	PEST	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin
mg	Milligramm	PFA	Paraformaldehyd
MgCl	Magnesiumchlorid	PIASy	<i>protein inhibitor of activated Stat y</i>
min	Minuten	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ml	Milliliter	PPT	primärer Pankreastumor
mM	Millimolar	PRR	<i>proline-rich domain</i>
MnSOD	<i>manganese superoxide dismutase</i>	PTM	posttranslationale Modifikation
mRNA	<i>messenger RNA</i>	PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Mut	mutiert	RE	<i>Response-Elemente</i>
NaAc	Natriumacetat	RHD	Rel-Homologie-Domäne
NaCl	Natriumchlorid	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
NADH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid	rpm	<i>revolutions per minute</i>
NADPH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid	RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>	RT	reverse Transkription
NES	<i>normalized enrichment score</i>	SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>	sec	Sekunden
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ng	Nanogramm	Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein</i>
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>	TAD	transaktivierende Domäne
NLS	<i>nuclear localization signal</i>	TAK	<i>TGFβ activated kinase</i>
		TAM	tumorassoziierte Makrophagen
		TD	Todesdomäne
		TEMED	Tetramethylethylendiamin

TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
<i>TRAF</i>	<i>TNF receptor-associated factor</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
V	Volt
w/v	<i>weight per volume</i>
wce	<i>whole cell extract</i>
WT	Wildtyp
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung

1 EINLEITUNG

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Jährlich sterben mehr als 250.000 Menschen weltweit am duktales Adenokarzinom (Feig *et al.*, 2012), der häufigsten Krebsart der Bauchspeicheldrüse (Pankreas). In den Vereinigten Staaten ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas die vierthäufigste krebssassoziierte Todesursache (Siegel *et al.*, 2015). Von 48.960 registrierten Neuerkrankungen pro Jahr werden schätzungsweise 40.560 Patienten am Pankreaskarzinom versterben, was einer Mortalitätsrate von etwa 83% entspricht (Siegel *et al.*, 2015). Erhöhte Risiken für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind neben der genetischen Prädisposition (7-10%) (Klein *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2012; Brune *et al.*, 2010), auch der starke Konsum von Zigaretten (Iodice *et al.*, 2008) sowie ein übermäßiger Alkoholgenuss (Lucenteforte *et al.*, 2012). Daneben stellen auch Fettleibigkeit (Adipositas) oder Vorerkrankungen des Pankreas wie z.B. Diabetes mellitus Typ II und chronische Pankreatitis Risikofaktoren dar (Michaud *et al.*, 2001; Everhardt & Wright, 1995; Chari *et al.*, 2005; Yeo & Lowenfels, 2012).

Trotz intensiver Forschungsarbeiten, die molekularen Grundlagen des Pankreaskarzinoms aufzuklären und effektive Therapien entwickeln zu können, sterben beinahe alle Patienten an dieser Krankheit, so dass die 5-Jahres-Überlebensrate immer noch bei maximal 7% liegt (Siegel *et al.*, 2015). Diese schlechte Prognose basiert primär auf einem bereits fortgeschrittenen Stadium des Pankreaskarzinoms zum Zeitpunkt der Diagnose (Klein, 2013). Obwohl Fortschritte in der neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie erzielt werden konnten, gilt dennoch die operative Resektion des Pankreas als einzige, potentielle Heilungschance. Jedoch ist dieser operative Eingriff nur für Patienten aufgezeigt, bei denen ein lokalisiertes, nicht-metastasiertes Pankreaskarzinom (etwa 10-20%) diagnostiziert wurde (Poruk & Weiss, 2015). Patienten, die sich einer Resektion unterziehen und anschließend eine adjuvante Chemotherapie erhalten, haben eine durchschnittliche Überlebenszeit von 12-22 Monaten und eine 5-Jahresüberlebensrate von 20-25% (Biankin *et al.*, 2012). Hierbei erfolgt gegenwärtig die Verabreichung der Chemotherapeutika Gemcitabin und Fluorouracil (5-FU) (Oettle, 2014).

In Studien konnte indes gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie FOLFIRINOX (eine Mehrfachkombination der Zytostatika Oxaliplatin, Irinotecan und Fluorouracil plus Leucovorin) gegenüber Gemcitabin die Überlebensdauer von Patienten mit einem metastasierten Pankreaskarzinom um etwa vier Monate verlängert (Conroy *et al.*, 2011). Allerdings wurde die bessere FOLFIRINOX-Wirksamkeit von einer signifikant erhöhten Toxizität begleitet (Conroy *et al.*, 2011). Aus einer aktuellen Phase-III-Studie geht zudem hervor, dass eine neue Therapieoption bestehend aus einer Kombination von nab-Paclitaxel und Gemcitabin für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom das mediane Gesamtüberleben, im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie, signifikant verlängert, wobei auch hier Nebenwirkungen wie Neuropathie und Myelosuppression zu beobachten waren (Von Hoff *et al.*, 2013). Um das Spektrum für Chemotherapeutika gegen das Pankreaskarzinom weiterhin verbessern und erweitern zu können, ist es dringend notwendig, die molekularen Mechanismen der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms zu verstehen und neue Zielstrukturen für Chemotherapeutika zu identifizieren.

1.2 Das Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Pathophysiologisch entwickelt sich das duktales Pankreaskarzinom zumeist aus nicht-invasiven Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs), wobei hier vermutlich eine azinär-duktales Metaplasie (ADM), ausgehend von den Azinuszellen des Pankreas, vorausgeht. ADMs repräsentieren somit das Anfangsstadium eines Pankreaskarzinoms (Shi *et al.*, 2013).

Neben den PanINs gelten intra-duktales papillär-muzinöse Neoplasien (IPMNs) und muzinös zystische Neoplasien (MCNs) als Vorstufen der Pankreaskarzinomentwicklung (Vincent *et al.*, 2011). Während PanINs zu den am häufigsten vorkommenden neoplastischen Läsionen zählen (Hruban *et al.*, 2000), sind IPMNs und MCNs weniger präsent (Laffan *et al.*, 2008; de Jong *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2012).

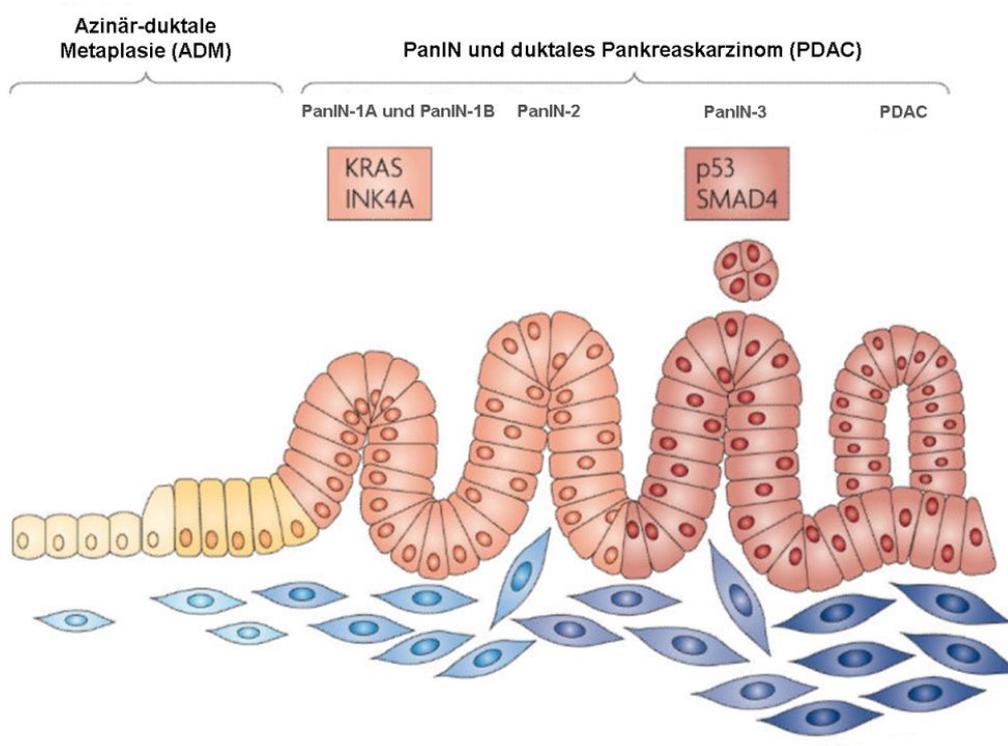


Abbildung 1.1: Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

Entwicklung eines duktales Pankreaskarzinoms (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*; von links nach rechts) über präneoplastische Vorläuferstufen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien, PanINs) (modifiziert nach Morris *et al.*, 2010). Morphologische Veränderungen korrelieren mit der Aktivierung von onkogenem KRAS und/oder Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *p53* (Hruban *et al.*, 2000).

PanINs sind nicht-invasive, epitheliale Neoplasien, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausprägung an zytologischen und architektonischen Veränderungen in drei Kategorien unterteilen lassen (Abbildung 1.1; Hruban *et al.*, 2007; Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2006). Das frühe Stadium der PanIN-Progression, PanIN-1, ist charakterisiert durch flache (PanIN-1A) oder papilläre (PanIN-1B) Epithelläsionen mit basal orientierten runden Nuclei und supranukleär gelegenen Muzin. Die nächsthöhere Graduierung, die sogenannten PanIN-2, bilden papilläre, muzinöse Epithelläsionen aus, die Kernatypien wie Polaritätsverlust und vergrößerte Nuclei aufweisen (Hruban *et al.*, 2001; Hruban *et al.*, 2007). PanIN-3 stellen den höchsten Grad der Vorläufer des

Pankreaskarzinoms dar und sind daher vorwiegend in Pankreata mit invasivem Pankreaskarzinom zu finden (Kanda *et al.*, 2012). Neben schweren Zellatypien wie dem Verlust der Zellpolarität und dem Abschnüren kleiner Gruppen epithelialer Zellen in das Lumen, sind auch atypische oder gehäufte Mitosen und Kernunregelmäßigkeiten Kennzeichen der PanIN-3-Läsionen (Hruban *et al.*, 2001; Hruban *et al.*, 2007).

Die Entstehung von Karzinomen ist neben umweltbedingten Einflüssen auch eng mit der Anhäufung genetischer Veränderungen im Erbgut assoziiert. Bei über 90% der Pankreaskarzinome finden sich Mutationen im *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) Onkogen (Biankin *et al.*, 2012). Mutationen in *KRAS* sind bereits im PanIN-1-Stadium präsent, wobei ihre Häufigkeit mit der Zunahme der PanIN-Grade korreliert (Kanda *et al.*, 2012).

Im weiteren Verlauf der Tumorprogression im Pankreas kommt es zusätzlich zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* (in PanIN-2), *TP53* (im weiteren Verlauf als *p53* bezeichnet), *SMAD4/DPC4* und *BRCA2* (in PanIN-3) (Hruban *et al.*, 2000; Wilentz *et al.*, 2000).

1.3 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms

Für die Analyse der Pankreastumorgenese wurden genetisch veränderte Mausmodelle entwickelt, in denen sich prämaligne PanINs und metastasierende duktales Pankreaskarzinome histopathologisch nicht von humanen PanINs bzw. Pankreaskarzinomen unterscheiden (Hingorani *et al.*, 2003). In diese Mäuse wurde mittels homologer Rekombination (*Knock-in*) onkogenes *Kras*, welches analog zur humanen Situation eine Mutation in Kodon 12 des ersten kodierenden Exons trägt, eingebracht. Diese Mutation führt im Protein zu einem Austausch von Glycin (G) zu Asparaginsäure (D) (*G12D*) und bewirkt eine konstitutive Aktivierung der Ras-Signalwege (Hingorani *et al.*, 2003). Um eine kontrollierte, gewebespezifische Expression des mutierten Allels zu erzielen, wird dem modifizierten Exon ein loxP-Stop-loxP (LSL)-Element vorgeschaltet. Die pankreasspezifische Expression von *Kras^{G12D}* resultiert aus Verkreuzungen von *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit Mauslinien, die eine Cre-Rekombinase unter den pankreasspezifischen Promotoren von *Ptf1a* (*knock-in*) oder *Pdx1* (transgen) exprimieren. In den Nachkommen deletiert die Cre-Rekombinase das loxP-flankierte Stop-Element und aktiviert infolgedessen *Kras^{G12D}*.

Histologisch sind präkanzeröse PanIN-Läsionen bereits nach zwei Wochen zu identifizieren. Nach acht Monaten können neben der Induktion des vollen Spektrums pankreatischer intraepithelialer Neoplasien (PanIN-1 bis PanIN-3) erste invasive Pankreaskarzinome beobachtet werden (Hingorani *et al.*, 2003).

Durch Verkreuzung von *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit *LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen wird die Tumorgenese des Pankreaskarzinoms beschleunigt (Hingorani *et al.*, 2005). Analog zu *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen wird in diesen Mäusen nach Deletion des Stop-Elements ein p53-Protein mit einer *missense*-Mutation in Kodon 172 (Arginin zu Histidin; *R172H*) exprimiert (Hingorani *et al.*, 2005). Diese Mutation entspricht der humanen *p53^{R175H}*-Mutation, welche häufig in Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom auftritt (Olive *et al.*, 2004). In *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen

lässt sich bereits im Alter von zehn Wochen das volle Spektrum pankreatischer intraepithelialer Neoplasien nachweisen (Hingorani *et al.*, 2005; Esposito *et al.*, 2012).

1.4 Der Transkriptionsfaktor NFκB

1.4.1 Funktion und Struktur

Der Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) wurde erstmals 1986 als ein im Zellkern reifer B-Lymphozyten vorkommender Faktor beschrieben, der mit einer spezifischen DNA-Sequenz im Promotor der κ-Kette der Immunglobuline interagiert (Sen & Baltimore, 1986). Mittlerweile ist bekannt, dass NFκB ubiquitär exprimiert wird und mehr als 500 Zielgene reguliert, die an der Steuerung vieler biologischer Prozesse wie Inflammation, Zelltransformation, Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung beteiligt sind (Gupta *et al.*, 2010).

NFκB reguliert die Entwicklung und Steuerung des Immunsystems (Ghosh *et al.*, 1998; Li & Verma, 2002; Bonizzi & Karin, 2004). Darüber hinaus ist NFκB auch an der Regulation vieler Gene, die das Überleben von Zellen sichern sowie die Differenzierung und Proliferation von Zellen steuern, beteiligt (Hayden & Ghosh, 2012). Zu diesen Zielgenen zählen Regulatoren der Apoptose (antiapoptotische BCL2-Familienmitglieder und Inhibitoren Apoptose-induzierender Proteine (IAPs)) und der Proliferation (Cycline und Wachstumsfaktoren) (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Aufgrund seiner mannigfaltigen regulatorischen Funktionen kann darauf geschlossen werden, dass ein deregulierter NFκB-Signalweg mit zahlreichen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes und Arthritis in Zusammenhang steht (Courtois & Gilmore, 2006; Hayden & Ghosh, 2012).

Die Familie des Transkriptionsfaktors NFκB besteht in Säugern aus fünf Mitgliedern: RelA/p65, RelB, cRel, p105/p50 und p100/p52 (im Folgenden p50 und p52 genannt; Abbildung 1.2), die durch die Gene *RELA*, *RELB*, *REL*, *NF-κB1* und *NF-κB2* kodiert werden (Ghosh *et al.*, 1998; Miyamoto & Verma, 1995; Siebenlist *et al.*, 1994).

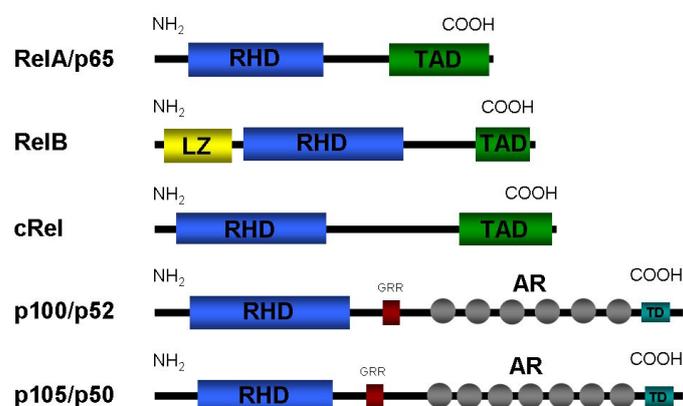


Abbildung 1.2: Die Mitglieder der NFκB-Familie.

Schematische Darstellung der fünf Mitglieder des Transkriptionsfaktors NFκB: RelA/p65, RelB, cRel, p100/p52 und p105/p50. RHD = Rel-Homologie-Domäne, TAD = transaktivierende Domäne, LZ = Leucin-Zipper, GRR = glycinreiche Regionen, AR = *ankyrin repeats*, TD = Todesdomäne, NH₂ = Amino-terminal, COOH = Carboxy-terminal (modifiziert nach Hayden & Ghosh, 2012).

Die Fähigkeit, diverse Homo- und Heterodimere untereinander auszubilden, ermöglicht diesen fünf Untereinheiten, ein weitläufiges Spektrum an Zielgenen zu regulieren. Hierfür binden die NFκB-Dimere an spezifische DNA-Sequenzen (Chen *et al.*, 1998). Für die Dimerisierung und DNA-Bindung ist eine etwa 300 Aminosäuren lange, N-terminal gelegene Rel-Homologie-Domäne (RHD) verantwortlich, die in allen NFκB-Proteinen vorhanden ist. Die C-terminale transaktivierende Domäne (TAD) hingegen, existiert nur in den sogenannten Rel-Proteinen (RelA/p65, RelB und cRel) und aktiviert die Transkription. Obwohl den Untereinheiten p50 und p52 TADs fehlen, können sie durch Heterodimerisierung mit TAD-besitzenden NFκB-Proteinen ebenfalls die Transkription steuern (Hayden & Ghosh, 2008). Trotz der vielfältigen Dimerisierungsvarianten der NFκB-Untereinheiten (Hayden & Ghosh, 2004) gilt das Heterodimer aus p50 und RelA/p65 aufgrund seines gehäuft Vorkommens als klassisches NFκB (Rothwarf & Karin, 1999).

1.4.2 Aktivierung und Regulation von NFκB

Die Aktivierung von NFκB erfolgt über drei verschiedene Signalwege. Hierbei wird zwischen dem klassischen (kanonischen), dem alternativen (nicht-kanonischen) und dem atypischen Signalweg unterschieden (Hayden & Ghosh, 2004; Yamamoto & Gaynor, 2004; Viatour *et al.*, 2005; Abbildung 1.3).

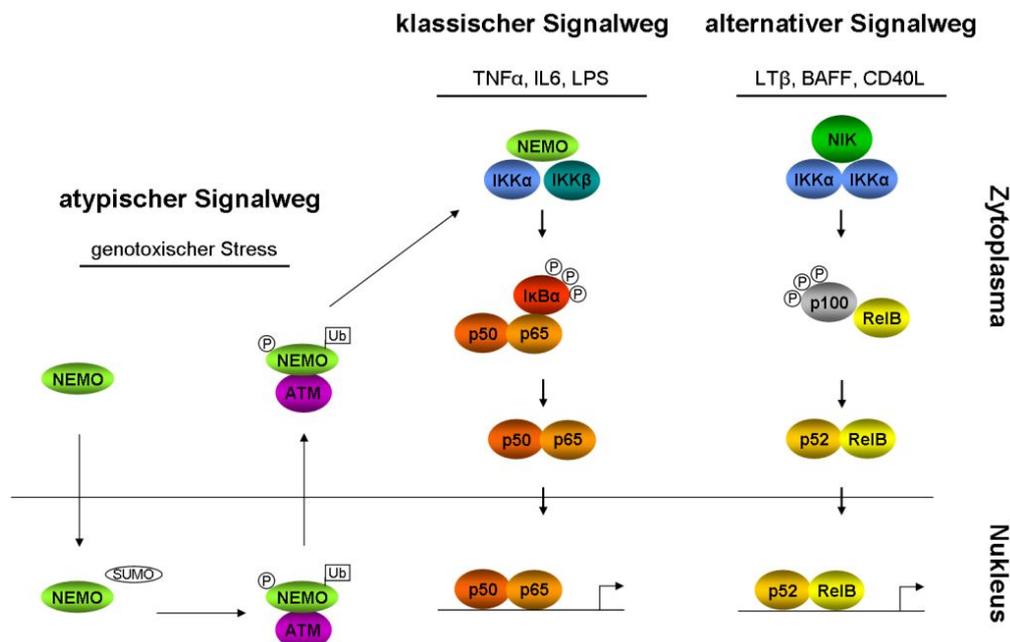


Abbildung 1.3: Der atypische, der klassische (kanonische) und der alternative (nicht-kanonische) NFκB-Signalweg. Schematische Darstellung des atypischen, klassischen und alternativen NFκB-Signalweges (modifiziert nach Hamacher *et al.*, 2008 und Hoesel & Schmid, 2013).

Klassischer NFκB-Signalweg. Im Zytoplasma unstimulierter Zellen wird das NFκB-Heterodimer p50/p65 zunächst von inhibitorischen Proteinen, den IκB (*inhibitor of kappa B*)-Proteinen gebunden und dadurch inaktiviert (Sun & Ley, 2008). Diese maskieren die Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS) von NFκB und verhindern auf diese Weise den Transport in den Zellkern (Magnani *et al.*, 2000). Über extrazelluläre, proinflammatorische Stimuli wie Tumornekrosefaktor-α

(TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Lipopolysaccharid (LPS) wird der klassische NF κ B-Signalweg aktiviert. Die Stimulus-induzierte Degradation der I κ B-Proteine (I κ B α und I κ B β) wird durch den I κ B-Kinase- (IKK-) Komplex, welcher sich aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β (auch als IKK1 und IKK2 bekannt) und aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch als NEMO (*NF κ B essential modulator*) bezeichnet) zusammensetzt, vermittelt (Li *et al.*, 1999a; Li *et al.*, 1999b). Dabei werden die I κ B-Proteine phosphoryliert, von der E3-Ubiquitin-Ligase SCF^{TRCP} erkannt, polyubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (Winston *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001; Fong & Sun, 2002; Liang *et al.*, 2006). Die nicht mehr inhibierten NF κ B-Dimere gelangen nun über ihre frei liegenden NLS in den Zellkern und binden dort an spezifische κ B-Bindestellen in Promotoren regulierter Gene (5'-GGGRNWYYCC-3' (N = beliebige Base, R = Purin, W = Adenin oder Thymin, Y = Pyrimidin) (Ghosh *et al.*, 1995; Miyamoto & Verma, 1995). Die signalvermittelte Transkription NF κ B-abhängiger Zielgene wird initiiert.

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) wie Ubiquitinierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen von NF κ B können die Transkription NF κ B-abhängiger Gene feinregulieren (Wietek & O'Neill, 2007; Viatour *et al.*, 2005). Insbesondere die Spezifität des NF κ B/p65-Proteins kann durch unterschiedliche Phosphorylierungen an den Positionen S276, S311, S468, S526 oder S536 verändert werden (Buss *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2004; O'Shea & Perkins, 2010). NF κ B/p65-Phosphorylierungen sind stimuliabhängig oder zelltypspezifisch und verändern Interaktionen mit Kofaktoren (Hoberg *et al.*, 2006), mit Korepressoren (Dong *et al.*, 2008) oder mit basalen Transkriptionsmaschinerien (Nowak *et al.*, 2008).

Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges reguliert die Inflammation, das Überleben von Zellen sowie das angeborene Immunsystem (Nishikori, 2005).

Alternativer NF κ B-Signalweg. Der alternative Signalweg wird durch externe Stimuli wie Lymphotoxin- β (LT β), B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF) oder CD40 Ligand (CD40L) induziert (Dejardin *et al.*, 2002; Claudio *et al.*, 2002; Kayagaki *et al.*, 2002; Coope *et al.*, 2002), wodurch das RelB/p52 Heterodimer aktiviert wird (Perkins, 2007; Sun, 2011). Die Aktivierung des Heterodimers über diesen Signalweg erfordert zunächst die Stabilisierung und Aktivierung von NIK (*NF κ B-inducing kinase*, auch als MAP3K14 bezeichnet), einer Serin/Threoninkinase, welche in Abwesenheit eines Stimulus kontinuierlich über das Proteasom abgebaut wird. NIK assoziiert dabei mit TRAF3 und TRAF2 (TRAFs, *TNF receptor-associated factors*), wodurch die Ubiquitinligasen cIAP1 und cIAP2 (cIAPs, *cellular inhibitor of apoptosis proteins*) rekrutiert werden und NIK polyubiquitiniert. Nach erfolgter Stabilisierung phosphoryliert NIK IKK α (Storz, 2013). Der dadurch entstehende Komplex aus NIK und aktiviertem IKK α vermittelt die Phosphorylierung von NF κ B2/p100. Darüber hinaus induziert NIK die Bindung der E3-Ubiquitin-Ligase SCF^{TRCP} an p100, wodurch p100 in die NF κ B-Untereinheit p52 prozessiert wird (Sun, 2011; Storz, 2013). Da p100 nicht nur als p52-Vorstufe fungiert, sondern auch die Fähigkeit eines I κ B-ähnlichen Moleküls aufweist und RelB inhibiert, kann so gebildetes p52 nun mit RelB dimerisieren und in den Zellkern translozieren (Storz, 2013, Derudder *et al.*, 2003).

Der alternative NF κ B Signalweg ist überwiegend in B-Zellen aktiv (Janssens & Tschopp, 2006) und reguliert die Entwicklung von Lymphorganen und das adaptive Immunsystem (Nishikori, 2005).

Atypischer NF κ B-Signalweg. Neben der klassischen und alternativen Aktivierung kann NF κ B auch durch genotoxische Substanzen, die Schäden in der nukleären DNA verursachen, oder oxidativen

Stress induziert werden (Miyamoto, 2011; Janssens & Tschopp, 2006). Hierbei erfolgt die NFκB-Aktivierung über eine Signaltransduktion, die im Nukleus initiiert wird (Miyamoto, 2011).

Zu den Arten von DNA-Schäden zählen u.a. DNA-Doppelstrangbrüche (*double-strand breaks*; DSB), die durch atypische Induktoren wie die Topoisomerase II-Inhibitoren Doxorubicin oder Etoposid verursacht werden (Zimmermann *et al.*, 2012; Wu & Miyamoto, 2008). Die Aktivierung von NFκB durch DSB involviert neben ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), eine Reihe sequentieller PTMs von NEMO (Miyamoto, 2011) und führt über den kanonischen IKK-Komplex im Zytoplasma zur NFκB-Aktivierung (Abbildung 1.3; Miyamoto, 2011; McCool & Miyamoto, 2012).

Infolge eines genotoxischen Stresses akkumuliert sumoyliertes, IKK-ungebundenes NEMO im Nukleus. Der ATM-unabhängigen NEMO-Sumoylierung durch die SUMO E3-Ligase PIASy (*protein inhibitor of activated Stat y*) folgt eine ATM-abhängige Phosphorylierung von NEMO (Mabb *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2003). Diese ist notwendig, um NFκB aktivieren zu können (Huang *et al.*, 2003). Die anschließende Monoubiquitinierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis-1*) ermöglicht nun den nukleären Export des NEMO/ATM-Komplexes (McCool & Miyamoto, 2012; Huang *et al.*, 2003). Im Zytoplasma erfolgt dann die Aktivierung des IKK-Komplexes ATM-abhängig über TAK1 (*TGFβ activated kinase 1*), einer der katalytischen IKKβ-Untereinheit vorgeschalteten Kinase (Miyamoto, 2011).

Neben DSB-induzierenden Agenzien können auch Replikationsarrest-induzierende Substanzen wie Hydroxyurea den atypischen NFκB-Signalweg aktivieren. Für die NFκB-Aktivierung ist auch hier die ATM-abhängige Phosphorylierung von NEMO erforderlich. Jedoch wird durch Replikationsstress nicht nur ATM, sondern auch ATR (*ATM- and Rad3-related*) aktiviert. ATR assoziiert wie ATM mit NEMO, bewirkt jedoch nicht dessen Phosphorylierung. Folglich kann ATR die durch Replikationsstress hervorgerufene NFκB-Aktivierung unterdrücken (Wu & Miyamoto, 2008).

In HEK293-Zellen (*Human Embryo Kidney 293 cells*) induzieren sowohl Replikationsstress als auch DSB-Verursacher NFκB über einen konservierten Signaltransduktionsweg, jedoch mit divergenten Auswirkungen. Während die durch DSB-induzierende Agenzien hervorgerufene NFκB-Aktivierung die antiapoptotische Genexpression und somit das Überleben von Zellen begünstigt, fördert die durch Replikationsstress hervorgerufene NFκB-Aktivierung den Zelltod (Wu & Miyamoto, 2008).

1.5 Inhibitoren von NFκB: Die IκB-Proteine

1.5.1 Funktion und Struktur

IκB-Proteine haben infolge ihrer direkten Interaktion mit NFκB-Dimeren im Zytoplasma eine essentielle Funktion in der NFκB-Aktivierung. Alle IκB-Proteine besitzen fünf bis sieben Ankyrinwiederholungen (*ankyrin repeats*, AR) (Abbildung 1.4), Proteindomänen über welche die Interaktion mit der RHD der NFκB-Proteine erfolgt (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Die Familie der IκB-Proteine besteht aus neun Mitgliedern, die in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 1.4; Hinz *et al.*, 2012). IκBα, IκBβ und IκBε repräsentieren die Gruppe der typischen IκBs. Sie werden stimulusabhängig phosphoryliert, degradiert und resynthetisiert (Hinz *et al.*, 2012). Während IκBα und IκBβ in allen Gewebearten exprimiert werden, ist die Expression von IκBε auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Hayden & Ghosh, 2012). Die Gruppe der atypischen IκBs

besteht aus BCL-3, I κ B ζ /MAIL, I κ BNS und I κ B η (Hinz *et al.*, 2012) und ist vermutlich vorwiegend auf transkriptioneller Ebene aktiv (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Während BCL-3 als transkriptioneller Kofaktor agiert, vermitteln I κ B ζ /MAIL, I κ BNS und I κ B η die NF κ B-abhängige Regulation von spezifischen Zielgenen (Hinz *et al.*, 2012). Da auch die Vorläuferproteine p105 und p100 des alternativen NF κ B-Signalweges aufgrund ihrer Ankyrinwiederholungen (Abbildung 1.2) I κ B-ähnliche Funktionen besitzen, bilden sie die dritte Gruppe der I κ B-Proteine, die sogenannten Vorläufer-I κ Bs (Hinz *et al.*, 2012).

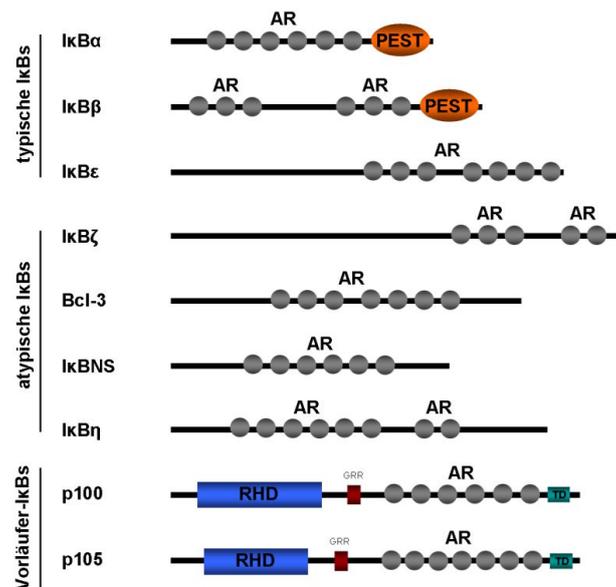


Abbildung 1.4: Die Familie der I κ B-Proteine.

Schematische Darstellung der I κ B-Proteine: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , Bcl-3, I κ BNS, I κ B η , p100 und p105. AR = *ankyrin repeats*, PEST = PEST (Prolin-Glutamat-Serin-Threonin)-Domäne, RHD = Rel-Homologie-Domäne, GRR = glycinreiche Region, TD = Todesdomäne (modifiziert nach Hayden & Ghosh, 2012).

1.5.2 Die typischen I κ B-Proteine

Die typischen I κ B-Proteine, I κ B α und I κ B β , sind die Inhibitoren des NF κ B-Heterodimers p50/p65 im klassischen NF κ B-Signalweg (siehe 1.4.2).

I κ B α . I κ B α ist das am häufigsten untersuchte I κ B-Protein und stellt daher den Prototypen der I κ B-Familie dar (Hayden & Ghosh, 2012). In unstimulierten Zellen führt die Interaktion von I κ B α mit dem klassischen NF κ B-Heterodimer p50/p65 zu einer Maskierung der NLS von RelA/p65, die NLS von p50 bleibt ungebunden (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Die freiliegende NLS von p50 ermöglicht, zusammen mit der Kernexportsequenz (*nuclear export signal*, NES) von I κ B α , ein beständiges Pendeln des I κ B α /NF κ B-Komplexes zwischen Zellkern und Zytoplasma (*Kern-Zytoplasma-shuttling*) (Ghosh & Karin, 2002). Nach der Stimulus-induzierten Aktivierung von NF κ B wird dieses dynamische Gleichgewicht durch die Degradation von I κ B α und dem damit einhergehenden Verlust der NES verschoben. Die zuvor durch I κ B α maskierte NLS von RelA/p65 wird freigelegt (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Aktiviertes nukleäres NF κ B führt durch Bindung an drei κ B-Bindungsstellen im I κ B α -Promotor zur Resynthese von I κ B α (Ito *et al.*, 1994; Hertlein *et al.*, 2005), welches auch ungebunden konstitutiv in den Zellkern transloziert werden kann. Dieser Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden (Hinz *et al.*, 2012). Im Zellkern bindet und entfernt I κ B α an DNA gebundene NF κ B-Dimere und inhibiert infolgedessen die Transkription (Hinz *et al.*, 2012). Die daraus

resultierende autoregulatorische negative Rückkopplung limitiert die NFκB-Aktivität (Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Versuche, die Wirkungsweise von IκBα *in vivo* detaillierter zu analysieren, sind schwierig umzusetzen, da der generelle *knockout* von IκBα im Mausmodell letal wirkt und die Tiere sieben bis zehn Tage nach der Geburt sterben. Hierbei resultiert die Deletion von IκBα in einer schweren Form der Dermatitis, die durch eine starke Expression von inflammatorischen Zytokinen wie TNFα begleitet wird (Klement *et al.*, 1996). Der Verlust einer IκB-Form scheint jedoch durch ein anderes Familienmitglied der IκB-Proteine funktionell ersetzbar zu sein. Das Einbringen der IκBβ-kodierenden Region in den IκBα-Locus einer Maus (*Knockin*) beispielsweise resultiert in einer mit Wildtypmäusen vergleichbaren Viabilität (Cheng *et al.*, 1998).

IκBβ. IκBβ gehört wie IκBα zur Gruppe der typischen IκB-Proteine. Obwohl IκBβ dem IκBα strukturell und funktionell sehr ähnlich ist, konnten für IκBβ spezifische Funktionen gezeigt werden (Hinz *et al.*, 2012).

In unstimulierten Zellen agiert IκBβ wie IκBα als negativer NFκB-Regulator, indem es im Zytoplasma NFκB-Dimere bindet und inhibiert (siehe 1.4.2), wobei IκBβ aufgrund einer höheren Affinität die NLS beider NFκB-Untereinheiten (p50 und p65) maskiert (Malek *et al.*, 2001). Die Degradation von IκBβ ist ebenfalls stimulus- und zelltypabhängig und verläuft nicht wie bei IκBα zügig, sondern eher persistierend, was eine konstitutive NFκB-Aktivität zur Folge hat (Hertlein *et al.*, 2005). Trotz κB-Konsensussequenz im Promotor des *NFKB1B*-Gens ist die Resynthese von IκBβ nicht NFκB-abhängig (Hertlein *et al.*, 2005).

Auf transkriptioneller Ebene hingegen stellt IκBβ im Gegensatz zu IκBα einen Zielgen-spezifischen Koaktivator für NFκB dar. Neusynthetisiertes IκBβ akkumuliert als hypophosphorylierte Form im Nukleus und bildet zusammen mit NFκB-Dimeren (z.B. NFκB/p65-Homodimeren) stabile ternäre Komplexe, die an die DNA binden. Diese Komplexe sind gegenüber der IκBα-vermittelten Transkriptionshemmung resistent und ermöglichen dadurch eine verlängerte Genexpression (Hinz *et al.*, 2012). Während eines LPS-induzierten septischen Schocks im Mausmodell wird ein IκBβ/p65/cRel-Komplex an NFκB-abhängige Promotoren rekrutiert, um die Expression von LPS-induzierten Genen wie TNFα und IL-1β zu regulieren. Der Verlust von IκBβ vermindert deren Expression und führt zu einem LPS-resistenten Phänotyp (Scheibel *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu IκBα besitzt IκBβ weder eine NLS noch eine NES, was dafür spricht, dass IκBβ weder den nukleären Import noch den nukleären Export selbst regulieren kann. Die zelluläre Lokalisation des latenten NFκB/IκBβ-Komplexes wird zum einen durch die Interaktion mit zytosolischem κB-Ras und zum anderen über die NLS und NES von NFκB/p65 gesteuert (Valovka & Hottiger, 2011). Zudem wird auch die Stabilität von IκBβ in den meisten Zelltypen durch NFκB/p65 reguliert. So konnte gezeigt werden, dass durch die direkte Interaktion von IκBβ und NFκB/p65 der proteasomale Abbau von IκBβ verhindert und dadurch die IκBβ-Expression aufrechterhalten wird (Hertlein *et al.*, 2005).

1.6 Die Rolle von NFκB in Tumoren

Unkontrollierte Proliferation sowie Defekte in der Apoptose zählen unter anderem zu den charakteristischen Merkmalen der Krebsentstehung, den sogenannten *hallmarks of cancer* (Hanahan & Weinberg, 2011). Da unter normalen Bedingungen diese Prozesse durch NFκB gesteuert werden, ist es verständlich, dass dereguliertes NFκB einen wesentlichen Beitrag zur Initiation und Progression von Krebs liefert (Mantovani *et al.*, 2008; Aggarwal, 2004; Hayden & Ghosh, 2008; Sethi *et al.*, 2008; Shen & Tergaonkar, 2009). Diese Deregulation spiegelt sich zumeist in einer konstitutiven NFκB-Aktivierung wider, wodurch eine permanent verstärkte Expression von NFκB-Zielgenen induziert wird (Yamamoto & Gaynor, 2004).

Konstitutiv aktiviertes NFκB ist in den meisten Zellen hämatopoetischer und solider Tumoren detektierbar. Daneben konnte konstitutiv aktiviertes NFκB auch in Tumorgeweben aus Patienten identifiziert werden, die an einem multiplen Myelom, an einer akuten myeloischen Leukämie (AML), einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL), einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) und an Prostata- und Brustkrebs erkrankten (Aggarwal, 2004). Die konstitutive NFκB-Aktivität resultiert in einer Hemmung der Apoptose, in einer verstärkten Zellproliferation oder in einem erhöhten Metastasierungspotential (Greten & Karin, 2004). Dabei wirken die durch NFκB induzierten Faktoren wie cIAP, XIAP, c-FLIP und BCL-X_L antiapoptotisch (Abbildung 1.5; Aggarwal, 2004). Die konstitutive Aktivierung von NFκB ist demzufolge einer der Schlüsselmechanismen für auftretende Resistenzen gegen Chemotherapien (Li *et al.*, 2010).

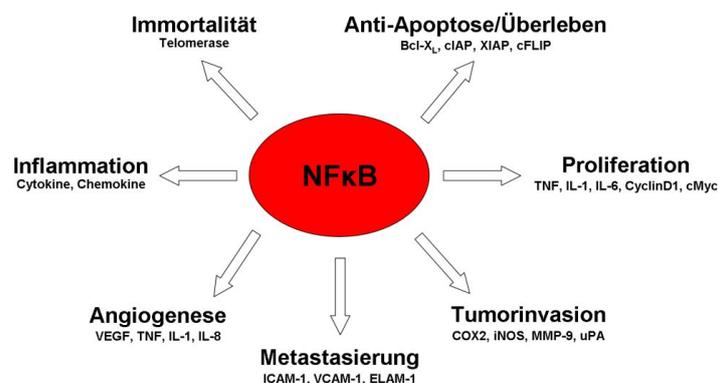


Abbildung 1.5: Durch den Transkriptionsfaktor NFκB regulierte onkogene Zielgene.

Schematische Darstellung zahlreicher NFκB-Zielgene, die in Prozessen wie Immortalität, Inflammation, Angiogenese, Metastasierung, Tumorinvasion, Proliferation und Anti-Apoptose/Überleben involviert sind (modifiziert nach Aggarwal, 2004).

Die transkriptionelle Aktivierung von Zellzyklusgenen wie *Cyclin D1* hingegen verstärkt die Zellzyklusprogression (Karin, 2006). Während die NFκB-abhängige Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 die Zellproliferation und die Tumorprogression fördert (Hutti *et al.*, 2012; Karin, 2006), steuert die durch NFκB induzierte Synthese diverser Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 die NFκB-abhängige Metastasierung (Abbildung 1.5; Aggarwal, 2004).

1.6.1 NFκB im Pankreaskarzinom

Aktivierende Mutationen des *KRAS*-Onkogens treten in humanen Pankreaskarzinomen mit Abstand am häufigsten auf. Diese Mutationen resultieren in einer verstärkten NFκB-Aktivität, wodurch als Folge eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNFα beobachtet werden kann, was sich wiederum fördernd auf die Tumorprogression auswirkt (Maniati *et al.*, 2011). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB erfolgt sowohl über den klassischen als auch über den alternativen Signalweg und ist mit Proliferation, antiapoptotischem *Signaling*, Metastasierung und Chemotherapieresistenz assoziiert (Storz, 2013; Arlt *et al.*, 2001).

Ende der Neunziger konnte bereits gezeigt werden, dass in ~70% der Pankreaskarzinome eine konstitutive Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges vorliegt (Wang *et al.*, 1999). Hierbei war in mehr als der Hälfte der Pankreaskarzinome insbesondere die Überexpression der NFκB-Untereinheit RelA/p65 detektierbar. Diese verstärkte RelA/p65-Expression korrelierte zudem mit einem erhöhten Expressionslevel NFκB-abhängiger, antiapoptotischer Zielgene (Weichert *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde aktiviertes NFκB auch in einer Vielzahl von Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet (Weichert *et al.*, 2007). Untersuchungen zur konstitutiven NFκB-Aktivierung in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und BxPC-3 ergaben, dass sowohl zytosolische (IκBα, p50, p52, p65) als auch nukleäre Komponenten (p50, p52, p65, cRel) des NFκB-Signalweges signifikant erhöht vorlagen (Chandler *et al.*, 2004).

Darüber hinaus lässt sich im Pankreaskarzinom auch eine verstärkte Aktivierung der alternativen NFκB-Signalkaskade beobachten. Erhöhte Expressionslevel von aktiviertem NIK bewirken eine verstärkte IKKα- und p52/RelB-Aktivität und führen zu Proliferation und Tumorwachstum. Pankreaskarzinomzelllinien mit einer verstärkten NIK-Expression zeigten zudem auch einen extremen Expressionsanstieg NFκB2-abhängiger Zielgene wie *CCL19*, *CCL21*, *CXCL12*, *CXCL13* und *BAFF*, was ebenfalls dafür spricht, dass auch die Aktivierung des NIK/NFκB2-Signalweges zum schnellen und aggressiven Wachstum dieser Krebsart beiträgt (Storz, 2013).

1.6.2 NFκB im murinen Pankreaskarzinom

Um weitere Erkenntnisse zur *Kras*^{G12D}-induzierten NFκB-Aktivität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu gewinnen, werden murine Tiermodelle verwendet. Hierbei konnte bereits mit Hilfe einer pankreasspezifischen Deletion für *Ikk2/β* in einem *Kras*^{G12D}-abhängigen Mausmodell gezeigt werden, dass *Ikk2/β* während der Tumorgenese mit dem basalen Notch-Signaltransduktionsweg kooperiert. Nach TNFα-Stimulation vermittelt *Ikk2/β* die Phosphorylierung des Histons H3 an den *Hes1* (*hairy and enhancer of split-1*)-Promotor, wodurch die Transkription Notch-abhängiger Zielgene begünstigt und die Expression entzündungshemmender Proteine supprimiert wird. Diese Daten legen einen neuartigen Wechselwirkungsmechanismus zwischen dem klassischen NFκB- und dem Notch-Signalweg dar, der die Progression eines Pankreaskarzinoms fördert (Maniati *et al.*, 2011). Darüber hinaus resultierte die Inaktivierung von *Ikk2/β*, neben einer verstärkten NFκB-Aktivität, in einer erhöhten Expression von IL-1α (Interleukin-1α). IL-1α wird über *Kras*^{G12D}-aktiviertes AP-1 (*activator protein 1*) induziert und aktiviert wiederum NFκB und seine Zielgene IL-1α und p62. Infolgedessen

bilden sich sogenannte *feedforward loops*, wodurch die tumorfördernde NFκB-Aktivität über IL-1α und p62 induziert und aufrechterhalten wird (Ling *et al.*, 2012).

Neben der katalytischen NFκB-Untereinheit Ikk2/β hat auch die regulatorische NFκB-Untereinheit NEMO/Ikky Einfluss auf die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Maier *et al.*, 2013). Mit Hilfe eines konditionellen *Knockouts* wurde die Bedeutung von NEMO/Ikky in einem Kras^{G12D}-abhängigen Mausmodell (*Pdx1-Cre;Kras^{G12D};NEMO^{ΔPanc}*) untersucht. Pathologisch bewirkte das Fehlen der NEMO/Ikky-Untereinheit eine drastische Reduktion der Anzahl von PanIN-Läsionen. Ursache dafür war zum einen die verminderte Expression relevanter Inflammations-assoziiierter Moleküle wie beispielsweise TNFα, IL-1α und IL-1β und zum anderen die Herunterregulation der in PanIN aktivierten Signalwege wie die der Kras-induzierten MAP-Kinase, Notch oder KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) (Maier *et al.*, 2013).

1.7 Der Tumorsuppressor p53

1.7.1 Funktion und Struktur

Der Tumorsuppressor p53 ist wie NFκB ein Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung u.a. die Regulation des Zellzyklus, die Reparatur geschädigter DNA sowie die Induktion der Apoptose reguliert (Levine, 1997). Aufgrund seiner Beteiligung an der Regulierung der Apoptose und der DNA-Reparatur wurde p53 auch als *Wächter des Genoms* bezeichnet (Lane, 1992). Infolge einer p53-Aktivierung können geschädigte Zellen vollständig eliminiert oder auch in einen permanent inaktiven Status versetzt werden (Seneszenz) (Vousden & Prives, 2009).

Die durch p53 kontrollierten Prozesse werden durch die Expression entsprechender Zielgene gesteuert (Vousden & Prives, 2009). Während z.B. die durch p53 transaktivierten Gene *BAX* (*Bcl2-associated X protein*) und *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) proapoptotisch wirken, leitet die p53-abhängige Transkription des *CDKN1A*-Gens (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A - p21*) einen Zellzyklusarrest ein (Vousden & Prives, 2009).

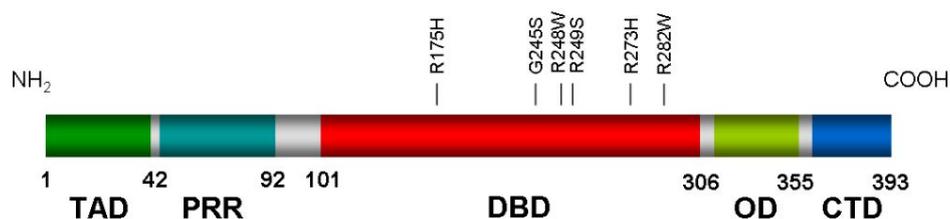


Abbildung 1.6: Der Tumorsuppressor p53.

Schematische Darstellung des p53-Proteins und mögliche Mutationen. TAD = transaktivierende Domäne, PRR = prolinreiche Region, DBD = DNA-bindende Domäne, OD = Tetramerisierungsregion, CTD = C-terminale Regulator-Domäne (modifiziert nach Freed-Pastor & Prives, 2012).

Das p53-Protein besteht aus fünf Domänen (Abbildung 1.6; Freed-Pastor & Prives, 2012), die sich jeweils durch bestimmte Funktionen auszeichnen. Das N-terminale Ende des Proteins setzt sich zusammen aus einer transaktivierenden Domäne (TAD, *transactivation domain*), die in zwei Bereiche, TAD1 und TAD2, unterteilt wird und für die transkriptionelle Aktivität von p53 notwendig ist. Diese Domäne ermöglicht die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie und die Interaktion mit

Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*), einem p53-spezifischen Inhibitor (Kubbutat *et al.*, 1997). Die folgende prolinreiche Region (PRR, *proline-rich domain*) interagiert mit signaltransduzierenden Molekülen, die eine SH₃-Bindedomäne besitzen (Joerger & Fersht, 2008). Für die Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen wird die DNA-bindende Domäne (DBD, *DNA-binding domain*) benötigt. Die für p53 spezifische DNA-Bindesequenz besteht aus zwei dekamerischen Wiederholungen der Konsensussequenz RRRCWWGYYY (R = Purin, W = Adenin oder Thymin, Y = Pyrimidin), die durch 0-13 Basenpaare separiert werden (Joerger & Fersht, 2008). Auch DNA-Elemente, die sich in ein oder zwei Basenpaaren von der Konsensussequenz unterscheiden, stellen funktionelle DNA-Bindedomänen für p53 dar (Göhler *et al.*, 2002). Die Tetramerisierungsregion (OD, *oligomerization domain*) sorgt für die aktive, tetramere Konformation des p53-Proteins (Jeffrey *et al.*, 1995). PTMs wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen, Sumoylierungen und Ubiquitinylierungen, welche die Funktion und Regulation von p53 beeinflussen, ereignen sich vorwiegend an der OD und an der Regulator-Domäne (CTD, *C-terminal regulatory domain*) (Gu & Zhu, 2012).

1.7.2 Aktivierung und Regulation

Unter normalen physiologischen Konditionen liegt der Tumorsuppressor p53 in gesunden Zellen nur in geringen Proteinkonzentrationen vor bzw. wird im Zytoplasma durch Interaktion mit seinen spezifischen Inhibitoren MDM2 und MDMX (*mouse double minute x homolog*; MDM4 in der Maus) inaktiviert. Neben seiner inhibitorischen Funktion besitzt MDM2 auch die Funktion einer E3-Ligase und fördert dadurch die Ubiquitin-abhängige Degradation von p53 (Moll & Petrenko, 2003). Da MDM2 ein direktes Zielgen von p53 ist, resultiert die p53/MDM2-Interaktion in einer negativen Rückkopplung. Während p53 die Expression von MDM2 induziert, inhibiert MDM2 durch Bindung und Degradation die p53-Aktivität (Moll & Petrenko, 2003).

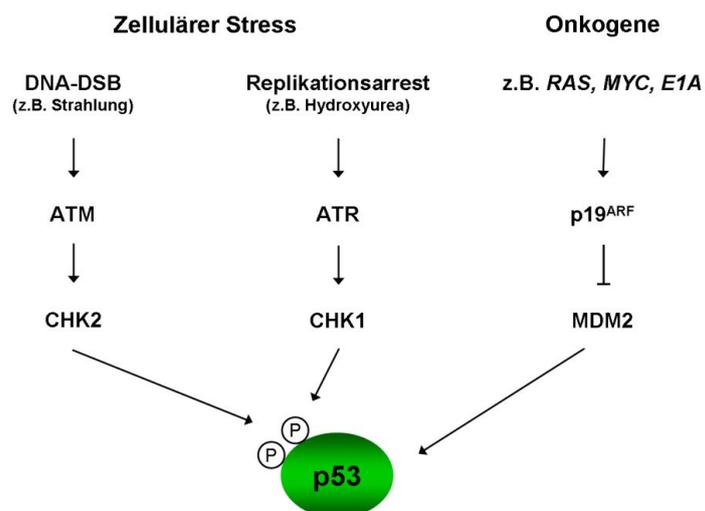


Abbildung 1.7: Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen.

Während die Aktivierung von p53 durch DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), verursacht beispielsweise durch ionisierende Strahlung, über den ATM-CHK2-Signalweg erfolgt, wird p53 bei Replikationsstress (induziert durch z.B. Hydroxyurea) über den ATR-CHK1-Signalweg aktiviert. Onkogene wie beispielsweise Ras, Myc und E1A aktivieren p53 über den p19^{ARF}-MDM2-p53-Signaltransduktionsweg.

Störungen der zellulären Homöostase, hervorgerufen durch zellulären Stress wie DSB oder Replikationsarrest führen zu Aktivierung und Stabilisierung von p53 (Abbildung 1.7; Miliani de Marval & Zhang, 2011; Brosh & Rotter 2009; Ho *et al.*, 2006). Dabei wird p53 am N-Terminus posttranslational modifiziert und kann infolgedessen nicht mehr mit MDM2 interagieren (Suh *et al.*, 2011). Diese posttranslationale Phosphorylierungen, wodurch auch die Degradation von p53 durch MDM2 blockiert wird, werden zum einen durch die Kinasen ATM/ATR (*ataxia telangiectasia mutated/ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und zum anderen durch CHK2 und CHK1 (*checkpoint kinase-2 and -1*) katalysiert (Abbildung 1.7; Smith *et al.*, 2010; Knippschild *et al.*, 2014; Appella & Anderson, 2001). Im Zytoplasma akkumuliertes, phosphoryliertes p53 gelangt daraufhin in den Zellkern und transaktiviert p53-abhängige Zielgene (Brosh & Rotter 2009; Levine & Oren, 2009). Die Transaktivierung spezifischer Zielgene kann wie bei NFκB durch Interaktion mit Kofaktoren verstärkt bzw. moduliert werden (Beckermann & Prives, 2010).

Auch Onkogene wie *RAS*, *MYC* und *E1A* können über den p19^{ARF}-MDM2-p53-Signaltransduktionsweg den Tumorsuppressor p53 aktivieren (Abbildung 1.7; Wang *et al.*, 2013; Eischen *et al.*, 1999). Hierbei erzeugt die Expression von onkogenem Ras einen deutlichen Anstieg von p19^{ARF} (Lin & Lowe, 2001). p19^{ARF} interagiert mit MDM2 und verhindert dadurch die MDM2-vermittelte Degradation von p53 (Lin & Lowe, 2001; Wang *et al.*, 2013). Die p53-Aktivierung über diesen Signalweg führt entweder in den Zellzyklusarrest oder zur Apoptose. Die durch aktiviertes p53 hervorgerufene Induktion von p21 beispielsweise leitet Zellen in einen Zellzyklusarrest oder in einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz) (Wang *et al.*, 2013).

1.8 p53 in Tumoren

In seiner Wildtypform ist der Tumorsuppressor p53 ein entscheidender Faktor zum Schutz vor unkontrolliertem Zellwachstum (Oren & Rotter, 2010). Jedoch liegen in > 50% humaner Tumoren Mutationen im *TP53*-Gen, welches für p53 kodiert, vor. Diese genspezifischen Veränderungen sind nicht nur mit dem Verlust der Tumorsuppressor-Aktivität assoziiert (*loss of function*), sondern häufig auch mit der Erlangung neuer Funktionen (*gain of function*) (Suh *et al.*, 2011; Oren & Rotter, 2010). So können diese p53-mutierten Proteine beispielsweise onkogenes Potential gewinnen, die tumorrelevante Eigenschaften wie Invasion, Proliferation und Metastasenbildung positiv beeinflussen können (Sigal & Rotter, 2000; Muller & Vousden, 2013). Diese grundlegenden Funktionsstörungen der p53-Aktivität basieren häufig auf *missense*-Mutationen (Petitjean *et al.*, 2007). Dabei verändert der Austausch einer einzigen Aminosäure die native Funktion des Proteins. Die meisten tumorassoziierten Mutationen (R175, G245, R248, R249, R273 und R282) wurden innerhalb der DNA-bindenden Domäne des p53-Proteins identifiziert (Abbildung 1.6; Cho *et al.*, 1994) und in Kontakt- (z.B. R273H und R248W) und Strukturmutationen (z.B. R175H) klassifiziert (Liu *et al.*, 2010). Während Kontaktmutationen die DNA-Bindung von p53 beeinträchtigen, nehmen Strukturmutationen Einfluss auf die p53-Konformation (Liu *et al.*, 2010).

Aufgrund ihrer stark verminderten Fähigkeit, an p53-spezifische *Response*-Elemente (RE) in Promotoren zu binden, regulieren p53-mutierte Proteine die Genexpression über andere

Mechanismen (Muller & Vousden, 2013). Dabei können p53-mutierte Proteine beispielsweise mit bereits an DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren bzw. mit Kofaktoren interagieren und so die Aktivierung und Transkription entsprechender Zielgene modulieren oder verstärken (Chicas *et al.*, 2000; Sampath *et al.*, 2001; Do *et al.*, 2012; Stambolsky *et al.*, 2010). Neben den modulierenden bzw. verstärkenden Effekten kann die Interaktion p53-mutierter Proteine mit Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren oder anderen Proteinen auch einen repressorischen Effekt bewirken. Hierbei wird durch die Protein-Protein-Interaktion der DNA-Kontakt der Transkriptionsfaktoren inhibiert, was eine reduzierte Genexpression zur Folge haben kann (Wang *et al.*, 2009; Beckermann & Prives, 2010). So verhindert mutiertes p53 auch die Bindung von p53-Wildtyp (p53WT) an die Promotoren seiner Zielgene (dominant-negativer Effekt) (Willis *et al.*, 2004). Auch nicht an der Transkription beteiligte Proteine können mit p53-mutierten Proteinen interagieren, wodurch ihre Funktionen verstärkt oder blockiert werden (Solomon *et al.*, 2012; Coffill *et al.*, 2012).

1.9 Wechselspiel zwischen p53 und NFκB

p53 und NFκB sind zwei Schlüssel-Transkriptionsfaktoren, die zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beitragen und in der Entwicklung von Tumoren eine essentielle Rolle spielen (O'Prey *et al.*, 2010; Schneider & Krämer, 2011). Ihre Aktivitäten lassen jedoch zunächst auf antagonistische Wirkungsweisen schließen (Tergaonkar, 2009; Webster & Perkins, 1999). Während die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 eng mit der Induktion der Apoptose und des Zellzyklusarrestes assoziiert ist (Hall *et al.*, 1996; Levine, 1997), wird durch NFκB die Regulation und Transkription antiapoptotischer Zielgene und damit die Apoptoseresistenz sowie die Proliferation gefördert (Beg & Baltimore, 1996; Karin, 2009; Hayden & Ghosh, 2012). Ursache dafür ist die Aktivierung von regulatorischen Proteinen, die sowohl auf den p53- als auch auf den NFκB-Signalweg wirken, wobei die Konsequenz gegensätzliche Wirkungsweisen sind (Ak & Levine, 2010). Hierbei ist beispielsweise die NFκB-induzierte Aktivierung der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 zu nennen, wodurch die Stabilität des p53-Proteins vermindert wird. NFκB ist demzufolge in die Kontrolle des MDM2-Expressionslevels involviert. Diese NFκB-abhängige Inaktivierung von p53 kann zur Steigerung einer Chemotherapieresistenz führen und dadurch die Tumorprogression fördern (Tergaonkar *et al.*, 2002). Daneben spielt auch die Konkurrenz um nukleäre Kofaktoren eine wichtige Rolle. Zur Verstärkung ihrer Transkriptionsaktivität interagieren sowohl NFκB als auch p53 mit Kofaktoren und können daher um kongruente Kofaktoren wie die Histon-Acetyltransferasen (HATs) p300 und CBP (*cAMP-responsive element-binding protein-binding protein*) wetteifern (Hayden & Ghosh, 2012; Beckermann & Prives, 2010; Webster & Perkins, 1999). Hierbei zirkuliert der entsprechende Kofaktor ständig zwischen beiden Transkriptionsfaktoren, was sich negativ auf die jeweilige Transaktivierung auswirkt und in einer bidirektionalen Repression/Aktivierung resultiert (Schneider & Krämer, 2011; Webster & Perkins, 1999).

Neben der Ausübung gegensätzlicher Strategien können NFκB und p53 auch synergistisch agieren. Frühe Studien zeigten bereits, dass die Induktion von p53 eine NFκB-Aktivierung zur Folge hat, wobei sich diese, durch die Involvierung der Serin/Threonin-Proteinkinasen MEK1 (MAP2K1, *Dual specificity*

mitogen-activated protein kinase 1) und RSK p90 (*Ribosomal S6 kinase*), von der TNF α -vermittelten NF κ B-Aktivierung unterscheidet. Zudem spielt NF κ B eine essentielle Rolle in der p53-induzierten Apoptose (Ryan *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigte sich, dass die TNF α -vermittelte Hochregulation des proapoptotischen p53-Zielgens *PUMA* von NF κ B/p65 abhängig ist (Wang *et al.*, 2009). Auch die p53-abhängige Induktion der proapoptotischen *BH3-only* Proteine NOXA und p53AIP1 (*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*) erfordert NF κ B-Aktivität (O'Prey *et al.*, 2010).

Die Deregulation der durch p53 und NF κ B regulierten Kontrollmechanismen kann mit dem Überleben von Zellen assoziiert werden und sich beispielsweise in Form von Chemotherapieresistenzen widerspiegeln (Schneider & Krämer, 2011). Insbesondere sind hierbei die häufig in Tumoren auftretenden Mutationen von p53 sowie die konstitutive NF κ B-Aktivität zu erwähnen. So konnte bereits gezeigt werden, dass in Tumorzellen mutiertes p53 die NF κ B-Aktivität steigert und dass die Herunterregulation von mutiertem p53 zur Apoptose führt (Scian *et al.*, 2005; Weisz *et al.*, 2007). Neueste *in vivo*-Studien belegen weiterhin, dass akkumuliertes mutiertes p53 die NF κ B-Aktivierung verlängert, wodurch chronische Entzündungen und die Entwicklung entzündungsassoziierter Kolonkarzinome gefördert werden (Cooks *et al.*, 2013).

Darüber hinaus können p53-Mutanten auch den NF κ B2-Genpromotor aktivieren, wodurch p52 die Promotoraktivität p53-abhängiger Zielgene modulieren kann (Scian *et al.*, 2005; Schumm *et al.*, 2006). Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass das Wechselspiel zwischen p53 und NF κ B in seiner Intensität und Konsequenz kontext- bzw. stimulusabhängig ist (Tergaonkar & Perkins, 2007).

1.10 Zielsetzungen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei Fragestellungen, wobei sich beide mit dem Beitrag des NF κ B-Signalweges in soliden Tumoren auseinandersetzen.

Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und p53 besitzen entscheidende Funktionen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und sind daher in Krebszellen häufig dereguliert (Ruland, 2011; Villunger *et al.*, 2003; Green & Kroemer, 2009). Tumore mit konstitutiver NF κ B-Aktivierung und dereguliertem p53-Signalweg zeigen eine verstärkte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Dolcet *et al.*, 2005; Blandino *et al.*, 1999). Demzufolge ist anzunehmen, dass ein Wechselspiel zwischen NF κ B und p53 eine bedeutende Position in Tumoren einnehmen könnte. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher mittels geeigneter *in vitro*-Modelle mit murinen Pankreas- und humanen Kolonkarzinomzellen die Frage beantwortet werden, inwiefern NF κ B und p53 während der Karzinogenese und Tumoraufrechterhaltung miteinander agieren und welche Konsequenz hierbei eine mögliche Interaktion zwischen NF κ B/p65 und p53 mit sich bringt. Dabei stand die p65/p53-abhängige Genregulation im Fokus. Dafür sollte zunächst in Pankreaskarzinomzellen die Resistenz gegen Topoisomerase II-Inhibitoren getestet werden. Durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von NF κ B/p65 bzw. p53 sollten relevante NF κ B/p65-Zielgene ermittelt und die Überwindung der Apoptoseresistenz getestet werden. Der molekulare Mechanismus des NF κ B/p53-Wechselspiels sollte mit Hilfe von DNA-Protein-Assays (wie ABCD- oder ChIP-Assays) geschehen.

Da die I κ B-Proteine eine Schlüsselfunktion im NF κ B-Signalweg haben (siehe 1.6), sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss von I κ B β auf die Pathogenese des Pankreaskarzinoms im Mausmodell untersucht werden. Dies sollte mit Hilfe eines I κ B β (*Nfkbib*)-*knockouts* in murinen, genetisch veränderten Pankreaskarzinommodellen sowohl mit aktiviertem Kras^{G12D} als auch mit aktiviertem Kras^{G12D} und p53^{R172H} geschehen. Überlebenskurven der entsprechenden Mausmodelle sowie histologische Analysen der Tumoren sollten zunächst Rückschlüsse auf die Bedeutung von I κ B β in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms ermöglichen. Des Weiteren sollten *in vitro* die aus murinen, I κ B β -defizienten Pankreastumoren isolierten Tumorzellen molekularbiologisch analysiert werden. Die Durchführung und Analyse eines Zellen- und Gewebe-Transkriptomprofils sollte weitere Informationen zur Rolle von I κ B β in der Krebsentstehung liefern.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Übersicht der Laborgeräte.

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biorupter UCD-200 TM	Diagenode s.a. BELGIUM EUROPE, Liège, Belgien
Blotting-Apparatur <i>Wet-Transfer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Inkubator HERAcell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dewar-Transportgefäß, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe
<i>Easypet</i> [®] Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg
Echtzeit-PCR-System <i>StepOnePlus</i>	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Einbettssystem EG1150 H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Folienschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Geldokumentationssystem Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer <i>Sunrise</i>	Biometra GmbH, Göttingen
Gewebeinfiltrationsautomat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Glaswaren Schott Duran	Schott UK Ltd., Stafford, UK
Homogenisator <i>Silent Crusher M</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Lumineszenzgerät FLUORstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad
<i>Magnetic-Ring Stand (96 Well)</i>	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Magnetrührer IkaMag [®] RCT	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Manuelle Färbestation	Thermo Scientific, Walldorf
Mikroplatten-Luminometer LUMIstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Microsysteme GmbH, Krefeld
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom HM355S	Thermo Scientific, Walldorf
Mikrowelle	Siemens AG, München
Minizentrifuge MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
<i>Multipette</i> [®] <i>stream</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer <i>Improved</i>	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg

Bezeichnung	Hersteller
<i>Odyssey® Infrared Imaging System</i>	LI-COR Bioscience Corporate, Lincoln, NE, USA
pH-Meter 521	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipette <i>Reference®</i> , <i>Research®</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Power Supply EPS 601</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Präzisionswaage Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Präparationsbesteck	Thermo Scientific, Walldorf
Pumpe <i>VacuGene</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pumpe <i>VacuGene XL</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler TPersonal/TGradient	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Thermomixer Compact 5350	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina 46R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortex VF2	IKA-Werke GmbH, Staufen
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Western Blot-System <i>Mighty Small II</i>	Hoefer Inc., Holliston, MA, USA
Wippschüttler WT 17	Biometra GmbH, Göttingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Blotting Papier	Whatman plc, Kent, UK
Combitips Biopur®	Eppendorf AG, Hamburg
CryoPure <i>tubes</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einbettkassetten	Melite GmbH, Burgdorf
Einmalspritzen	CODAN Medizinische Geräte GmbH, Lensahn
Eppendorf <i>Safe-Lock</i> Gefäße™ 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Höllenstein Atzstift Argentrix	Ryma-pharm GmbH, Körle
Immobilon-FL PVDF Transfer Membran	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Kanülen Gr. 18	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Bezeichnung	Hersteller
Kanülen Gr. 26	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
<i>MicroAmp® Optical 96-well Reaction plate</i>	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
Objektträger Superfrost® Plus	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Omnican®F 1 ml (Spritzen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Phase Lock Gel Light Tubes</i>	5 prime GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,65 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, BioPur® <i>Safe-Lock</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Schlauchfolie	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Shandon coverplate</i> für IHC	Thermo Scientific, Walldorf
Skalpelle	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
Zellkulturverbrauchsmaterialien (Flaschen, Schalen, well-Platten, Röhrchen)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.3 Allgemeine Reagenzien

Tabelle 2.3: Übersicht der allgemeinen Reagenzien.

Reagenz/Enzym	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Agarose A (ChIP-Assay)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Bovine Serum Albumin (BSA) Standard</i>	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
<i>Bradford Reagenz</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Collagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA

Bezeichnung	Hersteller
<i>Complete, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DL-Dithiothreitol (DTT) ≥98% (TLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Doxorubicin	EMD Bioscience, San Diego, CA, USA
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline, powder</i>	Biochrom AG, Berlin
EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
EGTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Etoposide Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HEPES Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hydroxyurea ≥98% (TLC), powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isofluran <i>Forene</i>	Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nonidet P40	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Paraformaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Bezeichnung	Hersteller
PBS GIBCO pH 7,4 (1x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Phosphatase inhibitor mix I</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
<i>Proteinase K, recombinant, PCR grade</i>	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Proteinase K peqGOLD (ChIP-Assay)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Protein-Marker IV	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen GmbH, Hilden
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Sodium dodecyl sulphate (SDS)</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Streptavidin-Agarose-Beads (ABCD-Assay)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Recombinant Human TNFα</i>	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA
<i>Recombinant Murine TNFα</i>	PeptoTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA
TE-Puffer, pH 8.0	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-HCl	J.T.Baker® Chemicals, Phillipsburg, NJ, USA
Tris Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TritonX-100	Merck KGaA, Darmstadt
TWEEN® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
tRNA (ChIP-Assay)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.4 Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 2.4: Humane Karzinomzelllinien.

Bezeichnung	Zelltyp	Quelle
HCT116 p53-profizient (p53 ⁺)	Kolonkarzinomzelllinie	Prof. Dr. B. Vogelstein, John Hopkins University, BA, USA
HCT116 p53-defizient (p53 ⁻)	Kolonkarzinomzelllinie	Prof. Dr. B. Vogelstein, John Hopkins University, BA, USA

Tabelle 2.5: Primäre Zellen aus murinen Pankreastumoren (PPT).

Bezeichnung	Genotyp
W22 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{loxP/loxP} ;LSL-R26 ^{Tva-LacZ/+}
6554 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{loxP/loxP} ;LSL-R26 ^{Tva-LacZ/+}
3107 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
5436 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/R172H} ;LSL-R26 ^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}
5748 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+}
7662 PPT	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+}
AH762 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+}
AH941 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+}
AH563 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
AH993 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
AA373 PPT	<i>Pdx1-Cre</i> ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} ;LSL-R26 ^{Tva-LacZ/+}
BK50 PPT	<i>Pdx1-Cre</i> ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
4910 PPT	<i>Pdx1-Cre</i> ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
AH1158 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Pdx1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
AH1165 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Pdx1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}
AH1281 PPT	<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ;Pdx1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+}

Tabelle 2.6: Murine, stabil transfizierte PPT-Zellen.

Bezeichnung	Genotyp
6554-RCAS-anj-Ctl	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{loxP/loxP} ;R26 ^{LSL-TVA-LacZ} ;control IRES-Puro
6554-RCAS-ats1-#1	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{loxP/loxP} ;R26 ^{LSL-TVA-LacZ/+} ;p53 ^{R172H} -IRES-Puro
6554-RCAS-ats1-#2	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{loxP/loxP} ;R26 ^{LSL-TVA-LacZ/+} ;p53 ^{R172H} -IRES-Puro

2.4.1 Verwendete Reagenzien in der Zellkultur

Tabelle 2.7: Übersicht der Medien und Reagenzien in der Zellkultur.

Bezeichnung	Hersteller
D-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Puromycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.4.2 Zusammensetzung der Medien

Tabelle 2.8: Übersicht der Medien-Zusammensetzung.

Zelllinie/Art der Mediums	Zusammensetzung
HCT116-Zellen, primäre Zellen aus murinen Pankreastumoren	D-MEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	7 ml D-MEM 2 ml FCS 1 ml DMSO

2.5 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 2.9: Übersicht der kommerziell erhältlichen Kits.

Kit	Hersteller
<i>Ambion® WT expression kit</i>	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
<i>Caspase-Glo® 3/7 Assay</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>GeneChip® 3' IVT express kit</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip® poly-A RNA control kit</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip® WT terminal labelling kit</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
<i>QIAshredder</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden
<i>TaqMan Reverse Transcription Reagents</i>	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA

2.6 Microarray Chips

Tabelle 2.10: Microarray Chip.

Chip	Hersteller
<i>GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip® Poly-A RNA Control Kit</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA
<i>GeneChip® WT Terminal Labeling Kit</i>	Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.11: Verwendete Puffer/Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Ganzzellextrakte	IP-Puffer pH 7.9	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P40 10% (v/v) Glycerol

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Ganzzelextrakte	5x Laemmli-Puffer pH 6.8	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 228 mM Tris-HCl 0,75 mM Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
Western Blot	Laufpuffer (10x)	1% (w/v) SDS 0,25 M Tris 2 M Glycin
	Sammelgelpuffer pH 6.8	0,5 M Tris-HCl
	Trenngelpuffer pH 8.8	1,5 M Tris-HCl
	Transferpuffer (10x)	2 M Glycin
	Transferpuffer (1x)	1 Teil Transferpuffer (10x) 2 Teile Methanol (100%) 7 Teile ddH ₂ O
	<i>Blocking</i> Puffer	5% (w/v) Magermilchpulver 0,1% TWEEN 20 gelöst in PBS
	Waschpuffer	0,1% TWEEN 20 in PBS
Nukleäre Extrakte	Puffer A	10 mM HEPES pH 7.9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMFS 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mix
	Puffer C	20 mM HEPES pH 7.9 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMFS 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mix
Chromatin- Immunpräzipitation (ChIP)	L1-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 2 mM EDTA pH 8.0 0,1% Nonidet P40 10% Glycerol
	L2-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 5 mM EDTA 1% (w/v) SDS

Verwendung	Bezeichnung	Zusammensetzung
Chromatin- Immunpräzipitation (ChIP)	Dilutions-Puffer	50 mM Tris pH 8.0 0,5 mM EDTA 0,5% Nonidet P40 200 mM NaCl
	Hochsalz-Puffer	20 mM Tris pH 8.0 2 mM EDTA 1% Nonidet P40 500 mM NaCl 0,1% (w/v) SDS
	LiCl-Puffer	20 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA 0,5% Nonidet P40 250 mM LiCl 0,5% Natriumdeoxycholat
	Niedrigsalz-Puffer	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA
	Elutions-Puffer	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA 1% (w/v) SDS
Agarosegele	50x TAE-Puffer pH 8.5	2 M TRIS 100 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure (100%)
DNA-Isolation aus Mausschwanzbiopsie (Genotypisierung)	10x Gitschier's Puffer	670 mM Tris pH 8.8 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 67 mM MgCl ₂
	PCR-Lysepuffer nach Soriano	0,5% (v/v) Triton X-100 1% (v/v) β-Mercaptoethanol 10% (v/v) 10x Gitschier's Puffer
Allgemeine Verwendung	PBS pH 7.4	8 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄
	TE-Puffer	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA

Alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

2.8 Oligonukleotide

Tabelle 2.12: Übersicht der Oligonukleotide.

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
siRNA	<i>scrambled</i> /Kontrolle	CAGUCGCGUUUGCGACUGGdTdT
	p65+144	GAUCAAUUGGCUACACAGGAdTdT
	sip65-hu2	GAUUGAGGAGAAACGUAAAAdTdT
	p53	CUACUUCUGAAAACAACGdTdT
	mlkbb+542	GACUGGAGGCUACAACUAGdTdT
ABCD-Assay	biotinyliertes kB-Oligo - s	TGGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCGC
	biotinyliertes kB-Oligo - as	GCGGAAAGTCCCCAGCGGAAAGTCCCCA
ChIP-PCR	GAPDH-FW	AGCTCAGGCCTCAAGACCTT
	GAPDH-RV	AAGAAGATGCGGCTGACTGT
	FasL-kB-FW-396	TACCCCATGCTGACCTGCTC
	FasL-kB-RV-76	ACGGGACCCTGTTGCTGACTG
	MnSOD-FW	CGGGGTTATGAAATTTGTTGAGTA
	MnSOD-RV	CCACAA-GTAAAGGACTGAAATTAA
Echtzeit-PCR	Cyclophilin muFW	ATGGTCAACCCACCGTGT
	Cyclophilin muRV	TTCTTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC
	mulkBbeta fwd_2	CAGCGGCAGCGACAGTGACA
	mulkBbeta rev_2	TTTGGATGCCGGGGAAGGCG
	mu IL-1β fwd	CTCAATGGACAGAATATCAACCAACA
	mu IL-1β rev	ACAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTTG
	mu IL-6 fwd	TCGGAGGCTTAATTACACATGTTCT
	mu IL-6 rev	GCATCATCGTTGTTCCATACAATCA
	mu TNFa fwd	ATGAGAAGTTCCCAAATGGCC
	mu TNFa rev	TCCACTTGGTGGTTCGCTACG
Genotypisierungs-PCR	IkBβ - I5	CCTCAAACCTCACACCCACTG
	<i>IkBβ</i> - E2	GAGCCCTTCCCTGGATTTCC
	IkBβ - E5	TGACCCACCCGCCCGCATGT
<i>Ptf1a^{Cre}</i>	p48-Cre-GT-LP-URP	CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA
	p48-Cre-GT-wt-UP	CCACGGATCACTCACAAAGCGT
	p48-Cre-GT-mut-UP-neu	GCCACCAGCCAGCTATCAA
<i>Pdx1-Cre</i>	Cre-neu-UP	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG
	Cre-neu-LP	CAGGGTGTATAAGCAATCCC
	Gabra1-UP	AACACACACTGGAGGACTGGCTAGG
	Gabra1-LP	CAATGGTAGGCTCACTCTGGGAGATGATA

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	Kras-WT-UP1	CACCAGCTTCGGCTTCCTATT
	Kras-URP-LP1	AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA
	Kras ^{G12D} mut-UP	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
<i>LSL-Trp53^{R172H}</i>	Trp53 ^{R172H} -WT-UP2	AGCCTTAGACATAACACACGAACT
	Trp53 ^{R172H} -URP-LP	CTTGGAGACATAGCCACACTG
	Trp53 ^{R172H} mut-UP4	GCCACCATGGCTTGAGTAA
<i>LSL-R26^{TVA-JacZ}</i>	R26-Tva-GT-UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
	R26-Tva-GT-WT-L	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Alle Oligonukleotide wurden über die Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen.

2.9 Antikörper

Tabelle 2.13: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Verwendung	Antikörper	Hersteller
Western Blot	Anti-p53 (CM5) Novocastra	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
	Anti-p53 DO-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-p65 (c-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-β-Aktin, A5316	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Anti- <i>cleaved</i> PARP	BD Biosciences, Heidelberg
	Anti-Survivin	Upstate/Millipore, Billerica, MA, USA
	Anti-PUMA	Cell signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
	Anti-p21 (c-19)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-cRel	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-RelB	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-IκBα (c-21)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-IκBβ (c-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-α-Tubulin, T6199	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Anti-Cyclin A	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-Cyclin D1 (HD-11)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-skp2	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-p27	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight® 680 Conjugate), #5470	Cell signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
	Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight® 800 Conjugate), #5470	Cell signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
	Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight® 680 Conjugate), #5470	Cell signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

Verwendung	Antikörper	Hersteller
ChIP	Anti-p53 DO-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Anti-p65 c-20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
	Normal rabbit IgG sc-2027	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Immunhistochemie (IHC)	Anti-F4/80 clone BM8	Caltag Laboratories
	Biotinylated anti-Rabbit IgG (<i>goat</i>)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
	Biotinylated anti-Rat IgG (<i>rabbit</i>)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.10 Reagenzien für Immunhistochemie

Tabelle 2.14: Übersicht der Immunhistochemie-Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
<i>Antigen Unmasking Solution, Citrate-based</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Avidin/Biotin Blocking Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>DAB Substrate Kit for Peroxidase</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Eosin wässrig 2%	Waldeck GmbH, Münster
<i>Goat serum G9023</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf
<i>Rabbit serum R9133</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Roti® Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti® Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>VECTASTAIN Elite ABC Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck KgaA, Darmstadt

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Aussaat von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter Sterilwerkbänken. Die verwendeten humanen Kolonkarzinomzelllinien sowie die primären Karzinomzellen aus murinen Pankreaskarzinomen wurden in den entsprechenden Medien (siehe Tabelle 2.8) kultiviert und in 37°C-Brutschränken unter Zufuhr von 5% CO₂ inkubiert. Regelmäßige Passagen wurden mittels frischen, vorgewärmten, FCS-haltigen Mediums (FCS-Medium) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und vereinzelt. Das Auszählen der einzelnen Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

In 175 cm²-Zellkulturflaschen bzw. 10 cm-Schalen zu 80-90% konfluent gewachsene Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, abtrypsiniert, in 5 ml PBS aufgenommen und in ein 50 ml-Falcon überführt. Das sich nach anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C gebildete Zellpellet wurde in 5 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 2.8) aufgenommen, resuspendiert und zu 1 ml-Aliquots in Cryotubes pipettiert, um sie nach wenigen Tagen bei -80°C in Flüssigstickstoff wegzufrieren.

3.1.3 siRNA-Transfektionen

Vor Verwendung wurde die siRNA (*small interfering RNA*; Sequenzen siehe Tabelle 2.12) in einer Konzentration von 40 µM nach den Angaben des Herstellers in einem 1x *siMAX Universal Buffer* gelöst und in einer Konzentration von 50 nM bzw. 100 nM mittels Polyethylenimin (PEI; Sigma-Aldrich; Wirth *et al.*, 2011) transfiziert.

Für die Transfektion von siRNA wurden 2.000 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Platte bzw. 50.000 Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte oder 300.000 Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels PEI und der angegebenen siRNA transfiziert. Hierzu wurde zunächst Mix I pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusammenmischen von Mix II wurde dieser zu Mix I gegeben (siehe Tabelle 3.1) und für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen auf die Transfektion vorbereitet, indem sie einmal mit serumfreiem Medium gewaschen wurden, um transfektionshemmende Serumrückstände zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Transfektionsgemischs zu der entsprechenden Menge von bereits vorgelegtem, FCS-freiem Medium in den *wells* (siehe Tabelle 3.1). Nach weiteren 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium gegen frisches FCS-Medium

ausgetauscht. Versuchsabhängig wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden später geerntet oder mit den angegebenen Substanzen (siehe 3.1.4 und 3.1.5) für einen weiteren Zeitraum behandelt.

Tabelle 3.1: Ansätze für Transfektionen von Zellen.

	96-well-Platte		6-well-Platte		10 cm-Schale	
Mix I						
OptiMEM	9,8 µl	9,8 µl	98 µl	98 µl	188 µl	188 µl
PEI	0,2 µl	0,2 µl	2 µl	2 µl	12 µl	12 µl
Mix II						
OptiMEM	9,875 µl	9,75 µl	98,75 µl	97,5 µl	187,5 µl	175 µl
siRNA (50 nM)	0,125 µl		1,25 µl		12,5 µl	
siRNA (100 nM)		0,25 µl		2,5 µl		25 µl
Gesamtvolumen Transfektionsmix	20 µl	20 µl	200 µl	200 µl	400 µl	400 µl
vorgelegtes Volumen FCS- freies Medium	80 µl	80 µl	800 µl	800 µl	4,6 ml	4,6 ml

3.1.4 Behandlung von Zellen mit Zytostatika/Chemotherapeutika

Doxorubicin und Etoposid. Zur Induktion von Apoptose in den murinen Pankreaskarzinomzellen und humanen Kolonkarzinomzellen wurden zwei verschiedene Topoisomerase II-Inhibitoren, Doxorubicin und Etoposid, eingesetzt. Topoisomerase II-Inhibitoren induzieren DNA-Strangbrüche, indem sie an die DNA binden, die Topoisomerase II-DNA-Komplexe stabilisieren und die Religation der DNA-Stränge inhibieren (Munster *et al.*, 2009).

Vor der Behandlung von Tumorzellen wurde Doxorubicin in sterilem bidestilliertem Wasser (ddH₂O) in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt und nach einer weiteren 1:10 Verdünnung in sterilem ddH₂O mit FCS-Medium auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt. Gelöstes Doxorubicin ist bei 4°C vier Wochen stabil. Etoposid wurde in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst und mit FCS-Medium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Hierbei wurde stets eine DMSO-Negativkontrolle mitgeführt.

Hydroxyurea. Für die Induktion eines Replikationsarrestes wurden humane Kolonkarzinomzellen mit Hydroxyurea behandelt. Die Wirkung des Zytostatikums Hydroxyurea (HU) basiert auf der Hemmung des Enzyms Ribonukleotidreduktase. Durch Bildung eines freien Nitroxid-Radikals, welches an Tyrosyl-Radikale der aktiven Seite des Enzyms bindet, wird die Synthese von Desoxyribonukleotiden blockiert. Diese Blockade inhibiert die DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus und induziert folglich Replikationsstress (Koç *et al.*, 2004). HU findet insbesondere zur Behandlung von malignen Bluterkrankungen (z.B. Leukämien) Einsatz (Schrell *et al.*, 1996).

Die schnelle Zersetzung von HU durch Kontakt mit Feuchtigkeit sowie die Instabilität in wässriger Lösung der pulverisierten Substanz erforderte, dass vor jeder Anwendung eine frische 0,5 M Stocklösung durch Abwiegen und Lösen des Pulvers in sterilem ddH₂O angesetzt wurde. Die

eingesetzten Konzentrationen wurden durch Verdünnungen der Stocklösung in 10%igem FCS-Medium erzielt und auf die Zellen gegeben.

3.1.5 Behandlung der Zellen mit TNF α

Zur Aktivierung des kanonischen NF κ B-Signalweges sowie zur Induktion der Apoptose wurde der klassische NF κ B-Stimulator TNF α verwendet (siehe 1.4.2).

TNF α wurde in sterilem ddH $_2$ O in einer Konzentration von 10 ng/ μ l angesetzt und mit FCS-Medium auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt.

3.1.6 Hoechst-Färbung

Der Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 dient der visuellen Identifikation apoptotischer Zellen. Durch seine Membranpermeabilität gelangt das Reagenz in den Nukleus und interkaliert dort in AT-reiche Regionen der DNA. Mittels dieser blauen Fluoreszenz lässt sich die für die Apoptose typische kondensierte, fragmentierte DNA deutlich von normalen Zellkernen unterscheiden.

Vor der Färbung wurden in einer 96-*well*-Platte 2.000 Zellen pro *well* in 100 μ l Medium ausgesät. Im Triplet wurden die Zellen am nächsten Tag mit den angegebenen Konzentrationen Doxorubicin behandelt. Die Zugabe des Hoechst-Reagenz erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation. Dazu wurde zuvor eine 2 mM Hoechst-Stammlösung 1:250 in FCS-Medium verdünnt und 100 μ l pro *well* pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation im 37°C-Brutschrank wurden anschließend die apoptotischen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

3.1.7 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays wird die Viabilität von Zellen, beispielsweise nach Behandlung von Chemotherapeutika, gemessen. Dieser Test basiert auf der NADH- und NADPH-abhängigen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese Reduktion wird bedingt durch Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums. Die Menge des umgesetzten und gemessenen Farbstoffs spiegelt die Glykolyserate der Zellen wider (Berridge & Tan, 1993).

Zunächst wurden 5.000 der zu testenden Zellen pro *well* in 100 μ l Medium in einer 96-*well*-Platte ausgesät, um diese dann nach 24 Stunden Inkubation im Triplet mit der angegebenen Substanz für einen bestimmten Zeitraum zu behandeln. Für die Untersuchung des Wachstums verschiedener Zellen nach bestimmten Zeitpunkten wurden 2.000 Zellen pro *well* ebenfalls im Triplet in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Nach Zugabe von 10 μ l des MTT-Reagenz und einer vierstündigen Inkubation im 37°C-Brutschrank wurde das Medium abgenommen und die entstandenen blau-violetten Formazankristalle mit 200 μ l eines Gemischs aus DMSO und Ethanol im Verhältnis 1:1 gelöst. Nach einer 10-minütiger Inkubation auf einem Schüttler wurde die Optische Dichte (OD) bei 600 nm mit Hilfe

eines Photometers (Anthos 2001) gemessen. Der OD-Wert der Negativkontrolle wurde als 100% Viabilität festgelegt und die Viabilität der behandelten Zellen darauf bezogen.

3.1.8 Caspase-Assay

Der Caspase-Assay dient der Bestimmung der Apoptoserate. Hierbei wird die Aktivität von Caspasen nachgewiesen. Dafür wurde der *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay (Promega) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dieses System basiert auf der Zugabe und Messung eines Substrats, welches nach Spaltung durch Caspasen luminesziert. Das Signal der Lumineszenz ist somit proportional zur Caspase-3/7-Aktivität.

Im Triplet wurden 2.000 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausgesät. 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen TNF α behandelt. Anschließend wurden 100 μ l des Caspase-Reagenz zu den Zellen gegeben, um nach einer einstündigen Inkubation die Lumineszenz im FLUORstar-Luminometer zu messen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Ganzzellextrakte

Für die Gewinnung von Ganzzellextrakten (*whole cell extracts, wce*) wurden Zellen ohne Behandlung so in 10 cm-Schalen ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 80 - 90% konfluent waren. Zur Ernte der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von IP-Puffer, welcher mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren supplementiert war. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die lysierten Zellen auf Eis vom Schalenboden abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford* (Bradford, 1976) wurden in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte 300 μ l pro *well* des 1:5 verdünnten *Bradford*-Reagenz vorgelegt. Nach Auftauen und 20-minütiger Zentrifugation der Proteinproben bei 4°C und 14.000 rpm wurde im Triplet jeweils 1 μ l des Überstandes zu den 300 μ l *Bradford*-Reagenz pipettiert, wobei eine BSA (Bovines Serumalbumin)-Reihe mit definierten Konzentrationen als Standard diente. Die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung führt zu einem Farbumschlag, welcher zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm führt. Dementsprechend wurde die OD der Farbreaktion bei einer Absorption von 600 nm im Photometer Anthos 2001 gemessen. Die Proteinproben wurden anschließend mit IP-Puffer bzw. Puffer A oder C (nukleäre Extrakte) auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Nach Zugabe von Laemmli-Puffer wurden die Extrakte für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Zytosolische und nukleäre Extrakte

Für die Herstellung zytosolischer und nukleärer Extrakte wurden 5×10^6 Zellen in einer 15 cm-Schale ausgesät. Die Ernte erfolgte, wenn die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90% erreicht hatten. Dazu wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 500 μ l kaltem PBS pro Schale mit einem Zellschaber auf Eis abgekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei 1.600 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 150 - 300 μ l Puffer A (2.6; Volumen abhängig von Pelletgröße) aufgenommen und gut resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 4°C auf Eis wurde die Zellsuspension mittels einer 1 ml Spritze sieben- bis achtmal durch eine Kanüle der Größe 26 G gezogen. Nach Zentrifugation bei 6.800 rpm und 4°C für zwei Minuten wurde der Überstand, das dem Zytoplasma entsprach, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 rpm und 4°C für 20 bis 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration aufbewahrt. Während der Zentrifugation wurde das Zellpellet, welches die isolierten Zellkerne enthielt, vier- bis fünfmal mit 500 μ l Puffer A gewaschen, anschließend in 60 bis 80 μ l Puffer C (2.6; Volumen wieder abhängig von Pelletgröße) aufgenommen, mit einer 100 μ l Pipettenspitze resuspendiert und für 60 Minuten auf einem Überkopfschüttler bei 4°C eluiert. Anschließend wurden diese Proben bei 14.000 rpm und 4°C für 20 bis 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, die Kernproteine, wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und wie die zytosolischen Proteine in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration aufbewahrt.

3.2.3 ABCD-Assay

Der ABCD-Assay (*avidin-biotin complex DNA-binding assay*) stellt eine Methode zur Analyse der DNA-Bindung von Proteinen dar. Der ABCD-Assay unterliegt dem Prinzip eines Pulldown-Assays. Hierfür wurden Zellen in mehreren 10 cm-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 - 90% im 37°C-Brutschrank inkubiert. Nach der TNF α -Behandlung wurden die Zellen geerntet und gepoolt. Es wurde 1 mg Protein in einem Endvolumen von 250 bis 300 μ l pro Ansatz eingesetzt. Die Zugabe und Inkubation von 3 μ g eines biotinylierten Konsensus- κ B-Oligonukleotids erlaubt nun die Bindung von Proteinen an diese Sequenz. Nach vier Stunden bei 4°C auf dem Überkopfschüttler wurde den Extrakten 100 μ l Streptavidin-konjugierte Agarose-*Beads* hinzugefügt. Durch die hohe Affinität einer Streptavidin-Biotin-Bindung konnte nun der gebildete Komplex aus DNA und Protein, nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Überkopfschüttler, aus den Extrakten isoliert werden. Dazu wurden die Proben bei 2.600 rpm und 4°C für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde dreimal durch einmaliges Auf- und Abpipettieren von 500 μ l IP-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 2.600 rpm und 4°C für 30 Sekunden gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurden die *Beads* in 20 bis 30 μ l Laemmli-Puffer (je nach Pelletgröße) aufgenommen und die gebundenen Proteine für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Für die elektrophoretische

Auftrennung der Extrakte in einem SDS-Gel wurden etwa 15 bis 20 µl dieser Extrakte auf ein 10%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

3.2.4 Western Blot

Der *Western Blot* bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Trägermembran und dient der Identifikation und Quantifizierung von spezifischen Proteinen aus einem Proteingemisch.

Vor dem Blotten werden Proteine durch ein sogenanntes SDS-Gel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins entscheidet daher über die Verwendung eines 10%- oder 12%-igem Trenngels. Die Zusammensetzungen der Gele sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.

	Sammelgel	10%-iges Trenngel	12%-iges Trenngel
ddH₂O	3 ml	4,1 ml	3,4 ml
Sammelgelpuffer pH 6.8	1,3 ml	-	-
Trenngelpuffer pH 8.8	-	2,6 ml	2,6 ml
30% Acrylamid	750 µl	3,3 ml	4 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	100 µl
10% APS	25 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	15 µl	15 µl

SDS-Gele. Zunächst wurde das aus Polyacrylamid bestehende Trenngel vorbereitet. Die Polymerisation wurde durch Zugabe der Komponenten APS und TEMED eingeleitet. Das Gel wurde dann zügig in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Trennbände zu erhalten. Nach etwa 25 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und die Polymerisation des Sammelgels durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Nachdem das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert worden war, wurde ein entsprechender Probenkamm luftblasenfrei in das Sammelgel geschoben. Nach einer weiteren etwa 25-minütigen Polymerisation wurde der Probenkamm aus dem Gel gezogen und die entstandenen Taschen zur Entfernung von Gelresten, die das Laufverhalten der Proteine beeinflussen könnten, mit Hilfe einer Kanüle und ddH₂O gespült. Vor Beladung der Geldaschen wurden die zu untersuchenden und in Lämmli aufgenommenen Extrakte (siehe 3.2.1 Ganzzelleextrakte) für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Das aufzutragende Volumen und die damit einhergehende Konzentration der Proteinproben (25 bis 100 µg) wurden durch das zu untersuchende Protein bestimmt. Um ein gleichmäßiges Laufverhalten der Proteine im Gel zu gewährleisten, wurde in nicht benötigte Taschen das entsprechende Volumen 1x Laemmli pipettiert. Alle Taschen sowie die Laufapparatur wurden vorsichtig mit 1x Laufpuffer (siehe Tabelle 2.11) aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde mittels *Power Supply* EPS 601 bei 80 Volt und Raumtemperatur für 2 bis 3 Stunden gestartet.

Blotting - Proteintransfer. Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel aus der Apparatur genommen und bis zur Verwendung in 1x Transferpuffer (siehe Tabelle 2.11) gelagert. Für das *Blotting* diente eine *Wet-Blot*-Apparatur. Der Aufbau des *Wet-Blots* erfolgte nach dem sogenannten *Sandwich*-Prinzip (Towbin *et al.*, 1989). Je Gel werden dafür sechs *Whatman*-Papiere in 1x Transferpuffer eingeweicht. Die hier verwendete PVDF-Immobilon-FL-Membran wurde für etwa 15 Sekunden in Methanol aktiviert, anschließend in ddH₂O hydrophilisiert und bis zur Verwendung in 1x Transferpuffer aufbewahrt. Für den Aufbau des *Sandwichs* wurden zunächst drei *Whatman*-Papiere auf die Seite des Anodengitters der Blotkassette gelegt. Es folgten nacheinander die aktivierte Membran, das Proteingel sowie drei weitere *Whatman*-Papiere. Während des Aufbaus war darauf zu achten, dass alle Materialien stetig nass blieben. Um während des Blotvorgangs blasenfreie Bedingungen zu schaffen, wurde das *Sandwich* vor dem Verschließen der Blotkassette mittels einer serologischen Pipette glatt gerollt. Die verriegelte Blotkassette wurde nun unter Beachtung der Polung in den mit kaltem 1x Transferpuffer aufgefüllten Blottank eingesetzt. Der Transfer wurde bei 300 bis 350 mA für zwei Stunden gestartet. Da sich das System aufgrund der hohen Stromstärke schnell erwärmte, wurde die Apparatur durch einen sich im Blottank befindlichen Kühlakku gekühlt. Zudem war die vollständige Apparatur für die Dauer des Blottens kontinuierlich auf Eis gebettet.

Blocking und Antikörperapplikation. Das *Blocking* dient der Maskierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Die Membran wurde nach Entnahme aus dem Blottank kurz in Waschpuffer (siehe Tabelle 2.11) gewaschen. Anschließend wurde diese in einer sogenannten *Blocking*-Pufferlösung, bestehend aus 5% Magermilchpulver gelöst in 1x PBS 0,1% TWEEN 20, für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Unter Zugabe des in *Blocking*-Puffer 1:250 bis 1:2000 verdünnten Primärantikörpers wurde die Membran in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler, zur besseren Verteilung des Antikörpers, geschwenkt. β -Aktin und α -Tubulin dienten als Ladekontrollen.

Scanning - Detektion der Proteine. Nach Inkubation des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal für etwa 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die anschließende Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte ebenso wie beim Primärantikörper unter Einschluss der Membran in einer Folie auf einem Wippschüttler. Aufgrund seiner Fluoreszenzmarkierung wurde der Sekundärantikörper im Dunkeln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Sekundärantikörpers und dreimaligem Waschen konnte die Membran nun mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imaging Systems* bei 700 bzw. 800 nm eingescannt werden.

3.2.5 Chromatin-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist es möglich, die Bindung bestimmter Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, an bekannte Sequenzen zellulären Chromatins zu analysieren.

Probenvorbereitung. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden 1×10^6 Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit Hydroxyurea, wie unter 3.1.4 beschrieben, behandelt. Die Negativkontrolle blieb für diese 24 Stunden unbehandelt und wird als Nullstundenwert beschrieben. Durch die anschließende fünfminütige Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (Endkonzentration: 1%) bei Raumtemperatur kommt es zu einer kovalenten Bindung

zwischen Proteinen und DNA (*cross-linking*). Die Zugabe von Glycin (finale Konzentration 125 mM) mit einer anschließenden drei bis fünfminütigen Inkubationszeit stoppte die Reaktion. Das Medium wurde abgesaugt, die fixierten Zellen 1x mit kaltem PBS gewaschen, um sie dann in einem Volumen von 600 µl kaltem PBS mit einem Zellschaber auf Eis abzukratzen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zu überführen. Die Zellen wurden bei 1.600 rpm und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 600 µl L1-Puffer (siehe Tabelle 2.11) unter Zugabe von Phosphatase- und Protease-Inhibitoren aufgenommen, resuspendiert und dreimal mit Hilfe einer 1 ml Spritze (Kanüle Größe 25) auf- und abgezogen, um die Zellkerne zu isolieren. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4°C wurde das Zellkern-Pellet in 200 µl L2-Puffer (+ Phosphatase- und Protease-Inhibitoren) aufgenommen und sehr gut resuspendiert.

Sonifizierung. Um DNA-Fragmente von etwa 500 bp zu erhalten, wurden die Kerne in einem Bioruptur-Ultraschallwasserbad (Diagenode s.a. BELGIUM EUROPE) sonifiziert. Das Wasserbad wurde nach Herstellerangaben mit gekühltem Wasser befüllt, die 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit den Kernlysaten in den Dreheinsatz des Gerätes gesteckt. Die Sonifizierung erfolgte in einem sich dreimal wiederholenden Intervall. Nach einer 15-sekündigen Sonifizierung folgte stets eine Pause für 30 Sekunden. Nach Aufschluss der Kerne wurden die Proben für 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert, dann der Überstand von jeweils drei Proben gleicher Behandlung in einem frischen 1,5 ml-Reaktionsgefäß gepoolt (finales Volumen: 600 µl).

Messung der DNA-Konzentration. Für die Weiterverarbeitung wurden die Proben 1:20 mit ddH₂O verdünnt und die Konzentration des Chromatins im NanoDrop-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für den Leerwert wurde das entsprechende Volumen L2-Puffer 1:20 mit ddH₂O verdünnt. Nach der Messung wurden die sogenannten IP-Proben auf eine Konzentration von 50 bis 100 µg in einem finalen Volumen von 500 µl Dilutionspuffer (siehe Tabelle 2.11) eingestellt, die *Input*-Proben auf eine Konzentration von 8 bis 10 µg in einem Endvolumen von 550 µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zugabe und Bindung des Antikörpers. Um unspezifische Bindungen zu vermindern, wurden 120 µl eines aus 80 µl Agarose A und 40 µl Dilutionspuffer bestehenden Gemisches zu den IP-Proben gegeben und einmal resuspendiert, bevor sie dann bei 4°C für 2 bis 4 Stunden auf dem Überkopfschüttler inkubiert wurden. Anschließend wurden die IP-Proben eine Minute bei 800 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand (500 µl) in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Pro Ansatz wurden nun 3 bis 5 µg Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Während dieser Inkubationszeit banden die Antikörper an die von den DNA-Fragmenten gebundenen Proteine. Durch die anschließende Zugabe von 120 µl Agarose A zu jeder Probe banden nun die Antikörper während einer weiteren vierstündigen Inkubation bei 4°C auf dem Überkopfschüttler an die Agarose-*Beads*. Die *Beads* wurden anschließend für eine Minute bei 800 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und sequentiell jeweils dreimal mit 700 µl Hochsalz-Puffer, LiCl-Puffer und Niedrigsalz-Puffer (siehe Tabelle 2.11) gewaschen. Dazu wurde der entsprechende Puffer der Probe zugegeben, die Reaktionsgefäße drei Minuten bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, bei 800 rpm und 4°C für eine Minute zentrifugiert und der jeweilige Überstand verworfen.

Elution der DNA und Entfernung der fixierten Proteine. Die *Beads* wurden nach dem letzten Waschschrift in 300 µl Elutionspuffer (siehe Tabelle 2.6) aufgenommen, kurz gevortext und für 15 Minuten bei 65°C im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben für zwei Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert, 250 µl des Überstandes wurden in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Zu den *Beads* wurden erneut 250 µl Elutionspuffer gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 65°C im Thermoschüttler wurden diese erneut für zwei Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert und 300 µl des Überstandes dem ersten Eluat zugeführt. Die IP- und Input-Proben wurden schließlich mit 30 µl 5 M NaCl versetzt und über Nacht bei 65°C im Thermoschüttler inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2 µl Proteinase K und einer zweistündigen Inkubation bei 45°C im Thermoschüttler wurden die fixierten Proteine vom Chromatin entfernt.

Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Fällung. Für die DNA-Extraktion wurden die Proben im Anschluss kurz anzentrifugiert und in ein *Phase-Lock-Gel*-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Phenol/Chloroform und leichtem Vermischen wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. 530 µl der oberen Phase wurden in ein neues *Phase-Lock-Gel*-Reaktionsgefäß überführt, 530 µl Chloroform beigefügt und durch leichtes Schütteln miteinander vermischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurden 470 µl der oberen Phase in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung wurden die Proben mit 47 µl 3 M Natriumacetat versetzt und mit kaltem 100%igem Ethanol auf ein Volumen von etwa 1 ml aufgefüllt und vermischt. Als *Tracer* wurden 2 µl tRNA hinzugefügt, und die Proben wurden für mindestens 30 Minuten bei -20°C gelagert. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen, dieser mit kaltem 70%igem Ethanol versetzt und nochmals für eine Stunde bei 13.200 rpm und 4°C zentrifugiert, bevor das Pellet kurz an der Luft getrocknet wurde. Daraufhin wurde das Pellet der IP-Proben in 50 µl, das Pellet der Input-Proben in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarosegel. Die Quantifizierung der zu untersuchenden Chromatinbereiche erfolgte mittels semiquantitativer PCR. Hierfür wurde ein PCR-Ansatz, bestehend aus 25 µl *REDTaq Ready-Mix*, je 1 µl Oligonukleotid *forward* und *reverse* und 1 µl Input-DNA bzw. 5 µl IP-DNA verwendet, der jeweils mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt wurde. Die eingesetzten Oligonukleotide umfassten die zu untersuchende Promotorregion. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt, wobei die Temperatur für die Hybridisierung immer an die entsprechenden Oligonukleotid-Paare angepasst wurde:

Tabelle 3.3: PCR-Bedingungen für ChIP.

	95°C	3'	
Denaturierung	95°C	45''	
	62°C <i>FASL</i>		
Hybridisierung	55°C <i>MnSOD</i>	45''	34 – 38 Zyklen
	60°C <i>GAPDH</i>		
Elongation	72°C	1' 30''	
	72°C	10'	
	12°C	∞	

Anschließend wurden 30 µl der Input- und 40 µl der IP-Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen und bei 100 V für eineinhalb bis zwei Stunden aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden durch das Geldokumentationssystem *Gel Doc XR+* visualisiert.

3.2.6 Agarosegele

Agarosegele dienen der Auftrennung von PCR-Produkten und der Qualitätskontrolle von isolierter RNA. Abhängig von der Bandengröße wurden 1 bis 1,5%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in einem 800 ml Becherglas abgewogen, mit 400 ml 1x TAE-Puffer (siehe Tabelle 2.11) aufgefüllt und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach 20-minütiger Abkühlung auf dem Rührer wurden 20 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in einem mit Probekämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit etwa 1,5 l 1x TAE-Puffer unter Zugabe von 200 bis 400 µl Ethidiumbromid befüllt. Das auspolymerisierte Gel wurde schließlich in die Gelelektrophoresekammer überführt, mit DNA-Marker und Proben befüllt und bei 80 bis 120 Volt für 45 bis 120 min laufen lassen. Mit Hilfe des Geldokumentationssystems *Gel Doc XR+* wurden die Banden sichtbar gemacht.

3.2.7 Quantitative Echtzeit-PCR (*qRT-PCR*)

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Amplifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren und basiert auf dem Prinzip der Reversen Transkription (RT) mit folgender Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sie dient dem Nachweis einer spezifischen mRNA. Die genaueste Form der mRNA-Quantifizierung ist bis dato die Effizienz-korrigierende relative Quantifizierung. Hierbei wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes Referenzgen bezogen (Pfaffl, 2001).

RNA-Extraktion. Für die Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurde zunächst RNA isoliert. Die Isolation der RNA fand mittels *QIAshredder*-Säulchen und *RNeasy Mini*-Kit nach Angaben des Herstellers statt. Dementsprechend wurden alle Zentrifugationsschritte bei 20 bis 25°C durchgeführt. Dafür wurden Zellen in 10 cm-Schalen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 80% konfluent waren. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 1x Waschen mit sterilem PBS und Zugabe von 600 µl mit 6 µl β-Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer durch Abkratzen mit einem Zellschaber auf Eis. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml RNase-freies Biopur-Reaktionsgefäß überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren, bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert oder nach kurzem Auftauen über ein *QIAshredder*-Säulchen für zwei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, das Säulchen anschließend verworfen. Durch Zugabe und Auf- und Abpipettieren von 1 Volumen (600 µl) 70%igem RNase-freiem Ethanol wurde das Lysat homogenisiert und 700 µl über ein *RNeasy Mini*-Säulchen bei ≥ 10.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Die RNA bindet hierbei an die Membran des *RNeasy*-Säulchens. Bei hohem Volumen (1200 µl) wurde dieser Schritt einmal wiederholt. Durch die Inkubation eines DNase Inkubations-Mix aus 10 µl DNase I Stock-Lösung und 70 µl RDD-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNA zerstört und die Reste durch Zugabe von 350 µl RW1-

Puffer und Zentrifugation bei ≥ 10.000 rpm für 30 Sekunden aus der Membran eluiert. Das RNeasy-Säulchen wurde in ein frisches 2 ml RNase-freies Reaktionsgefäß gestellt. Die RNA in der Membran wurde vor der Elution 2x mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation ohne Puffer, wurde das RNeasy-Säulchen in ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 μ l RNase-freies ddH₂O mittig auf die Membran pipettiert. Schließlich wurde nach einer einminütigen Inkubation die RNA durch Zentrifugation bei einer Minute und maximaler Geschwindigkeit eluiert. Die RNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

cDNA-Synthese. Vor der cDNA-Synthese wurde die Konzentration der isolierten RNA im NanoDrop-Spektrophotometer gemessen und durch Zugabe von 30,75 μ l MasterMix und PCR-Wasser auf eine Endkonzentration von 20 ng/ μ l in einem 50 μ l Ansatz eingestellt. Der MasterMix setzte sich für einen Ansatz aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 3.4: Reaktionsmix und Synthese-Bedingungen.

Komponente	Volumen für 1x Ansatz	Synthese-Bedingungen (PCR-Cycler)
10x Puffer	5 μ l	
MgCl ₂	11 μ l	25°C 10'
dNTP-Mix	10 μ l	48°C 60'
<i>random hexamers</i>	2,5 μ l	95°C 5'
RNase Inhibitor	1 μ l	4°C ∞
<i>MultiScribe</i> RT (50 U/ μ l)	1,25 μ l	
	30,75 μ l	

Nach zügiger Zugabe der reversen Transkriptase *MultiScribe* wurde der Ansatz in einen PCR-Cycler gestellt und die cDNA unter den oben angegebenen Bedingungen synthetisiert; anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Design der Primer und Ermittlung der PCR-Effizienz. Die Sequenzen der für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten *Primer* für die Gene *IL-1 β* , *IL-6* und *TNF α* wurden aus der Publikation Scheibel *et al.*, 2010 entnommen. Die *Primer* für das *IkB β* -Gen wurden mit Hilfe des *Primer designing tools* unter www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ entworfen. Dabei war darauf zu achten, dass die *Primer* die Exons 4 oder 5 des *IkB β* -Gens umfassten, da diese in der *IkB β Knockout-Maus* deletiert sind. Um unspezifische Reaktionen mit genomischer DNA zu vermeiden, sollten die Oligonukleotide in unterschiedlichen Exons des Gens liegen, die durch ein Intron von mehr als 1000 bp getrennt sind. Die Länge des PCR-Produktes sollte 90-150 bp betragen und eine Schmelztemperatur von ca. 60°C aufweisen.

Vor dem Pipettieren der quantitativen Echtzeit-PCR wurde die PCR-Effizienz des einzusetzenden Primers getestet, wodurch auch die Spezifität des Primers bestimmt werden konnte. Hierfür wurde eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen aus einer 20 ng/ μ l Stockkonzentration der synthetisierten cDNA erstellt (siehe Tabelle 3.5). Aus der Steigung dieser Standardkurve (m) wurde die Effizienz E errechnet: $E = 10^{-1/m}$ (Pfaffl *et al.*, 2004)

Eine Steigung von z.B. $m = -3,678$ hätte somit eine Effizienz von 1,87. Eine optimale Effizienz wird erzielt, wenn sich die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt, $E=2$ (100%) (Wiedemann *et al.*, 2004). Die PCR-Effizienz der verwendeten *Primer* sollte im Bereich der PCR-Effizienz der *Primer* für das Referenzgen liegen und nicht $\geq 5\%$ davon abweichen (Pfaffl *et al.*, 2004).

Durchführung der qRT-PCR nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. In einer 96-well-Reaktionsplatte wurden pro well 20 μl SYBR Green I-Mastermix (siehe oben) entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben vorgelegt. Im Duplett bzw. im Triplet wurden jeweils 5 μl der zuvor 1:5 in TE-Puffer (siehe Tabelle 2.11) verdünnten cDNA pipettiert, so dass die finale cDNA-Konzentration 20 ng/ μl pro well war. Die Platte wurde daraufhin in das Echtzeit-PCR-System *StepOnePlus* gestellt und die qRT-PCR gestartet. Während eines PCR-Zyklus wird zunächst bei zunehmender Temperatur (50°C \rightarrow 95°C) der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen und in zwei einzelsträngige Moleküle denaturiert.

Tabelle 3.5: Verdünnungen der cDNA.

Verdünnungen	cDNA-Konzentrationen		Power SYBR® Green I- Mastermix	
I	100 ng	20 ng/ μl		
II	20 ng	4 ng/ μl	2x SYBR MM Puffer	12,5 μl
III	4 ng	0,8 ng/ μl	Oligonukleotid <i>forward</i>	0,25 μl
IV	0,8 ng	0,16 ng/ μl	Oligonukleotid <i>reverse</i>	0,25 μl
V	0,16 ng	0,032 ng/ μl	PCR-Wasser	7 μl
VI	0,032 ng	0,0064 ng/ μl		20 μl
VII	0,0064 ng	0,000128 ng/ μl		

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I interkaliert nun in die neugebildeten doppelsträngigen DNA-Fragmente, wodurch das Fluoreszenzsignal steigt. Die während eines PCR-Zyklus erfassten Fluoreszenz-Messungen spiegeln die Menge der neu entstandenen DNA wider. Die DNA-Menge kann daher annähernd durch die Höhe der Schmelzkurven-*Peaks* bestimmt werden. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der sogenannten $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Pfaffl *et al.*, 2004). Bei dieser Form der Analyse wird die Expression eines zu untersuchenden Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten Gens (*housekeeping gene*) bezogen und aus den ΔCt -Werten beider Gruppen der $\Delta\Delta Ct$ -Wert gebildet. Durch Einsetzen des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wird der Expressionsunterschied ermittelt:

$$\begin{aligned} \Delta Ct &= Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{Gewebe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrollgewebe}} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \end{aligned}$$

Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt hier den PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig über die Hintergrundstrahlung tritt. Je kleiner der Ct-Wert ausfällt, desto höher ist die Ausgangskonzentration der DNA in den untersuchten Proben.

3.2.8 Transkriptomanalyse mittels *Microarray*

Durch einen *Microarray* erhält man ein Transkriptomprofil der in Zellen oder Gewebe exprimierten Gene.

Für die Durchführung eines *Microarrays* wurde zunächst die RNA aus Zellen muriner Pankreastumore isoliert (siehe 3.2.7; RNA-Extraktion). Durch eine vorangegangene Qualitätskontrolle der isolierten RNA mittels eines 1%igen Agarosegels wurde die isolierte RNA nach der Extraktion auf Degradation überprüft. Nach der Auftrennung im Gel muss eine deutliche Unterscheidung zwischen der 28s-rRNA und der 18s-rRNA möglich sein.

Für die Aufbereitung der Proben wurden zunächst die Konzentrationen der RNA mittels NanDrop-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Für die weitere Durchführung wurde eine RNA-Konzentration von 250 ng eingesetzt. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls für *Affymetrix® GeneChip® Whole Transcript (WT) Expression Assays* von *Applied Biosystems* durchgeführt. Zusammengefasst wurde durch *in vitro* Transkription, zunächst über die Synthese einer doppelsträngigen cDNA, einzelsträngige cRNA hergestellt. Die durch anschließende Zugabe eines cRNA-binding Mix synthetisierte, aufgereinigte cRNA diente als Matrize für die reverse Transkription eines neuen cDNA-Einzelstranges. Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der cDNA wurde diese nach Protokoll des Herstellers (*Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kits*) fragmentiert und mit Biotin markiert. Die Hybridisierung der fragmentierten, Biotin-markierten cDNA auf die entsprechenden *Affymetrix® GeneChip® 1.1 ST Probe Arrays* sowie die Detektion wurden freundlicherweise durch die *Affymetrix Core Facility* des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die am BMFZ ausgelesenen Expressionsrohdaten zur Analyse des murinen Pankreaskarzinomgewebes und der murinen Pankreaskarzinomzellen wurden durch Dr. Matthias Wirth (Klinikum rechts der Isar, München) mit dem Programm Expression Console 1.2.1.20 (*Affymetrix*) unter Verwendung des RMA (*robust multi-array analysis*) Algorithmus normalisiert.

3.3 *In vivo*-Methoden

3.3.1 Haltung der Mäuse

Alle Mäuse wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern gehalten und gezüchtet. Alle Mäusarbeiten im ZPF wurden unter Sterilbänken durchgeführt.

3.3.2 Mauslinien

Zur Untersuchung von Genfunktionen *in vivo* werden verschiedene Mausmodelle verwendet. Hierbei wird zwischen transgenen Modellen (Einbringen von Fremd-DNA in den Pronukleus) und Modellen mit

genetischem Targeting (*Knockin/Knockout* (gezielte Veränderung eines Gens durch Manipulation embryonaler Stammzellen)) unterschieden.

Für die Analyse der Genfunktionen wurde hier das sogenannte *Cre/loxP*-System verwendet. Mit Hilfe dieses Systems kann die Funktion eines spezifischen Gens gewebsspezifisch modifiziert werden. Hierbei wird ein gezielter DNA-Abschnitt durch Einbringen von *loxP*-Stellen flankiert. Die Erkennung und Bindung dieser *loxP*-Stellen durch eine *Cre*-Rekombinase ermöglicht das Ausschneiden der entsprechenden DNA-Sequenz. Ebenso ist die Untersuchung der Expression von mutierten Allelen möglich. Dazu wird 5' des mutierten Gens ein transkriptionelles Stop-Element durch *loxP*-Stellen flankiert (*loxP*-Stop-*loxP*) (Hingorani *et al.*, 2003). Durch die Verkreuzung *Cre*-Rekombinase exprimierender Mäuse wird bei den Nachkommen die Stopkassette, welche aus dem 3'-Ende des *HIS3*-Gens der Hefe, einer SV40-Polyadenylierungssequenz, einem Translations-Initiationscodon und einer 5'-Spleiß-Donorstelle besteht (Dragatsis & Zeitlin, 2001), ausgeschnitten und das mutierte Allel exprimiert.

***Nfkbib*^{ΔΔ} (Scheibel *et al.*, 2010)**

Diese *Knockout*-Mauslinie wurde in der Gruppe von Prof. Dr. Roland Schmid (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) generiert. Unter Einsatz der *Cre*-Rekombinase wurden hierbei die Exons 4 und 5 des *Nfkbib*-Gens, welche für die Ankyrin *repeats* 4 - 6 kodieren, deletiert. Durch diese Deletion wurde ein konventioneller *knockout* für das *NFKBIB*-Gen erzielt (Scheibel *et al.*, 2010).

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

Diese *Knockin*-Mauslinie wurde von Dr. Hassan Nakhai (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die *Cre*-Rekombinase wurde hier unter die Kontrolle des *Ptf1a* (*pancreas specific transcription factor 1a*)-Promotors gebracht. In frühen Stadien der Pankreasentwicklung (E9.5) wird der bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Transkriptionsfaktor *Ptf1a* in pankreatischen Vorläuferzellen, in exokrinen und endokrinen Zellen des Pankreas (Kawaguchi *et al.*, 2002) sowie in Neuronen der Retina und im Cerebellum (Nakhai *et al.*, 2007) exprimiert. In ausgewachsenen Mäusen ist die Expression von *Ptf1a* auf azinäre Zellen im Pankreas beschränkt (Hingorani *et al.*, 2003).

***Pdx1-Cre* (Hingorani *et al.*, 2003)**

Diese transgene Mauslinie wurde von Dr. Andrew Lowy (University of California, San Diego, CA, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hier wurde die *Cre*-Rekombinase unter die Kontrolle des *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*)-Promotors gebracht. In jungen Mäusen wird der Transkriptionsfaktor *Pdx1* in pankreatischen Vorläuferzellen exprimiert und spielt daher bereits in frühen Stadien der Pankreasentwicklung eine essentielle Rolle (Hingorani *et al.*, 2003). Die *Pdx1*-Expression in erwachsenen Mäusen ist zumeist auf Insulin-produzierende pankreatische β -Zellen beschränkt (Milewski *et al.*, 1998).

LSL-Kras^{G12D/+} (Jackson et al., 2001, Hingorani et al., 2003)

Diese *Knockin*-Mauslinie wurde von Tyler Jacks, Ph.D. (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde das *loxP*-Stop-*loxP*-Konstrukt 5' vor das zuvor genetisch veränderte *Kras*-Allel (Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 12 des ersten kodierenden Exons) kloniert. Diese genetische Veränderung spiegelt eine häufig im humanen Pankreaskarzinom vorkommende Mutation wider. Durch die Deletion der Stopkassette und die damit einhergehende Expression des mutierten *Kras*^{G12D}-Gens erfolgt eine konstitutive Aktivierung des Ras-Signalweges (Hingorani et al., 2003).

LSL-Trp53^{R172H/+} (Olive et al., 2004, Hingorani et al., 2005)

Diese *Knockin*-Mauslinie wurde von Tyler Jacks, Ph.D. (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Auch hier wurde das *loxP*-Stop-*loxP*-Konstrukt 5' vor das zuvor genetisch veränderte *Trp53*-Allel (Arginin zu Histidin im Kodon 172) kloniert. Diese Mutation ist das murine Äquivalent zur Mutation R175H, welches häufig in spontanen humanen Tumoren sowie in Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom auftritt (Olive et al., 2004). Die Expression des Onkogens wird ebenfalls durch die Cre-vermittelte Deletion der Stopkassette gestartet.

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

Diese *Knockin*-Mauslinie wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Saur (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) generiert und kennzeichnet sich durch die bicistronische Expression des endogen nur von Geflügelzellen exprimierten *tumor virus A* (*Tva*)-Rezeptors und nuklearem LacZ (β -Galaktosidase) unter dem ubiquitären *Rosa26*-Promotor. Die Expression des *Tva*-Rezeptors in Zellen dieser Mäuse erlaubt die Infektion mit dem *replication-competent avian sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with splice acceptor* (RCAS)-Vektor. Auswirkungen des Allels auf die Tumorprogression des Pankreas oder das Überleben der Mäuse sind bisher nicht bekannt (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Dieter Saur).

Tabelle 3.6: Nomenklatur der Mauslinien.

Genotypen
<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}
<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+}
<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}
<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+}
<i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+}
<i>Nfkbib</i> ^{Δ/Δ} ; <i>Pdx1-Cre</i> ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/+}

3.3.3 Kreuzen und Genotypisierung der Mauslinien

Für die *in vivo* Untersuchung der Rolle und Funktion des *Nfkbib*-Gens im Pankreaskarzinom wurden die entsprechenden Mauslinien im ZPF miteinander gekreuzt. Ziel war es, folgende Genotypen zu

generieren: *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*, *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* sowie die entsprechenden Kontrollmäuse ohne den *Knockout* für *Nfkbib* (*Nfkbib^{+/+}*).

Drei Wochen nach Geburt wurden die Nachkommen einer Verpaarung genotypisiert. Dazu wurden die Mäuse kurz mit Isofluran betäubt und durch eine spezielle Zange an den Ohren numerisch markiert. Mit Hilfe eines sterilen Skalpell wurde eine kleine Mausschwanzspitze (0,2 - 0,5 cm) abgetrennt, die Blutung durch einen Ätztift gestillt. Anschließend wurde unter Zugabe von 50 µl PCR-Lysepuffer und Proteinase K (im Verhältnis 1:50 verdünnt) (siehe Tabelle 2.11) die Schwanzbiopsien in einem PCR-Cycler (90 min bei 55°C, 15 min bei 95°C) lysiert. Nach der Inkubation wurden die Proben kurz gevortext und für zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. 40 µl des Überstandes, der die DNA enthielt, wurden in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die DNA wurde direkt für die Genotypisierungs-PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für die Genotypisierung-PCR wurde ein MasterMix mit einem Volumen von 24 µl angesetzt, die Zugabe von 1 µl DNA erfolgte kurz vor dem Start der PCR im Cycler. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.6). Anhand der Bandengrößen wurden die entsprechenden Genotypen identifiziert.

Neben der Genotypisierung wurde auch die effiziente Rekombination des konditionalen *Kras^{G12D}*-Allels im Pankreas in *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- bzw. *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mittels PCR aus isolierter Pankreasgewebs-DNA nachgewiesen.

Tabelle 3.7: PCR-Reaktionsansätze und ihre Bedingungen.

Genotyp	Ansatz	1x	PCR-Bedingungen	Größe der Banden
<i>Nfkbib</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	IkBβ - I5	1 µl	95°C 1'	
	IkBβ - E2	1 µl	95°C 15"	450 bp (WT)
	IkBβ - E5	0,8 µl	60°C 30"	
	H ₂ O	11,2 µl	72°C 1'	
	<i>DNA</i>	1 µl		
<i>Ptf1a^{Cre}</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	p48-Cre-GT-LP-URP	1,14 µl	95°C 3'	
	p48-Cre-GT-wt-UP	0,9 µl	95°C 45"	600 bp (WT)
	p48-Cre-GT-mut-UP-neu	0,3 µl	60°C 1'	
	H ₂ O	11,66 µl	72°C 1' 30"	
	<i>DNA</i>	1 µl		
<i>Pdx1-Cre</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	Cre-neu-UP	0,72 µl	95°C 3'	
	Cre-neu-LP	0,72 µl	95°C 45"	390 bp (Cre)
	Gabra1-UP	0,72 µl	58°C 45"	
	Gabra1-LP	0,72 µl	72°C 1'	
	H ₂ O	11,12 µl		
<i>DNA</i>	1µl			

Genotyp	Ansatz	1x	PCR-Bedingungen	Größe der Banden
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	Kras-WT-UP1	0,9 µl	95°C 3'	
	Kras-URP-LP1	1,08 µl	95°C 15''	x 40 270 bp (WT) 170 bp (Mut)
	Kras ^{G12D} mut-UP	0,36 µl	60°C 30''	
	H ₂ O	11,66 µl	72°C 1'	
	<i>DNA</i>	1 µl		
<i>LSL-Trp^{R172H}</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	Trp53 ^{R172H} -WT-UP2	0,72 µl	95°C 3'	
	Trp53 ^{R172H} -URP-LP	0,96 µl	95°C 45''	x 40 570 bp (WT) 270 bp (Mut)
	Trp53 ^{R172H} mut-UP4	0,48 µl	60°C 1'	
	H ₂ O	11,84 µl	72°C 1' 30''	
	<i>DNA</i>	1 µl		
<i>LSL-R26^{TVA-JacZ}</i>	<i>RedTaq Ready Mix</i>	10 µl		
	R26-Tva-GT-UP	0,36 µl	95°C 3'	
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	0,24 µl	95°C 45''	x 40 600 bp (WT) 310 bp (Mut)
	R26-Tva-GT-WT-LP	0,6 µl	62°C 1'	
	H ₂ O	12,8 µl	72°C 1' 30''	
	<i>DNA</i>	1 µl		

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

3.3.4 Töten der Mäuse und Organentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte in einer Betäubungskammer unter Zugabe von Isofluran, gefolgt von einer zervikalen Dislokation. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 80%igem Ethanol wurden durch Öffnen der Bauchdecke die Organe entnommen, gewogen, vermessen und in PBS gewaschen. Vor Entsorgung des Kadavers wurde von jeder Maus eine kleine Mausschwanzbiopsie für die Re-Genotypisierung entnommen. Die isolierten Organe wurden für 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C fixiert, nach Entfernung des PFA in einer sogenannten Gewebe-Infiltrationsmaschine über Nacht entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet.

3.3.5 Isolation von Primärzellen aus Pankreastumoren

Für die Isolation von primären Tumorzellen wurde ein kleines, solides Stück (etwa 0,5 x 0,5 cm) von dem Pankreastumor abgetrennt und in einer 10 cm-Schale mit sterilem PBS gewaschen. Diese Schale wurde verschlossen unter die Sterilbank transferiert, das Gewebestück mit Hilfe zweier steriler Skalpelle zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden in 200 U/ml Collagenase-haltigem 10% FCS-Medium aufgenommen, in ein 50 ml-Falcon überführt und für 48 Stunden in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der

Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml vorgewärmtem 10% FCS-Medium resuspendiert, in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und in einem 37°C-Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 bis 90% erreicht hatten, wurden sie in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Passage drei bis fünf weiter umgesetzt, um sie dann bis zur Verwendung einzufrieren (siehe 3.1.2).

3.3.6 Isolation von RNA aus Pankreasgewebe

Für die Isolation von RNA aus Pankreasgewebe, wurde aus dem Tumor ein kleines Stück (0,3 x 0,3 cm) solides Gewebe abgeschnitten und in einem 5 ml-Falcon, welches 1200 µl RLT-Puffer versetzt mit 12 µl β-Mercaptoethanol enthielt, homogenisiert. Nach Aufteilung der Suspension in zwei 1,5 ml RNase-freien Reaktionsgefäßen, wurden diese in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung bzw. Extraktion (siehe 3.2.7; RNA-Extraktion) aufbewahrt.

3.3.7 Mikrotomschnitte von Organen

Aus dem erhärteten Paraffinblock des zu untersuchenden Organs (Pankreas) wurden mittels des Mikrotoms HM355S Paraffinschnitte hergestellt. Vor dem Schneiden wurde der Block etwa 30 Minuten bei -20°C gekühlt. Für die Anfertigung serieller Gewebeschnitte mit einer Dicke von 2,5 µm wurde der gekühlte Block in das Mikrotom eingespannt. Nach vorsichtiger Überführung in ein etwa 50°C warmes Wasserbad wurden die Schnitte geglättet. Durch Hineintauchen eines Objektträgers wurden die Gewebeschnitte schließlich auf diesen fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.8 H&E-Färbung

Die Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung ist ein Färbeverfahren in der Histologie, das verwendet wird, um verschiedene Gewebestrukturen innerhalb eines Paraffinschnittes mikroskopisch unterscheiden zu können. Der in Hämatoxylin enthaltene Farbstoff Hämalaun färbt saure Strukturen wie DNA bzw. Zellkerne blau an, während Eosin basische Strukturen wie Proteine des Zytoplasmas rot anfärbt (Fischer *et al.*, 2008).

Die zu färbenden, getrockneten Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal für fünf Minuten in Roti-Histol deparaffiniert, anschließend rehydriert. Dazu wurden die Schnitte zweimal für jeweils eine Minute in eine absteigende Alkoholreihe (100% → 96% → 80%) getaucht, in ddH₂O gewaschen und für drei Minuten in Hämatoxylin inkubiert. Nach einer etwa 10-minütigen Spülung mit Leitungswasser, wurden die Schnitte für zwei Minuten mit Eosin gegengefärbt, zweimal in ddH₂O gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80% → 96% → 100%) dehydriert und für die Entfernung aller Paraffinreste noch mal zweimal für fünf Minuten in Roti-Histol inkubiert. Nach kurzem Antrocknen der Schnitte wurden diese mittels Zugabe eines Tropfens Pertex mit Deckgläßchen eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

3.3.9 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem z.B. in Gewebe exprimierte Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Für die Immunhistochemie wurden die Paraffinschnitte ebenso wie für die H&E-Färbung deparaffiniert und rehydriert. Danach erfolgte die antikörperspezifische Demaskierung der Antigene (siehe Tabelle 3.3.9), um die Immunreaktivität der in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebe wieder herzustellen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Schnitte nach jedem Schritt bzw. jeder Inkubation dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Reaktionen und Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurde nun die endogene Peroxidase blockiert. Dazu wurde eine 3%ige H₂O₂-Lösung auf die Schnitte gegeben und für 10 bis 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine einstündige Inkubation einer 5%igen Serumblocklösung, die zusätzlich mit vier Tropfen einer Avidin-Lösung supplementiert wurde, bei Raumtemperatur. Geblockt wurde mit dem Serum der Spezies in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Nach Blockung der unspezifischen Antigene wurde die Primärantikörper-Lösung, bestehend aus einer 5%igen Serumblocklösung, vier Tropfen einer Biotin-Lösung und Primärantikörper angesetzt. Pro Gewebeschnitt wurden etwa 200 µl dieser Primärantikörper-Lösung verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der in Serumblocklösung verdünnte Biotin-markierte Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 3.8: Verwendete Antikörper und ihre Gebrauchsbedingungen.

Antikörper	Antigendemaskierungslösung + Inkubationszeit	Serum	Verdünnung des 1. AK	Verdünnung des 2. AK
F4/80 (Makrophagen)	20 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 15 min bei RT	Hase	1:200	1:500

Nach 30 Minuten Inkubation wurde nach Herstellerangaben mittels *VECTASTAIN Elite ABC Kits* eine sogenannte ABC-Lösung (zwei Tropfen Reagenz A und zwei Tropfen Reagenz B in 5 ml PBS) angesetzt und für die verbleibenden 30 Minuten bei 4°C aufbewahrt. Die einzelnen Schnitte wurden nach Bindung des Sekundärantikörpers mit 200 µl/Schnitt einer ABC-Lösung für 30 Minuten inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl einer DAB-Lösung pro Schnitt. Hierfür wurden nach Herstellerangaben zwei Tropfen *buffer stock*, zwei Tropfen H₂O₂, vier Tropfen DAB aus dem *DAB Substrate for Peroxidase Kit* in 5 ml ddH₂O zusammengegeben und für zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit ddH₂O gewaschen und mit Hämatoxylin für ungefähr 10 Sekunden gegengefärbt. Wie bei der H&E-Färbung wurden die Schnitte schließlich in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert, mit Pertex eingedeckelt und getrocknet.

3.4 Statistische Analysen

Allgemeine Statistik. Alle Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten reproduziert. Die Zellkultur-Assays wurden zudem stets im Triplet durchgeföhrt. Abbildungen und statistische Analysen wurden durch das Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Die statistischen Signifikanzen wurde mit Hilfe des zweiseitigen unpaarigen Student's t-Tests bzw. der *One-way ANOVA (Analysis of variance)*-Analyse errechnet. Für die *One-way ANOVA*-Analyse wurde zusätzlich noch eine Bonferroni-Korrektur durchgeföhrt. Die statistischen Signifikanzen der Kaplan-Meier-Kurven wurden mit Hilfe des Log-Rang-Tests (*log rank test*) berechnet und in den Abbildungen angegeben. Entsprechende Tests und p-Werte sind in den Abbildungen angegeben ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Gene set enrichment analysis (GSEA). Um die Genexpressionsdaten aus einem mRNA-Expressionsprofil zu analysieren und interpretieren, wurde die sogenannte *Gene set enrichment analysis*-Methode herangezogen (Subramanian *et al.*, 2005). Die GSEA-Software wurde durch das *Broad Institute* bereitgestellt (<http://www.broadinstitute.org>, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). Die Gengruppen wurden aus der Datenbank *Molecular Signatures Database v3.1* bezogen. Folgende GSEA-Parameter wurden eingestellt: *permutation type*: gene set, *permutation number*: 1000, *metric for ranking genes*: Signal2Noise, *enrichment statistics*: weighted und *genes et size restrictions*: 15 min / 500 max.

Der *Enrichment Score* (ES) spiegelt wider, zu welchem Ausmaß eine Gengruppe am Anfang oder am Ende einer Gen-Rangliste überrepräsentiert ist und wird durch das Ablesen der Gen-Rangliste von oben nach unten kalkuliert. Wenn der Wert der Summe ansteigt, ist ein Gen aus der Gengruppe präsent, wenn der Wert absteigt, ist das Gen nicht präsent. Der ES gibt die maximale Abweichung vom Nullwert an. Ein positiver ES zeigt eine Anreicherung der entsprechenden Gengruppe an der Spitze der Gen-Rangliste, ein negativer ES weist auf eine Anreicherung der Gengruppe am Ende der Liste. Der normalisierte ES (NES) wird verwendet, um Analysenergebnisse entlang der Gengruppen zu vergleichen und wird ermittelt, indem der ES durch den Mittelwert der Permutationen aller Datensätze geteilt wird. Die statistische Signifikanz des ES einer Gengruppe wird durch die Verwendung des nominalen (NOM) p-Wertes bestimmt. Die Signifikanz kann jedoch durch verschiedene Testmöglichkeiten beeinflusst werden. Daher wird zusätzlich der FDR (*False Discovery Rate*) errechnet, der die geschätzte Wahrscheinlichkeit, dass eine Gengruppe mit einer ermittelten NES ein falsch positives Ergebnis darstellt, widerspiegelt (Benjamini & Hochberg, 1995). Der Grenzwert für einen signifikanten FDR q-Wert wurde auf $< 0,05$ und für einen signifikanten NOM p-Wert auf $< 0,05$ festgelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Wechselspiel zwischen stimuliertem NFκB und dem Tumorsuppressor p53

4.1.1 Murine p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber Doxorubicin und Etoposid

Um zu testen, ob p53-Mutanten einen *gain of function* in Pankreaskarzinomen hinsichtlich therapeutischer Resistenz übernehmen können, wurde der Einfluss der p53-Mutation, p53^{R172H}, welche zur humanen p53-Mutation p53^{R175H} analog ist, auf das therapeutische Ansprechen gegenüber Topoisomerase II-Inhibitoren untersucht.

Hierzu wurden murine Pankreaskarzinomzellen, welche die p53-Mutante p53^{R172H} exprimierten oder eine Deletion für p53 aufwiesen, mit DNA-schädigenden Substanzen wie den Topoisomerase II-Inhibitoren Doxorubicin oder Etoposid behandelt (Abbildung 4.1).

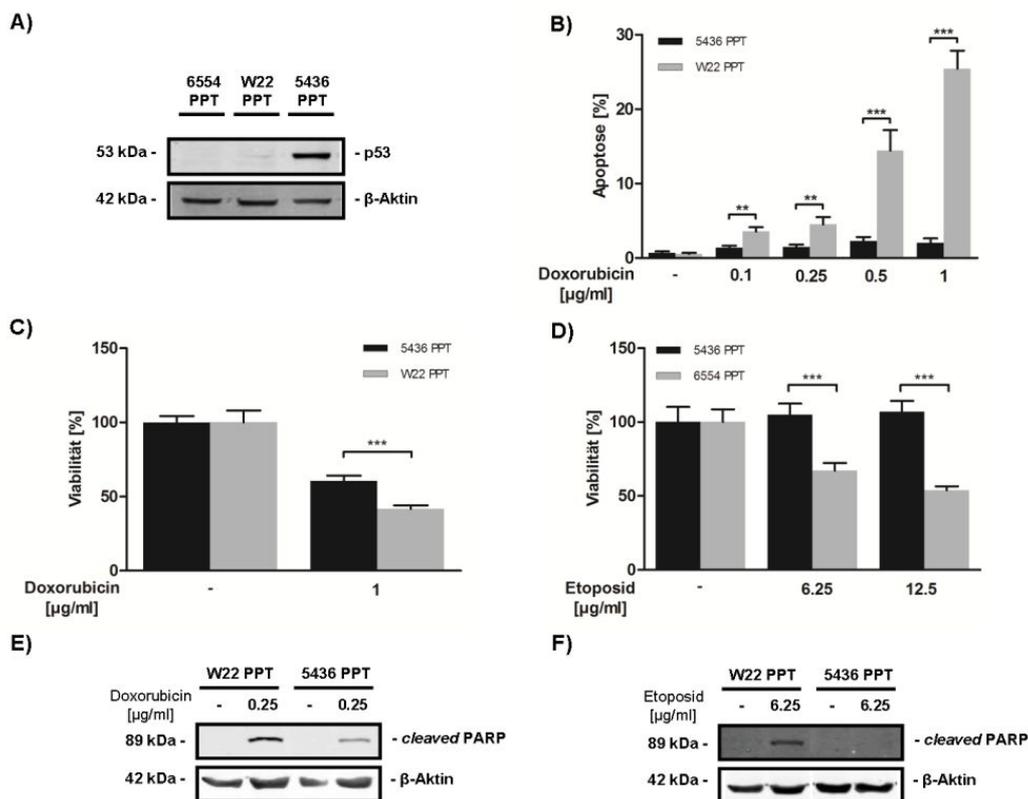


Abbildung 4.1: p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber Topoisomerase II-Inhibitoren als p53-defiziente Zellen.

A) Western Blot-Analyse des p53-Status der murinen Pankreaskarzinomzellen 6554 PPT, W22 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{loxP/loxP};*LSL-R26*^{Tva-LacZ/+}) und 5436 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/R172H};*LSL-R26*^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}). **B - C)** W22 PPT und 5436 PPT wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Doxorubicin behandelt. **B)** Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte nach Färbung mittels Hoechst-Farbstoffs durch Fluoreszenzmikroskopie. **C)** Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt. **D)** Bestimmung der Viabilität der 5436 PPT und 6554 PPT-Zellen nach 24 Stunden Etoposid-Behandlung. **E - F)** Die Expression des Caspase-Spaltproduktes *cleaved* PARP wurde mittels Western Blot-Analyse detektiert. W22 PPT- und 5436 PPT-Zellen wurden in **E)** für 24 Stunden mit der angegebenen Konzentration Doxorubicin und in **F)** für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen Etoposid behandelt. Alle statistischen Analysen wurden hier mittels zweiseitigen unpaarigen Student's t-Tests durchgeführt.

p53-defiziente (W22 PPT und 6554 PPT) und p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen (5436 PPT) (Abbildung 4.1A) wurden für 24 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen Doxorubicin behandelt und die Induktion der Apoptose mittels Hoechst-Färbung analysiert. In den p53-defizienten W22 PPT-Zellen konnte ein dosisabhängiger, signifikant höherer Anteil an apoptotischen Zellen festgestellt werden. Die p53-mutierten 5436 PPT-Zellen hingegen sprachen kaum auf die Doxorubicin-Behandlung an (Abbildung 4.1B). Die Menge an apoptotischen Zellen unterschied sich auch nach Applikation von 1 µg/ml nur minimal von den unbehandelten 5436 PPT-Zellen (Abbildung 4.1B). Die Messung der Viabilität Doxorubicin-behandelter W22 PPT- und 5436 PPT-Zellen mittels MTT-Tests spiegelte diese Beobachtung wider. Auch hier konnte eine signifikant verminderte Viabilität der W22 PPT-Zellen im Vergleich zu 5436 PPT-Zellen gezeigt werden (Abbildung 4.1C). Die Behandlung der p53-defizienten 6554 PPT-Zellen mit Etoposid resultierte im Vergleich zu den 5436 PPT-Zellen ebenfalls in einer signifikant verminderten Viabilität (Abbildung 4.1D). Um zu bestätigen, dass in den 5436 PPT-Zellen tatsächlich eine verminderte Apoptoserate auftritt, wurde die Spaltung des Caspase-Substrates PARP (Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Polymerase) detektiert. PARP ist ein DNA-Reparaturenzym und wird nach Apoptoseinduktion durch aktivierte Caspasen gespalten (D'Amours *et al.*, 2001). In mit Doxorubicin oder Etoposid behandelten W22 PPT-Zellen konnte eine vermehrte Spaltung von PARP im Vergleich zu 5436 PPT-Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.1E und F), was für eine höhere Apoptoseinduktion nach Applikation in den p53-defizienten W22 PPT-Zellen spricht.

4.1.2 Murine p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind auch weniger sensitiv gegenüber TNFα

Um zu überprüfen, ob die Mutation von p53 gegenüber externen Stimuli eine sensitivierende Wirkung bezüglich der Apoptose hat, wurden die W22 PPT- und 5436 PPT-Zellen mit TNFα behandelt.

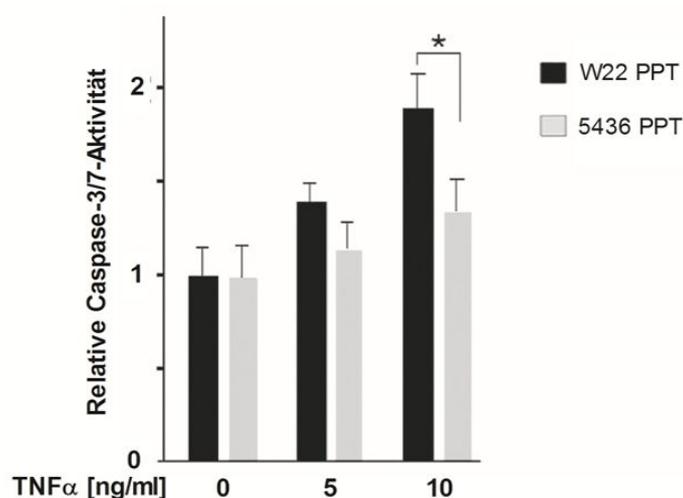


Abbildung 4.2: p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen sind weniger sensitiv gegenüber TNFα als p53-defiziente Zellen.

Mittels eines Caspase-Assays wurde die Caspase-3/7-Aktivität 24 Stunden nach TNFα-Stimulation in den murinen Pankreaskarzinomzellen W22 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{loxP/loxP};*LSL-R26*^{Tva-LacZ/+}) und 5436 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/R172H};*LSL-R26*^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}) gemessen (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Nach 24 Stunden wurde die TNF α -induzierte Aktivierung der Caspasen mittels Caspase-Assay gemessen (Abbildung 4.2). Die TNF α -Behandlung der p53-defizienten W22 PPT-Zellen resultierte im Vergleich zu den p53-mutierten 5436 PPT-Zellen in einer signifikant höheren Caspase-Aktivität. Während in den 5436 PPT-Zellen nach TNF α -Behandlung nur eine marginal erhöhte Caspase-Aktivität gemessen werden konnte, war in den W22 PPT-Zellen eine um fast zweifach erhöhte Caspase-Aktivität detektierbar (Abbildung 4.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass p53^{R172H}-exprimierende Pankreaskarzinomzellen auch weniger sensitiv gegenüber externen Apoptosestimuli wie TNF α sind als p53-defiziente Zellen.

4.1.3 p53^{R172H} verstärkt die Expression des antiapoptotischen NF κ B-Zielgens *Survivin* in murinen Pankreaskarzinomzellen

Um die Ursache für die verminderte Sensitivität der 5436 PPT-Zellen näher zu betrachten, wurden p53-defiziente 6554 PPT-Zellen verwendet, die mit einem Kontroll- oder p53^{R172H}-Retrovirus transduziert wurden (Schneider *et al.*, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass die rekonstituierte Expression von p53^{R172H} die Expression des antiapoptotischen NF κ B-Zielgens *Survivin* erhöht (Abbildung 4.3).

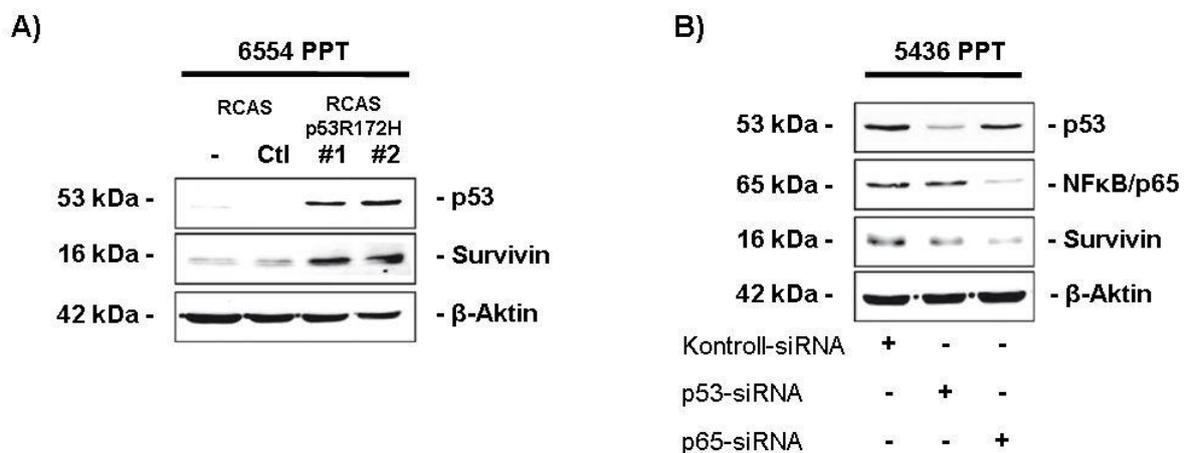


Abbildung 4.3: Murines p53^{R172H} begünstigt die Expression des antiapoptotischen NF κ B-Zielgens *Survivin*.
A) Western Blot-Analyse von Survivin in mittels RCAS-Vektor p53^{R172H}-rekonstituierten murinen Pankreaskarzinomzellen 6554 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *p53*^{loxP/loxP}; *LSL-R26*^{Tva-LacZ/+}). **B)** 5436 PPT-Zellen (*Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *LSL-Trp53*^{R172H/R172H}; *LSL-R26*^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}) wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer p53- bzw. p65-spezifischen siRNA für 48 Stunden transfiziert. Die Expression von Survivin wurde mittels Western Blot analysiert.

Umgekehrt erwirkte die Depletion von p53^{R172H} in den 5436 PPT-Zellen eine Reduktion der Survivin-Expression (Abbildung 4.3B). Diese Reduktion der Survivin-Expression konnte auch in den NF κ B/p65-depletierten 5436 PPT-Zellen erzielt werden, was darauf hinweist, dass das antiapoptotische NF κ B/p65-Zielgen *Survivin* sowohl durch p53^{R172H} als auch durch NF κ B/p65 reguliert werden kann.

4.1.4 Die Herunterregulation von p53^{R172H} und p65 sensitiviert gegenüber TNF α

Um den Beitrag von p53^{R172H} und NF κ B/p65 auf die verminderte Sensitivität muriner Pankreaskarzinomzellen gegenüber TNF α zu verifizieren, wurden die p53-mutierten 5436 PPT-Zellen mit einer p53- bzw. einer p65-spezifischen siRNA sowie einer Kontroll-siRNA für 48 Stunden transfiziert (Abbildung 4.4A). Nach einer weiteren 24-stündigen Stimulation mit TNF α wurde die Caspase-Aktivität gemessen.

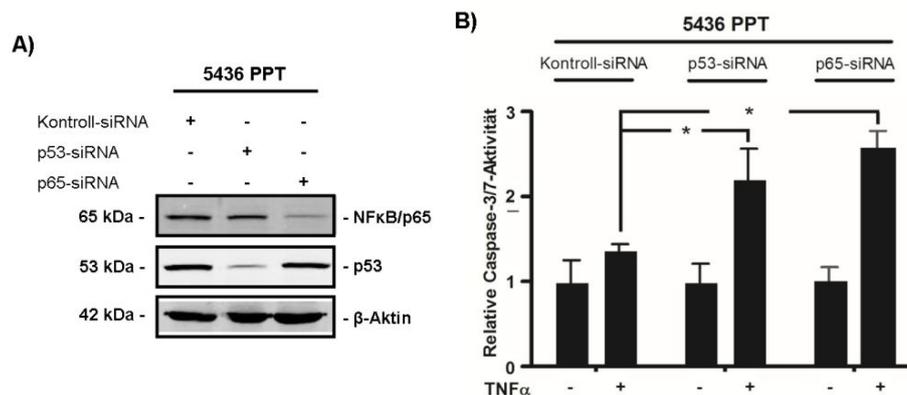


Abbildung 4.4: Die Herunterregulation von p53^{R172H} und NF κ B/p65 führt zu einer Sensitivierung gegenüber TNF α .
A) Western Blot-Analyse von NF κ B/p65 und p53 48 Stunden nach der Transfektion von 5436 PPT-Zellen (*Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/R172H};LSL-R26^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}*) mit einer p65- oder p53-spezifischen siRNA oder einer Kontroll-siRNA. **B)** 5436 PPT-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer p53- bzw. p65-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 10 ng/ml TNF α behandelt. Die Caspase-Aktivität wurde mittels Caspase-3/7-Assay gemessen (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Herunterregulation von p53^{R172H} als auch von NF κ B/p65 in den 5436 PPT-Zellen in einer signifikant höheren Caspase-Aktivität nach TNF α -Stimulation resultierte, was einer verstärkten Apoptoseinduktion entspricht (Abbildung 4.4B).

4.1.5 Die Behandlung von TNF α führt zu einer gemeinsamen Bindung von p53^{R172H} und NF κ B/p65 an eine κ B-Konsensussequenz

Inwieweit p53^{R172H} und NF κ B/p65 zur verminderten Sensitivität der 5436 PPT-Zellen gegenüber externen Apoptosestimuli beitragen, wurde mit Hilfe eines ABCD (*avidin-biotin complex DNA-binding*)-Assays untersucht (Abbildung 4.5).

Dabei ließ sich in den p53-mutierten 5436 PPT-Zellen (Abbildung 4.5A) bereits unter nativen Bedingungen (0' TNF α -Behandlung) eine Bindung sowohl von NF κ B/p65 als auch von p53^{R172H} an eine κ B-Konsensussequenz nachweisen (Abbildung 4.1.5B). Diese gemeinsame Bindung von NF κ B/p65 und p53^{R172H} an eine κ B-Konsensussequenz ließ sich auch nach 10 und 20 Minuten TNF α -Stimulation beobachten, wobei zu diesen Zeitpunkten eine verstärkte Bindung von NF κ B/p65 detektiert werden konnte (Abbildung 4.5B). Auch in den W22 PPT-Zellen konnte nach 10 und 20 minütiger TNF α -Behandlung eine zu den 5436 PPT-Zellen vergleichbare, verstärkte NF κ B/p65 an die κ B-Konsensussequenz detektiert werden (Abbildung 4.5B).

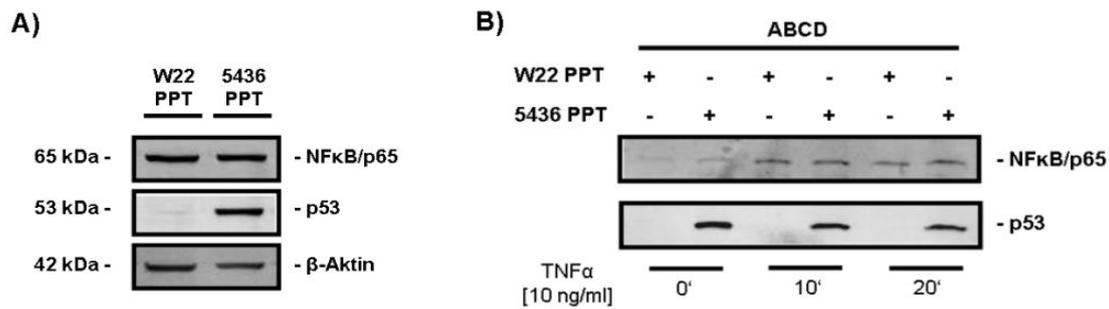


Abbildung 4.5: TNF α führt zu einer gemeinsamen Bindung von p53^{R172H} und NFκB/p65 an eine κB-Konsensussequenz.
A) Überprüfung der Expression von NFκB/p65 und p53 in den murinen Pankreaskarzinomzellen W22 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *p53*^{loxP/loxP}; *LSL-R26*^{Tva-LacZ/+}) und 5436 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *LSL-Trp53*^{R172H/R172H}; *LSL-R26*^{Tva-LacZ/Tva-LacZ}) mittels *Western Blot*-Analyse. β-Aktin dient als Ladekontrolle. **B)** ABCD-Assay der 5436 PPT- und W22 PPT-Zellen nach 0, 10 und 20 Minuten Stimulation mit TNF α .

4.1.6 Hydroxyurea induziert die Bildung eines DNA-Komplexes aus NFκB/p65 und p53-Wildtyp

Ob auch ein funktioneller Synergismus zwischen p53-Wildtyp (p53WT) mit NFκB/p65 an der Transkription von NFκB-Zielgenen beteiligt ist, sollte im Folgenden mit Hilfe einer Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) analysiert werden. Für die Analyse des Wechselspiels zwischen NFκB/p65 und p53WT wurden humane p53-profiziente (p53+) und p53-defiziente (p53-) Kolonkarzinomzelllinien (HCT116) für 24 Stunden mit Hydroxyurea (HU) behandelt. HU verursacht in Zellen einen Replikationsarrest und initiiert die Aktivierung sowohl von p53WT (Abbildung 4.6A) als auch von NFκB-Zielgenen, und damit die NFκB-Aktivität (Schneider *et al.*, 2010; Ansari *et al.*, 2001, Gottifredi *et al.*, 2001, Wu & Miyamoto, 2008).

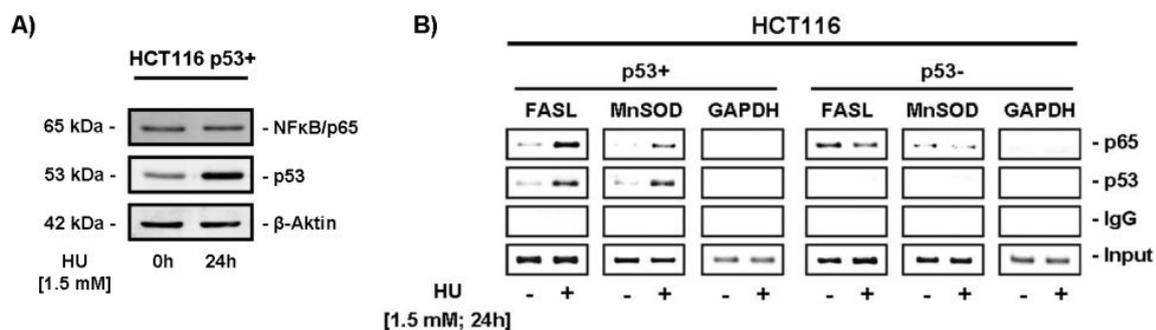


Abbildung 4.6: HU-induzierte Bindung von NFκB/p65 und p53WT an die Genpromotoren der NFκB-Zielgene FASL und MnSOD.

A) *Western Blot*-Analyse von NFκB/p65 und p53 der humanen p53-profizienten Kolonkarzinomzellen (HCT116 p53+) nach 0 und 24 Stunden Hydroxyurea-Behandlung. β-Aktin als Ladungskontrolle. **B)** Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) der FASL- und MnSOD-Genpromotoren. Das Chromatin von humanen p53-profizienten (p53+) und p53-defizienten (p53-) HCT116-Zellen wurde nach 24-stündiger HU-Behandlung mit p65-, p53- oder IgG-Antikörpern als Negativkontrolle immunpräzipitiert. Präzipitierte DNA oder 10% des Chromatin-Inputs wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für FASL, MnSOD und GAPDH amplifiziert.

Anschließend erfolgte eine Chromatin-IP mit Antikörpern gegen NFκB/p65 und p53. Als Negativkontrolle diente die Verwendung eines IgG-Antikörpers. In den p53-positiven HCT116-Zellen

konnte nach HU-Behandlung eine verstärkte, direkte und spezifische Bindung von NFκB/p65 und p53WT an den Genpromotoren von *FASL* und *MnSOD* nachgewiesen werden (Abbildung 4.6B). In den p53-negativen HCT116-Zellen hingegen wurde eine verstärkte basale Bindung von NFκB/p65 an den *FASL*-Promotor detektiert, die nach HU-Behandlung leicht abgeschwächt wurde. Die geringe Bindung von NFκB/p65 an den *MnSOD*-Promotor blieb in diesen Zellen nach Applikation von HU unverändert (Abbildung 4.6B). Ferner konnten keine Bindungen von NFκB/p65 und p53 am *GAPDH*-Promotor festgestellt werden, was die Spezifität des Assays belegt. Dieses Ergebnis demonstriert, dass im HU-induzierten Replikationsarrest neben NFκB/p65 auch p53WT an Genpromotoren NFκB-abhängiger Zielgene bindet und suggeriert, dass die Bildung eines DNA-Komplexes aus NFκB/p65 und p53 die Expression NFκB-abhängiger Zielgene beeinflusst.

4.1.7 Humane p53-defiziente Kolonkarzinomzellen sind sensitiver gegenüber TNFα

Um zu untersuchen, ob die Expression von NFκB/p65 und p53WT in den HCT116-Zellen auch Einfluss auf eine sensitivierende Wirkung gegenüber externen Apoptosestimuli wie TNFα hat, wurde die Viabilität der p53-positiven HCT116-Zellen mit der Viabilität der p53-negativen HCT116-Zellen nach TNFα-Stimulation mit Hilfe eines MTT-Tests verglichen (Abbildung 4.7).

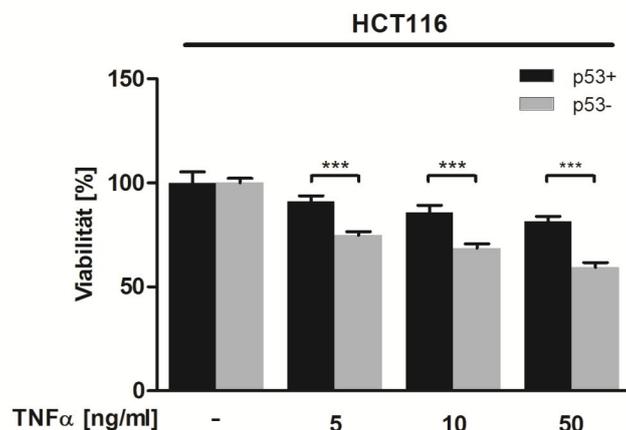


Abbildung 4.7: p53-defiziente HCT116-Zellen sind sensitiver gegenüber TNFα als p53-profiziente HCT116-Zellen. Die Viabilität von humanen p53-profizienten (p53+) und p53-defizienten (p53-) Kolonkarzinomzellen (HCT116) wurde nach der Behandlung von TNFα für 48 Stunden mittels MTT-Assays bestimmt (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Wie bereits für die p53^{R172H}-exprimierenden 5436 PPT-Zellen gezeigt werden konnte (siehe 4.1.2), wiesen auch die p53WT-exprimierenden HCT116-Zellen (p53+) eine signifikant geringere Sensitivität gegenüber TNFα auf als die p53-negativen HCT116-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit 50 ng/ml TNFα ging die Viabilität der p53-negativen HCT116-Zellen auf etwa 60% zurück, während die Viabilität der p53-positiven HCT116-Zellen nur um etwa 20% reduziert wurde (Abbildung 4.7).

4.1.8 Die Regulation des p53-Zielgens *PUMA* durch Etoposid ist NFκB/p65-unabhängig

Wie bereits im vorangegangenen Teil der Ergebnisse gezeigt, wird die Regulation und Expression von NFκB-Zielgenen im untersuchten Kontext sowohl durch p53^{R172H} als auch durch p53^{WT} verstärkt. Um zu untersuchen, inwieweit nun NFκB/p65 zur Aktivierung von p53-Zielgenen beiträgt, wurden die p53-positiven und p53-negativen HCT116-Zellen für 24 Stunden mit dem p53-Aktivator Etoposid behandelt (Abbildung 4.8A). p53 wurde in den p53-positiven HCT116-Zellen nach Behandlung mit Etoposid stärker exprimiert als in den unbehandelten Zellen. Die durch Etoposid-induzierte p53-Aktivität spiegelte sich auch in der leichten Induktion des p53-induzierten Proteins PUMA in den p53-positiven HCT116-Zellen wider. NFκB/p65 wurde trotz Etoposid-Behandlung in allen Zellen gleich exprimiert (Abbildung 4.8).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, welchen Einfluss NFκB/p65 auf die Expression der p53-abhängigen Zielgene *PUMA* und *p21* hat. Hierfür wurden p53-profiziente HCT116-Zellen zunächst mit einer Kontroll- oder einer p65-spezifischen siRNA (#1 oder #2) transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und anschließend für weitere 24 Stunden mit Etoposid behandelt. Die Depletion von NFκB/p65 hatte in den p53-positiven HCT116-Zellen keine Auswirkung auf die Expression von PUMA und p21. Die PUMA- und p21-Expression korreliert auch hier weiterhin mit der p53-Expression (Abbildung 4.8B).

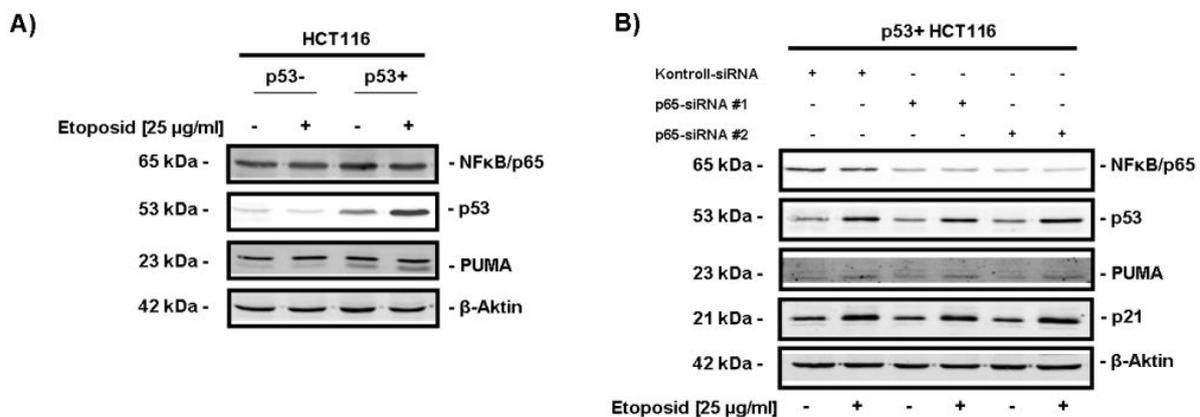


Abbildung 4.8: Die Etoposid-induzierte Expression von PUMA und p21 ist von NFκB/p65 unabhängig.

A) Western Blot-Analyse des p53 Zielgens *PUMA* in humanen p53-defizienten (p53-) und p53-profizienten (p53+) Kolonkarzinomzellen HCT116 nach 24 Stunden Behandlung mit 25 µg/ml Etoposid. β-Aktin dient als Ladekontrolle. **B)** p53+ HCT116-Zellen wurden mit Kontroll- oder p65-spezifischen siRNAs (#1 oder #2) für 48 Stunden transfiziert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 25 µg/ml Etoposid behandelt. Die Regulation der p53-Zielgene *PUMA* und *p21* wurde nach p65-Depletion mittels Western Blot analysiert. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

4.2 Einfluss des NFκB-Inhibitors beta (IκBβ) auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms

4.2.1 Der Verlust von IκBβ im Pankreas von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen korreliert mit einer verminderten Zytokinexpression

Für die Untersuchung des Beitrags von IκBβ zur Karzinogenese des duktaalen Pankreaskarzinoms wurden IκBβ-defiziente Mäuse (*Nfkbib^{Δ/Δ}*) ins murine *Kras^{G12D}*-induzierte Pankreaskarzinommodell (*Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*) gekreuzt.

Dass die IκBβ-Defizienz keinen alleinigen Effekt auf die Organogenese des Pankreas hat, konnte zuvor mit Hilfe von H&E-gefärbten Pankreasgewebeschnitten aus *Nfkbib^{Δ/Δ}*-, *Nfkbib^{Δ/+}*- und *Nfkbib^{+/+}*-Mäusen ausgeschlossen werden. Die Morphologie der Pankreata aus *Nfkbib^{Δ/Δ}*- und *Nfkbib^{Δ/+}*-Mäusen entsprach der des Wildtyps (*Nfkbib^{+/+}*) (Abbildung 4.9A).

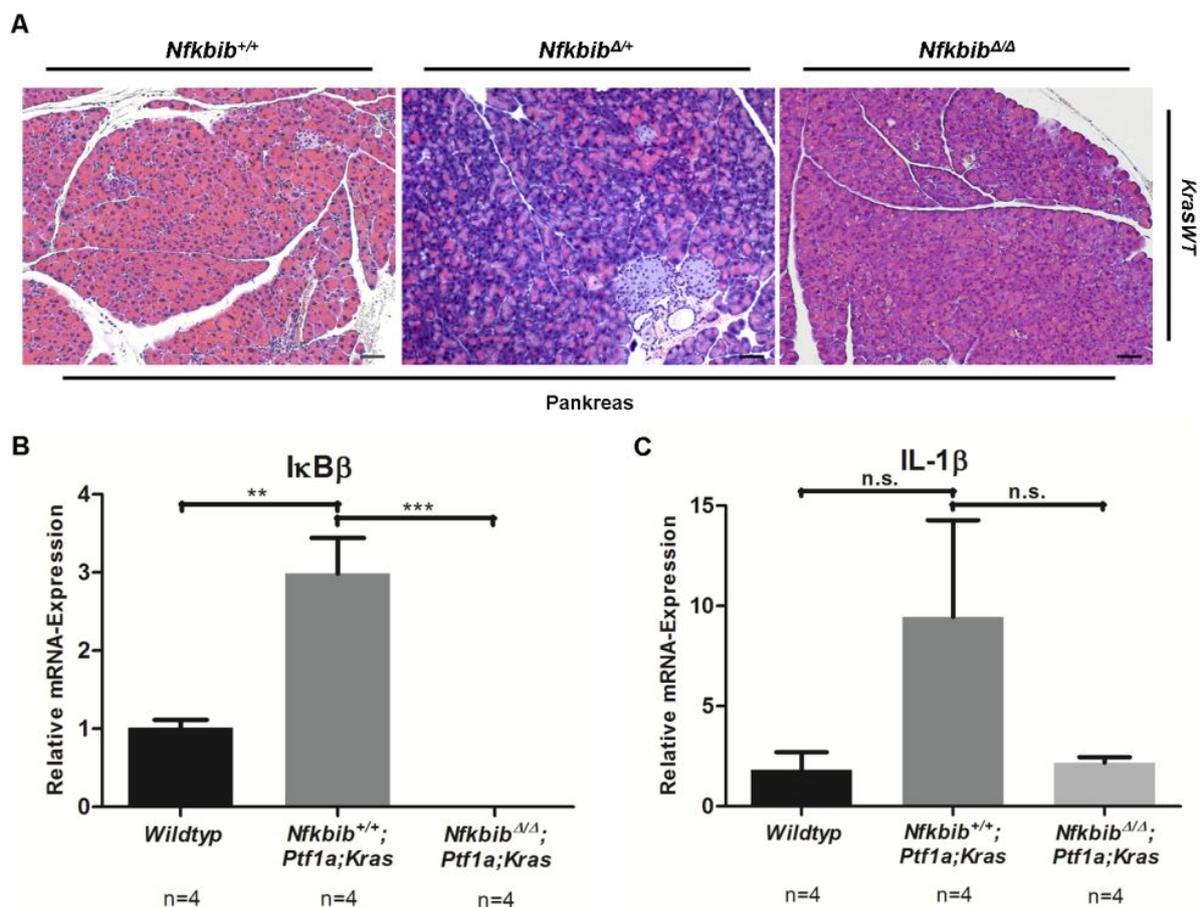


Abbildung 4.9: IκBβ und IL-1β werden im murinen *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell hoch exprimiert. **A)** Gezeigt sind H&E-gefärbte Schnitte aus nicht-tumorösem/normalem Pankreasgewebe (*Kras^{+/+}*) der *Nfkbib^{+/+}*-, *Nfkbib^{Δ/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ}*-Mäuse (100x Vergrößerung; Maßstabbalken: 100 μm). **B-C)** Relative mRNA-Expression von IκBβ und IL-1β in vier Wochen alten Wildtyp-, *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nach der ΔΔCT-Methode (One-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur).

Im Pankreasgewebe *Kras^{G12D}*-induzierter Tumormäuse (*Ptf1a^{Cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}*) konnte jedoch eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von IκBβ, im Vergleich zu Wildtypmäusen, festgestellt werden

(Abbildung 4.9B). In IκBβ-defizienten Mäusen (*Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}) hingegen wurde IκBβ nicht detektiert (Abbildung 4.2.1B).

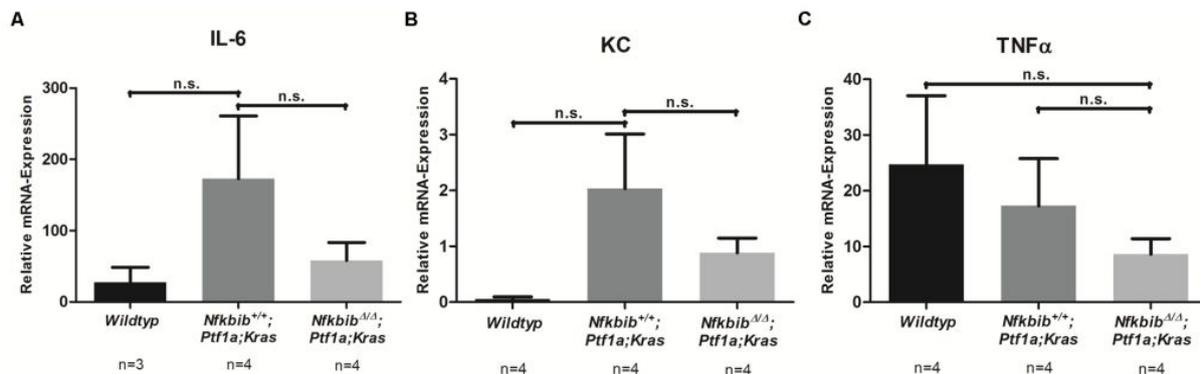


Abbildung 4.10: Die mRNA-Expression der Zytokine IL-6, KC und TNFα ist in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäusen herunterreguliert.

A-C) Relative mRNA-Analyse nach der ΔΔCT-Methode der Zytokine IL-6, KC und TNFα (normalisiert zu Cyclophilin) in vier Wochen alten Wildtyp- *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen (One-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur).

Scheibel *et al.* konnten bereits zeigen, dass IκBβ eine essentielle Rolle in der Genexpression proinflammatorischer Zytokine spielt. Hierbei wirkt IκBβ auf Transkriptionsebene als wichtiger Kofaktor in der Biosynthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β (Scheibel *et al.*, 2010). Inflammatorische Prozesse werden als bedeutende Faktoren angesehen, die zu Tumorgenese und -progression führen können (Karin & Greten, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine verminderte mRNA-Expression von IL-1β in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp- und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 4.9C).

In den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen hingegen war die Expression von IL-1β im Vergleich zu Wildtypmäusen fast dreifach erhöht. Neben IL-1β werden auch die Zytokine IL-6, KC (welches eine funktionelle Homologie zu dem humanen IL-8 zeigt) und TNFα durch die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges reguliert (Singer & Sansonetti, 2004; Ohmori *et al.*, 1995; Karin & Greten, 2005). Die Untersuchung der mRNA-Expression dieser Zytokine zeigte auch hier eine verminderte mRNA-Expression in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen (Abbildung 4.10A-C), was ebenfalls auf eine IκBβ-abhängige Regulation hinweist.

Da tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) eine der wichtigsten Quellen für Zytokine bilden und wesentliche Bestandteile des Mikromilieus in neoplastischen Geweben sind (Coussens & Werb, 2002), wurde in einem weiteren Schritt die Rekrutierung von TAMs untersucht.

Dabei wurden pankreatische Gewebeschnitte zwölf Wochen alter *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse gegen F4/80 immunhistochemisch angefärbt und analysiert (Abbildungen 4.11A und B). F4/80 bildet das murine Homolog des humanen EMR1 (*EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1*) und ist ein auf der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiertes Transmembranprotein (Hamann *et al.*, 2007).

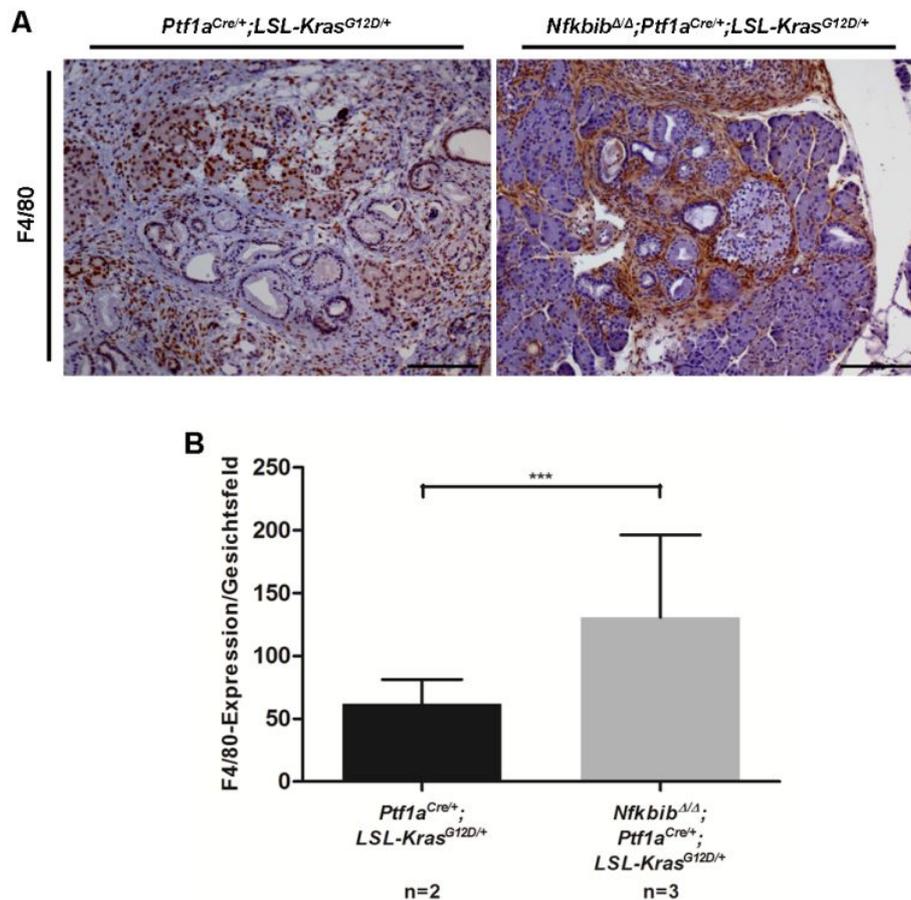


Abbildung 4.11: Verstärkte Makrophagenrekretierung im pankreatischen Gewebe von *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormäusen.

A) Repräsentative immunohistochemische F4/80-Färbung von Pankreasgewebeschnitten zwölf Wochen alter *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen (Maßstabbalken: 500 µm). **B)** Quantifizierung der Makrophagen. Bei einer 200x Vergrößerung wurden pro Maus (*Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*: n=2 und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*: n=3) jeweils fünf Gesichtsfelder eines Gewebeschnittes ausgezählt (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Entgegen der Erwartungen konnte in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse, insbesondere in den Bereichen der Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, eine höhere Anzahl F4/80-positiver Zellen detektiert werden, was auf eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen hinweist (Abbildung 4.11A). Dieses Ergebnis wurde durch die Quantifizierung der F4/80-Expression (Makrophagen) validiert. Hierbei konnte eine etwa 1,5-fache, signifikant höhere Expression von F4/80 den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen ermittelt werden (Abbildung 4.11B).

4.2.2 Der Verlust von IκBβ im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell hat keinen Einfluss auf die PanIN-Progression

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die IκBβ-Defizienz auf die PanIN-Progression der *Kras^{G12D}*-induzierten Tumorgenese des Pankreas hat, wurden die PanINs vier und zwölf Wochen alter *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormäuse analysiert und quantifiziert (Abbildung 4.12).

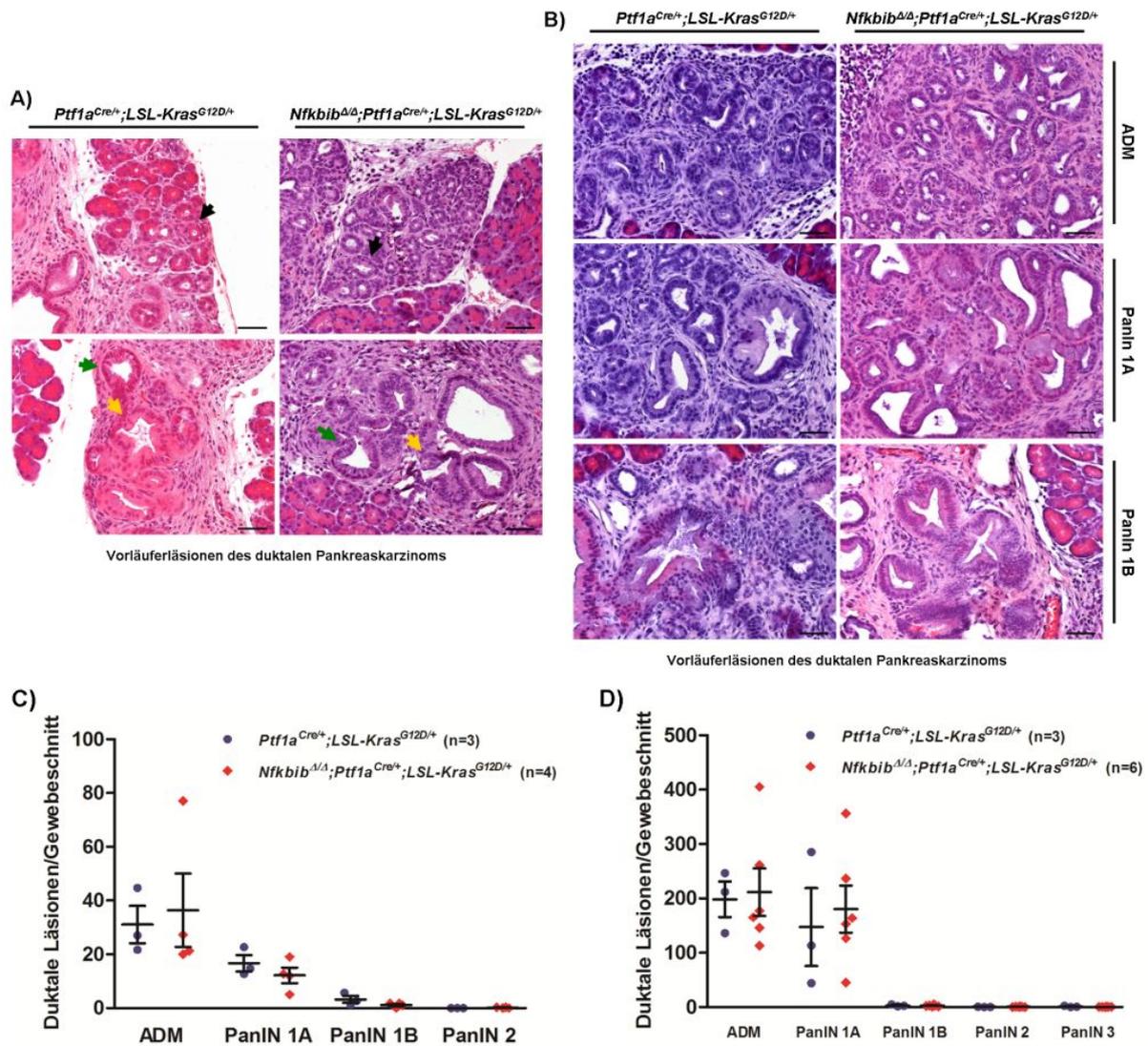


Abbildung 4.12: Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) vier und zwölf Wochen alter IκB-defizienter Mäuse im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell.

A) H&E-gefärbte Pankreasgewebeschnitte vier Wochen alter *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (200x vergrößert). Schwarze Pfeile kennzeichnen ADMs, blaue Pfeile PanIN 1A-Strukturen, gelbe Pfeile PanIN 1B-Strukturen. **B)** H&E-gefärbte Pankreasgewebeschnitte zwölf Wochen alter *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (200x vergrößert; Maßstabbalken: 100 μm). **C)** Quantifizierung der duktaalen Läsionen der vier Wochen alten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse. Pro Maus wurden jeweils drei Gewebeschnitte bei einer 200x Vergrößerung und einem Mindestabstand von etwa 100 μm ausgezählt. **D)** Quantifizierung der duktaalen Läsionen zwölf Wochen alter *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse. Pro Maus wurden jeweils drei Gewebeschnitte bei einer 200x Vergrößerung und einem Mindestabstand von etwa 100 μm ausgezählt). Statistische Analysen wurden hier mittels zweiseitigem unpaarigen Student's t-Test (n.s.) durchgeführt.

Hierbei wurde zwischen folgenden Strukturen unterschieden: ADM, PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2 und PanIN 3. H&E-gefärbte Gewebeschnitte zeigten, dass in beiden Pankreaskarzinommodellen *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* sowohl nach vier als auch nach zwölf Wochen Lebenszeit keine Unterschiede in der Ausprägung der Vorläuferläsionen zu erkennen waren (Abbildungen 4.12A und B).

In den vier Wochen alten Mäusen beider Kohorten wurden vorwiegend niedriggradige PanINs wie ADMs und PanIN 1A-Strukturen, sehr vereinzelt auch PanIN 1B-Strukturen beobachtet (Abbildung 4.12A). Auch im Alter von zwölf Wochen konnten keine Unterschiede in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen festgestellt werden. In beiden Kohorten lagen vor allem ADMs sowie PanIN 1A- und 1B-Strukturen vor (Abbildung 4.12B und D). Auch die

Quantifizierung der dukталen Läsionen in den Pankreasgeweben der vier und zwölf Wochen alten *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen ergab keine Unterschiede (Abbildungen 4.12C und D).

4.2.3 Die IκBβ-Defizienz im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell hat keinen Einfluss auf das Überleben der Mäuse

Um die Funktion von IκBβ im weiteren Verlauf der Karzinogenese des Pankreas zu analysieren, wurde die Überlebenszeit der *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse untersucht.

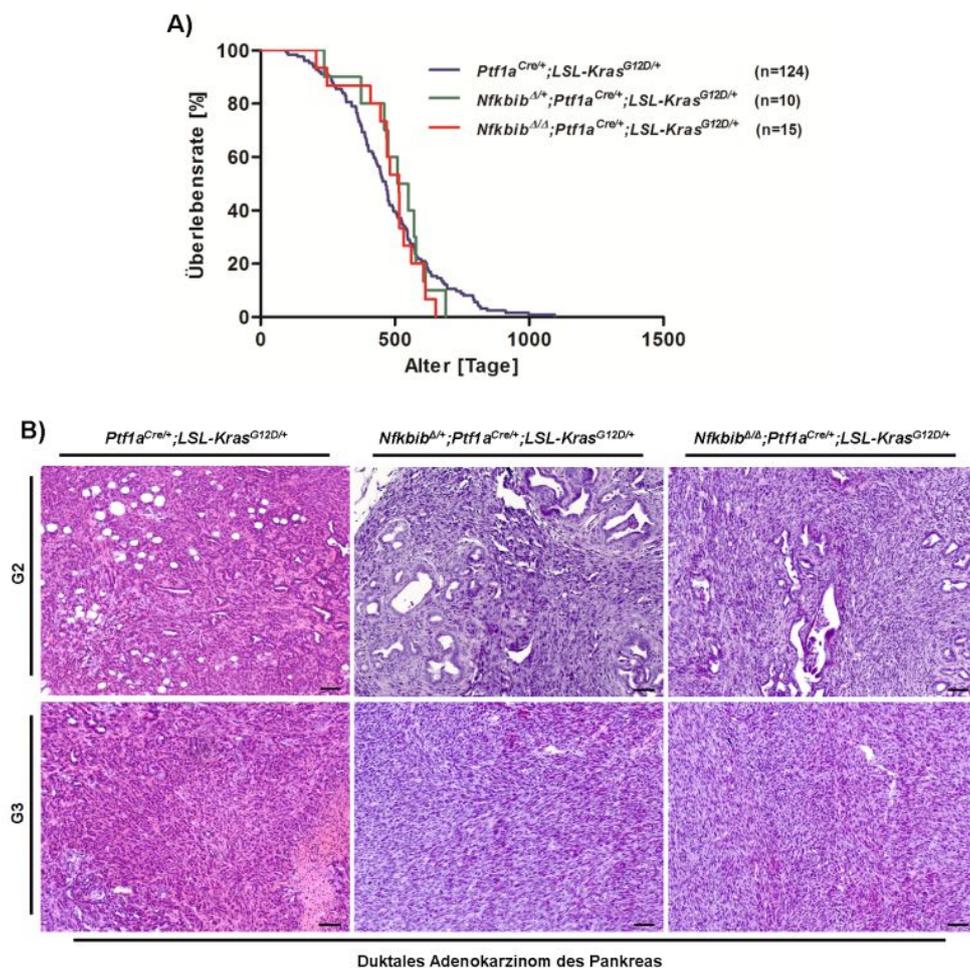


Abbildung 4.13: Überleben und Morphologie des Pankreas IκBβ-defizienter Tumormäuse im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell.

A) Die hier dargestellte Kaplan-Meier-Kurve gibt Auskunft über die Überlebenszeit der *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (n=15, mediane Überlebenszeit 515 Tage) und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (n=10, mediane Überlebenszeit 530 Tage) im Vergleich zu den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Kontrollmäusen (n=124, mediane Überlebenszeit 466 Tage) (log-rank test: n.s.). **B)** H&E-gefärbte Gewebeschnitte aus dukталen Adenokarzinomen des Pankreas (*Kras^{G12D}*), unterteilt in mäßig differenziert (G2; obere Reihe) und undifferenziert (G3; untere Reihe) für *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-, *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (100x Vergrößerung; Maßstabballen: 100 μm).

Dafür wurden die Überlebenszeiten homozygoter *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse, heterozygoter *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse sowie von *Nfkbib*-Wildtypmäusen miteinander verglichen.

Aus dieser Analyse ging hervor, dass weder der vollständige Verlust (*Nfkbib*^{Δ/Δ}) noch der Teilverlust (*Nfkbib*^{Δ/+}) von IκBβ einen Einfluss auf das Überleben der Mäuse im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinommodell hatte. Während die *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse eine mediane Überlebenszeit von 515 Tagen aufwiesen und die *Nfkbib*^{Δ/+};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse im Durchschnitt 530 Tage überlebten, lag die mediane Überlebenszeit der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse bei 466 Tagen (Abbildung 4.13A). Folglich konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- und den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäusen ermittelt werden. Die histologische Analyse der Gewebeschnitte der primären Pankreastumore zeigte, dass sich in allen Mausmodellen mäßig (G2) bis undifferenzierte (G3) Pankreaskarzinome entwickelten (Abbildung 4.13B).

4.2.4 Der Verlust von IκBβ im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinommodell erhöht die IκBα-Proteinexpression *in vitro*

Da IκBβ eine Schlüsselfunktion in der NFκB-Aktivierung einnimmt, ist es überraschend, dass der Verlust von IκBβ augenscheinlich keinen Effekt auf die Karzinogenese eines Pankreaskarzinoms hat. Es ist jedoch bekannt, dass das Fehlen einer IκB-Form durch ein anderes Familienmitglied der IκB-Proteine kompensiert werden kann (Cheng *et al.*, 1998).

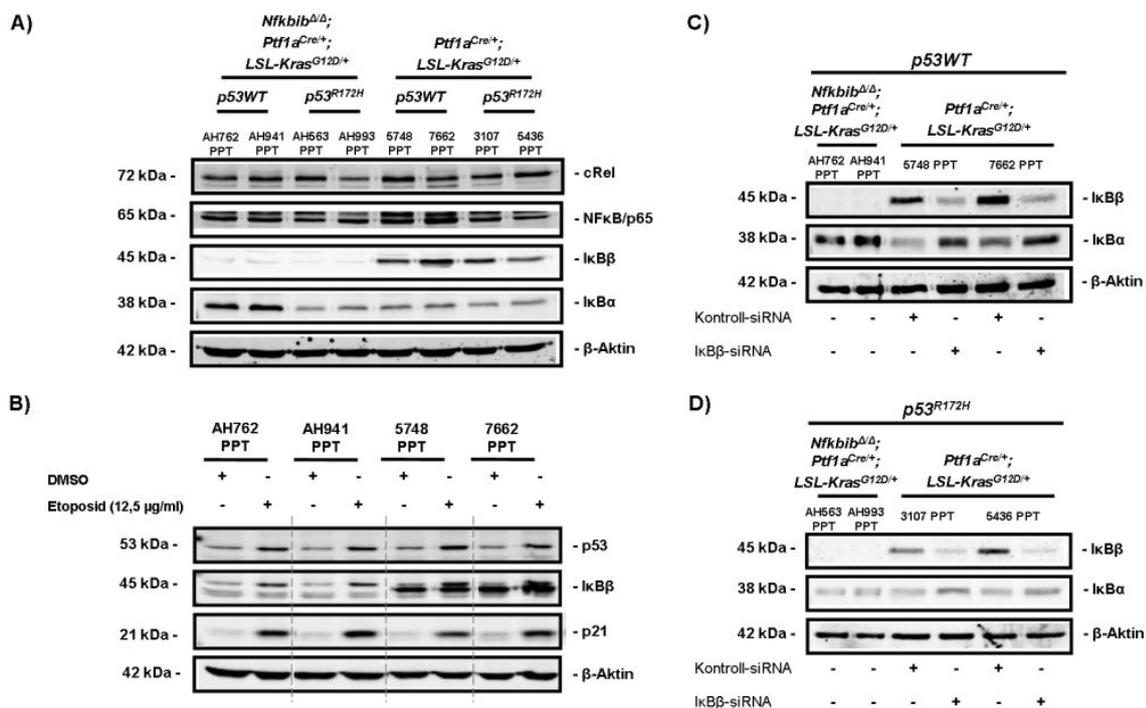


Abbildung 4.14: Erhöhte IκBα-Proteinexpression in IκBβ-defizienten p53WT-Pankreaskarzinomzellen.

A) Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Expressionslevel der NFκB-Familienmitglieder p65 und cRel sowie IκBα in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} (AH762 PPT und AH941 PPT), *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/+} (AH563 PPT und AH993 PPT) Zellen sowie in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} (5748 PPT und 7662 PPT) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/+} (3107 PPT) sowie *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/R172H} (5436 PPT) Zellen. **B)** 24 Stunden nach Behandlung mit 12,5 μg/ml Etoposid wurde in den angegebenen Zellen der p53-Status sowie die Expression des p53-Zielgens p21 mittels *Western-Blots* überprüft. **C - D)** 24 Stunden nach Transfektion einer Kontroll-siRNA bzw. einer IκBβ-spezifischen siRNA in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- bzw. in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/+}-Zellen wurde die Regulation von IκBα mittels *Western-Blots* analysiert. Als Kontrollen wurden Ganzzellextrakte der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- bzw. der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/+}-Zellen aufgetragen.

Um mögliche Kompensationen innerhalb der I κ B-Familie zu entdecken, wurden Pankreaskarzinomzellen aus den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- und den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert und zunächst auf die Expression von I κ B α (neben I κ B β ein zentraler NF κ B-Inhibitor im klassischen Signalweg) überprüft. Ferner wurde auch die Expression der NF κ B-Untereinheiten NF κ B/p65 und cRel untersucht (Abbildung 4.14A), da I κ B β beispielsweise unter LPS-Induktion einen transaktiven Komplex mit NF κ B/p65 und cRel bildet (Scheibel *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2010).

Auf Proteinebene konnten keine Unterschiede in der Expression der NF κ B-Untereinheiten p65 und cRel detektiert werden (Abbildung 4.14A). I κ B α hingegen wurde stärker in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen (AH762 PPT und AH941 PPT) als in den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen (5748 PPT und 7662 PPT) exprimiert (Abbildung 4.14A), was auf einen Kompensationsmechanismus hinweisen könnte.

Des Weiteren konnte eine verstärkte Expression von I κ B α in p53WT-exprimierenden *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen (AH762 PPT und AH941 PPT) detektiert werden. In p53^{R172H}-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen (AH563 PPT und AH993 PPT) hingegen war diese Überexpression von I κ B α nicht zu beobachten (Abbildung 4.14A und B). Ebenso konnte in den jeweiligen Kontrollzellen (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} (5748 PPT und 7662 PPT), *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/+} (3107 PPT) sowie *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*p53*^{R172H/R172H} (5436 PPT)) keine erhöhte I κ B α -Proteinexpression festgestellt werden (Abbildung 4.14A).

Zur Überprüfung des p53WT-Status wurden die p53WT-exprimierenden Zellen (AH762 PPT, AH941 PPT, 5748 PPT und 7662 PPT) mit Etoposid behandelt. In allen Zellen konnte nach 24 Stunden Etoposid-Behandlung eine p53-Induktion detektiert werden (Abbildung 4.14B). Darüber hinaus korrelierte die erhöhte Expression von p53 zudem mit einer verstärkten Expression des p53-Zielgens p21 (Abbildung 4.14B).

Um die p53WT-abhängige Funktion für I κ B α zu verifizieren, wurden 5748 PPT und 7662 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}) mit einer I κ B β -spezifischen siRNA transfiziert (Abbildung 4.14C). Nach Herunterregulation von endogenem I κ B β in den p53WT-exprimierenden Zellen (5748 PPT und 7662 PPT) konnte auch hier eine Zunahme der I κ B α -Expression verzeichnet werden (Abbildung 4.14C). In den p53-mutierten Kontrollzellen 3107 PPT und 5436 PPT hingegen konnte allenfalls eine marginal höhere Regulation von I κ B α detektiert werden (Abbildung 4.14D).

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass durch die I κ B β -Defizienz eine Hochregulation von I κ B α in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen hervorgerufen wird, die jedoch von p53WT abhängig zu sein scheint.

4.2.5 Die Überexpression von I κ B α führt nicht zu einer verminderten Translokation von NF κ B/p65-Expression in den Nukleus

I κ B α ist Bestandteil einer autoregulatorischen Rückkopplung. Einerseits fungiert I κ B α als zytosolischer NF κ B-Inhibitor, andererseits ist I κ B α auch ein direktes Zielgen von NF κ B und wird durch erhöhte NF κ B-Aktivität resynthetisiert (siehe 1.5.1).

Um zu überprüfen, ob die I κ B β -Defizienz und die damit einhergehende Hochregulation von I κ B α in den murinen p53WT-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen AH762 PPT und AH941 PPT

(*Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}) einen Einfluss auf den NFκB-Signalweg bzw. auf die Aktivierung von NFκB hat, wurden zytosolische und nukleäre Extrakte aus den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} (AH762 PPT und AH941 PPT) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen (5748 PPT und 7662 PPT) hergestellt.

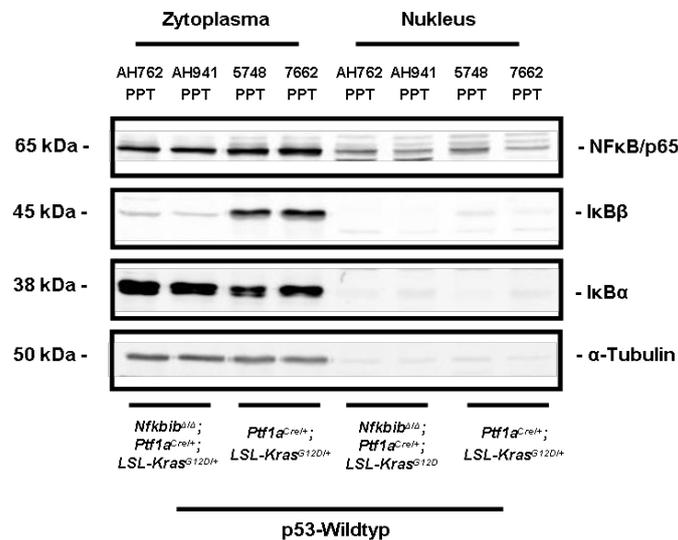


Abbildung 4.15: Intrazelluläre Lokalisation von NFκB/p65.

Western Blot-Analyse zytosolischer und nukleärer Extrakte der murinen Pankreaskarzinomzellen AH762 PPT und AH941 PPT (*Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}) sowie 5748 PPT und 7662 PPT (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}). α-Tubulin als Kontrolle.

Entgegen der Erwartungen konnte weder eine verminderte nukleäre Expression von NFκB/p65 in den IκBα-hochregulierten *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen, noch eine erhöhte Akkumulation von NFκB/p65 im Nukleus der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 4.15). Allerdings lässt die nukleäre Fraktion der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Kontrollzellen (5748 PPT und 7662 PPT) eine, wenn auch sehr schwache, Expression von IκBβ erkennen.

4.2.6 Die Hochregulation von IκBα sensitiviert nicht gegenüber Doxorubicin bzw. Etoposid

Um zu überprüfen, ob die verstärkte Expression von IκBα in den murinen *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen Auswirkungen auf die Behandlung mit Chemotherapeutika hat, wurden sowohl die *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen als auch die *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Kontrollzellen für 24 bzw. 48 Stunden mit den Topoisomerase II-Inhibitoren Doxorubicin oder Etoposid behandelt.

Die Behandlung mit Doxorubicin bzw. Etoposid zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}- und den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen (Abbildung 4.16A und B). Sowohl in den IκBα-überexprimierenden *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinomzellen AH762 PPT und AH941 PPT als auch in den *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Zellen 5748 PPT und 7662 PPT konnte nach Doxorubicin- und Etoposid-Behandlung eine konzentrationsabhängige Verminderung der Viabilität festgestellt werden (Abbildung 4.16A).

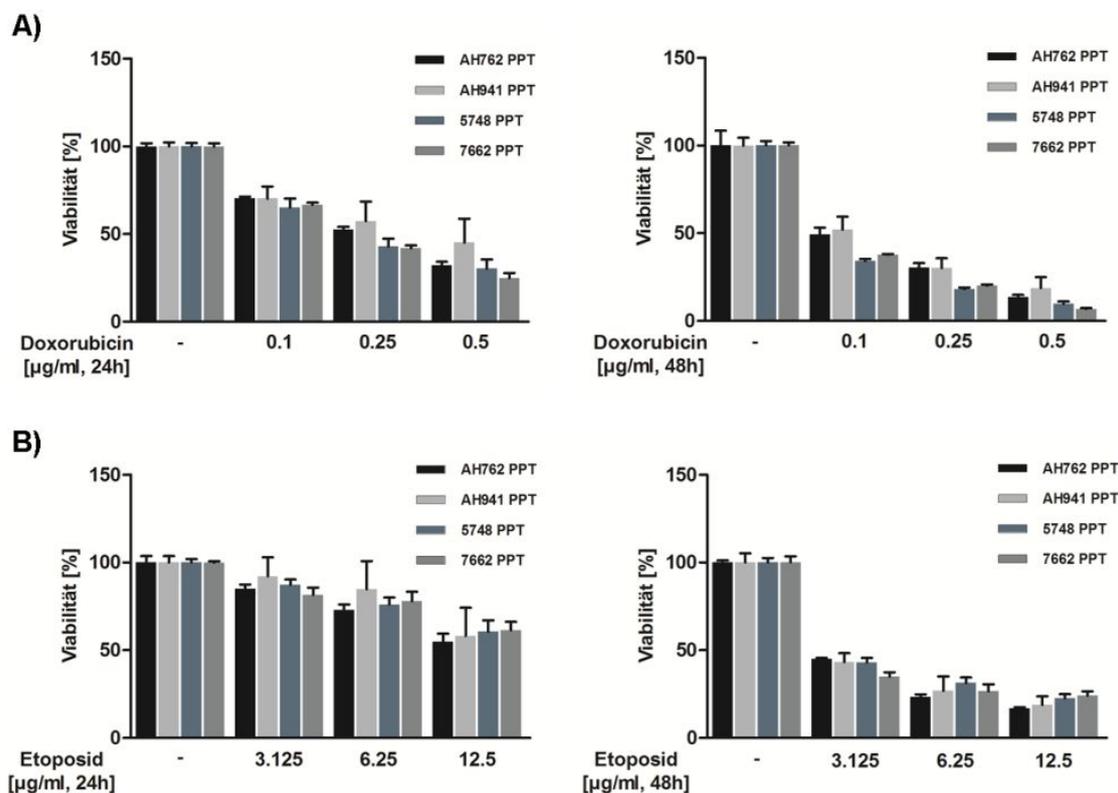


Abbildung 4.16: Verstärkte IκBα-Expression in p53WT-exprimierenden *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen hat keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Etoposid.

A) MTT-Assay der murinen Pankreaskarzinomzellen AH762 PPT und AH941 PPT (*Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*) und 5748 PPT und 7662 PPT (*Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*) nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit Doxorubicin in den angegebenen Konzentrationen (*One-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur: n.s.). **B)** MTT-Assay der murinen *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen nach 24 und 48 Stunden Behandlung von Etoposid (*One-way* ANOVA mit Bonferroni-Korrektur: n.s.).

4.2.7 *Nfkbib*^{Δ/Δ} und *p53*^{R172H/+} akzelerieren die Progression der *Kras*^{G12D}-induzierten Tumorgenese

Da zelluläre Modelle Hinweise auf eine kompensatorische Hochregulation von IκBα im *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinommodell ergaben, wurde der Einfluss von IκBβ auf die Karzinogenese in einem aggressiveren Pankreaskarzinommodell untersucht, welches zugleich *Kras*^{G12D} und *p53*^{R172H} exprimiert.

Hierfür wurden *Nfkbib*^{Δ/Δ}-Mäuse in das aggressive murine *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Pankreaskarzinommodell gekreuzt und analysiert. Als Kontrollen wurden stets *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse verwendet.

Die Kaplan-Meier-Kurve zeigte zunächst, dass die mediane Überlebensdauer der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse signifikant verkürzt zur medianen Überlebensdauer der *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Kontrollmäuse war (Abbildung 4.17A).

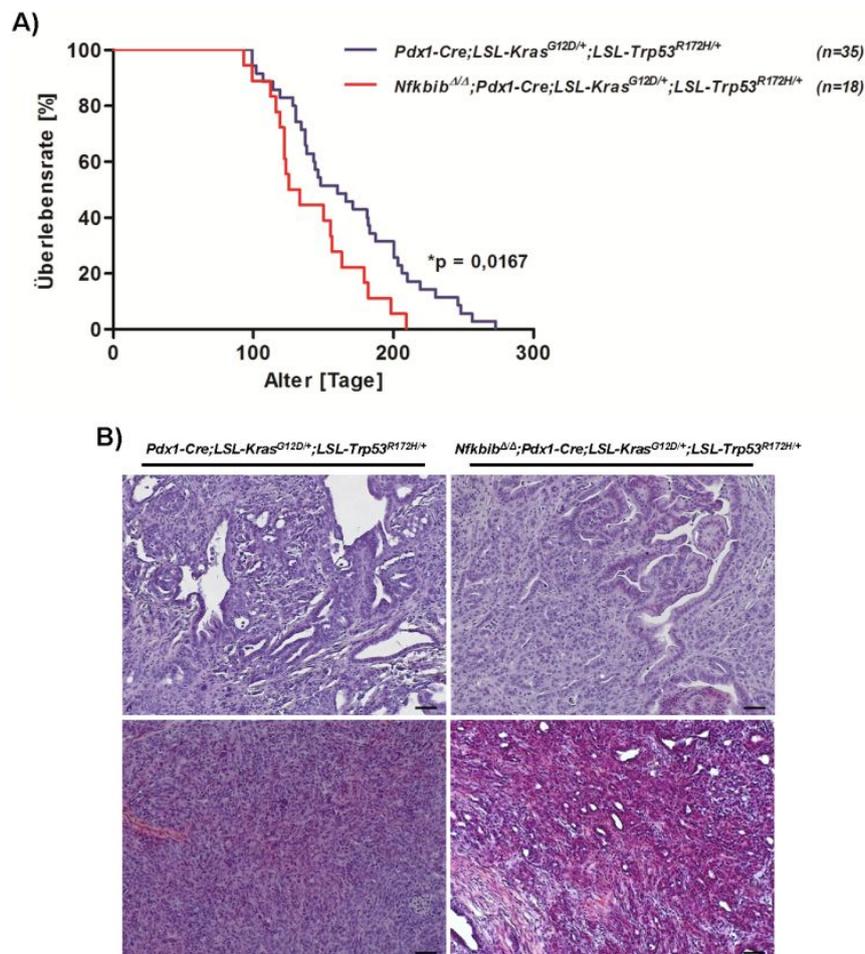


Abbildung 4.17: IκBβ-Defizienz in Kooperation mit *Kras*^{G12D} und *p53*^{R172H} akzeleriert die Entwicklung des dukталen Adenokarzinoms des Pankreas.

A) Die hier dargestellte Kaplan-Meier-Kurve gibt Auskunft über die Überlebenszeit der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse (n=18, mediane Überlebenszeit 129 Tage) im Vergleich zu den *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Kontrollmäusen (n=35, mediane Überlebenszeit 163 Tage) (*log-rank* Test). **B)** Gezeigt sind H&E-gefärbte Schnitte aus dukталen Adenokarzinomen des Pankreas (*Kras*^{G12D/+}) der *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}- und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse bei einer 100x Vergrößerung. Die Ausschnitte der Tumorgewebeschnitte zeigen gut differenzierte (G1; obere Reihe) und mäßig differenzierte bis undifferenzierte (G2/G3; untere Reihe) Bereiche des Pankreaskarzinoms (100x Vergrößerung; Maßstabbalken: 100 μm).

Während die *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Kontrollmäuse eine mediane Überlebenszeit von 163 Tagen aufwiesen, überlebten die *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse im Durchschnitt nur 129 Tage.

Trotz signifikant verkürzter Lebensdauer der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse entwickelten beide Mausmodelle solide Pankreastumore, die sich hinsichtlich Tumolvolumen und Tumorgewicht nur unwesentlich voneinander unterschieden (Abbildung 4.18A und B).

Auch die mikroskopische Analyse der Tumorgewebeschnitte zeigte keine Auffälligkeiten bzw. Besonderheiten in der Histologie der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse. In beiden Mausmodellen waren gut (G1) und mäßig bis undifferenzierte (G2/G3) Bereiche in den Tumoren zu erkennen (Abbildung 4.17B).

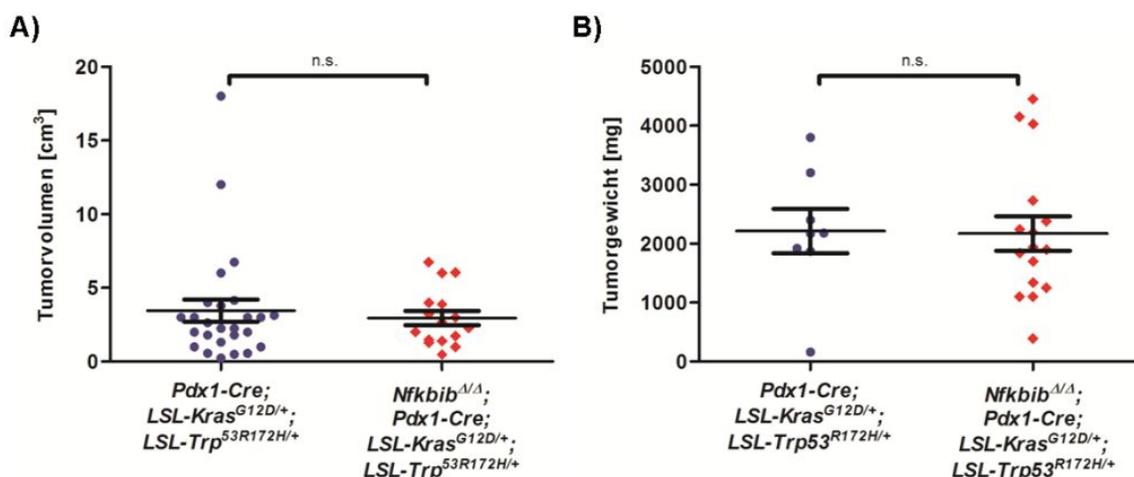


Abbildung 4.18: Die Pankreastumore der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse unterscheiden sich in Volumen und Größe nicht von den Pankreastumoren der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse.

A) Graphische Gegenüberstellung der Volumina der primären Pankreastumore (PPT) aus den *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=26) und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=16) Mäusen (links) (zweiseitiger unpaariger Student's t-test: n.s.). **B)** Graphische Gegenüberstellung der Gewichte der primären Pankreastumore (PPT) aus den *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=8) und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=16) Mäusen (rechts) (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Interessanterweise konnte trotz kürzerem Überleben in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen keine erhöhte Rate der Makrometastasen beobachtet werden (Tabelle 4.1).

Metastasen	<i>Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i> (n=35)	<i>Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i> (n=18)	p-Wert
Leber	13 (37,1 %)	4 (22,2 %)	0,3582
Lunge	3 (8,1 %)	-	-
Lymphknoten	9 (25,7 %)	-	-
keine	16 (45,7 %)	14 (77,8 %)	-

Tabelle 4-1: Rate der Makrometastasen in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen.

Tabellarische Aufstellung der makroskopisch erkennbaren Metastasen in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen, die einen primären Tumor im Pankreas entwickelten (Fisher's Exact Test).

Der prozentuale Anteil der makroskopisch erkennbaren Lebermetastasen in den *Nfkbib^{Δ/Δ};p53^{R172H/+}*-Mäusen war dagegen deutlich geringer als der in den *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen (Tabelle 4.1). Darüber hinaus bildeten sich in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-*

Trp53^{R172H/+}-Mäusen lediglich Lebermetastasen (22,2%) aus, während in den *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen neben Metastasen in der Leber (37,1%) auch Metastasen in der Lunge (8,1%) und in den Lymphknoten (25,7%) identifiziert wurden.

4.2.8 Die IκBβ-Defizienz im *Kras*^{G12D} und *p53*^{R172H} exprimierenden Pankreaskarzinommodell akzeleriert nicht die PanIN-Progression

Um detailliert zu prüfen, ob die akzelerierte Karzinogenese des Pankreaskarzinoms in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen (Abbildung 4.17A) mit einer schnelleren Progression der PanINs korreliert, wurden die PanINs zehn Wochen alter *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse mit den PanINs zehn Wochen alter *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse verglichen.

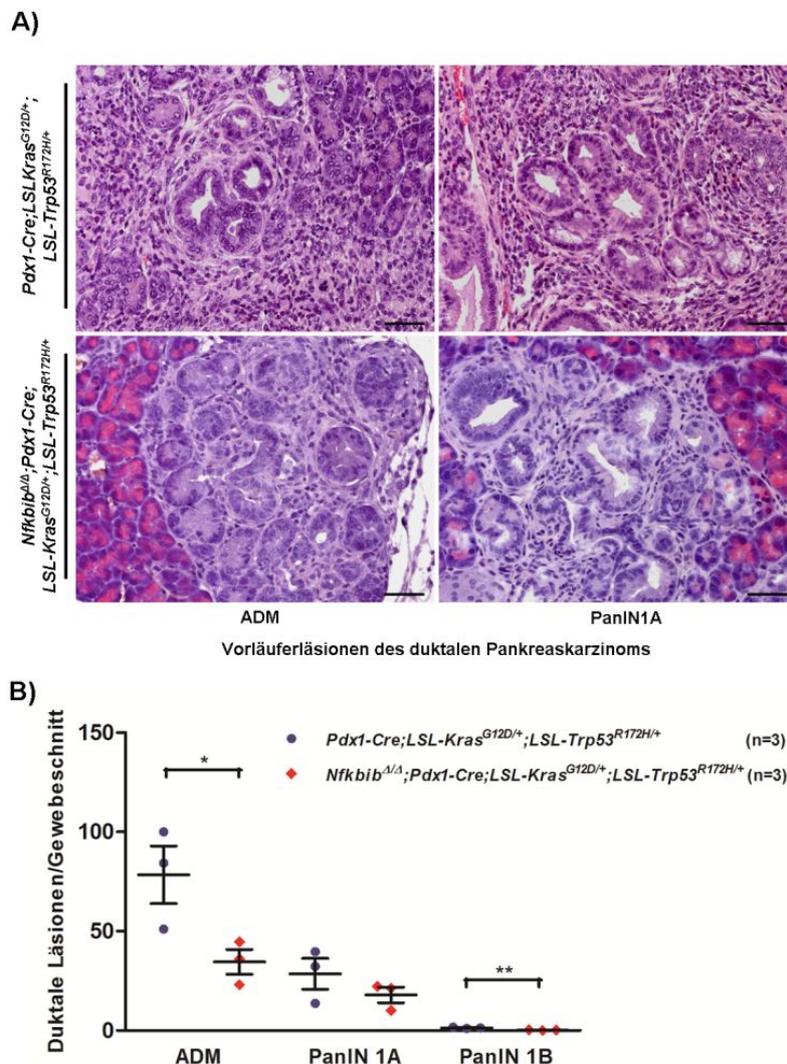


Abbildung 4.19: PanIN-Progression in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen.
A) H&E-gefärbte Pankreasgewebeschnitte zehn Wochen alter *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}- und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse (200x vergrößert; Maßstabballen: 100 μm). **B)** Quantifizierung der duktales Läsionen zehn Wochen alter *Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse (n=3) bzw. *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre;LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse (n=3). Pro Maus wurden jeweils drei Gewebeschnitte bei einer 200x Vergrößerung und einem Mindestabstand von etwa 100 μm ausgezählt (zweiseitiger unpaariger Student's t-Test).

Dabei konnten in den Pankreata beider Pankreaskarzinommodelle ADMs sowie die ersten Stufen der Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms PanIN 1A (Abbildung 4.19A) und sehr vereinzelt auch PanIN 1B (Abbildung 4.19B) identifiziert werden. Unerwartet waren mikroskopisch deutlich mehr ADMs im Pankreasgewebe der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse zu beobachten als in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse (Abbildung 4.19A).

Die Quantifizierung der duktaalen Vorläuferläsionen in beiden Mausmodellen verifiziert diese Beobachtung. Auch hier wurde eine signifikant höhere Anzahl an ADMs im Pankreasgewebe der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse gezählt (Abbildung 4.19B). Die Anzahl an PanIN 1A- und 1B-Läsionen hingegen unterschied sich in beiden Tumormausmodellen allenfalls marginal voneinander (Abbildung 4.19B).

Da nur in den Pankreasgeweben der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an ADMs festgestellt werden konnte, konnten aus diesen Beobachtungen keine Rückschlüsse auf die akzelerierte Karzinogenese des Pankreaskarzinoms in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen gezogen werden. Eine schnellere PanIN-Progression in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse scheint demnach nicht der Grund für das kürzere Überleben zu sein.

4.2.9 Die IκBβ-Defizienz führt zu einer verstärkten Translokation von NFκB/p65 in den Nucleus muriner *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen

Um erste Einblicke in die Funktion von IκBβ im murinen Pankreaskarzinommodell zu erarbeiten, wurden aus *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*- und *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen Pankreaskarzinomzellen isoliert und analysiert.

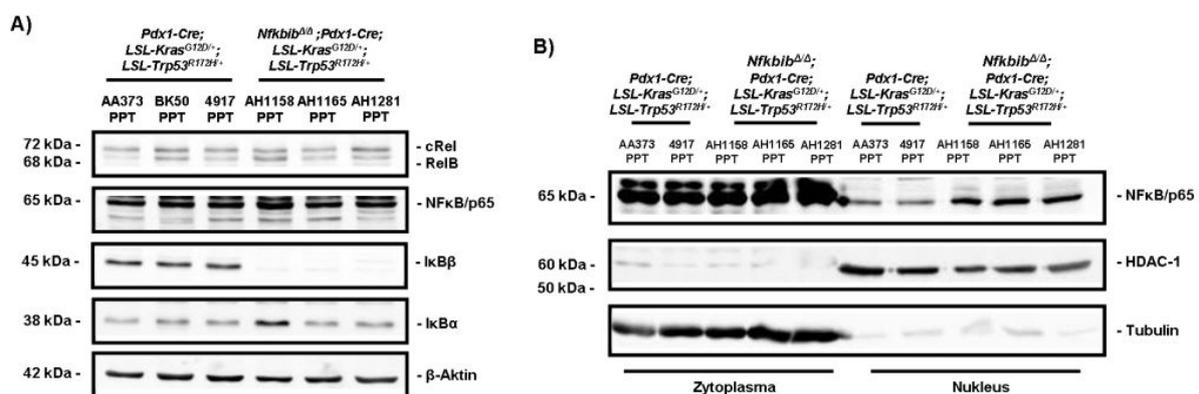


Abbildung 4.20: NFκB/p65 ist im Nucleus der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Zellen lokalisiert.
A) Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Expressionslevel der NFκB-Untereinheiten cRel, RelB und p65 sowie IκBα und IκBβ in den murinen Pankreaskarzinomzellen *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=3) und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* (n=3). **B)** Western Blot-Analyse zytosolischer und nukleärer Extrakte der murinen Pankreaskarzinomzellen AA373 PPT und 4917 PPT (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*) sowie AH1158 PPT, AH1165 PPT und AH1281 PPT (*Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*). α-Tubulin und HDAC-1 als Kontrollen.

Diese Zellen wurden auch hier zunächst auf die Expression der NFκB-Familienmitglieder cRel, RelB, NFκB/p65 und IκBα untersucht, da der Verlust eines IκB-Proteins die Expression anderer Mitglieder

des NFκB-Signalweges wie IκBα beeinträchtigen kann (Abbildung 4.14A). Es zeigte sich, dass der Verlust von IκBβ in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen keine aberrante Regulation der NFκB-Mitglieder cRel, RelB sowie NFκB/p65 zur Folge hatte. IκBα wurde lediglich in einem Zellysate aus *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Pankreaskarzinomzellen (AH1158 PPT) verstärkt exprimiert (Abbildung 4.20A).

Da aus einer stimulusabhängigen Degradation von IκB-Proteinen im NFκB-Signalweg eine Translokation der NFκB-Dimere in den Nukleus resultiert (siehe 1.4.2), wurde im nächsten Schritt überprüft, ob der Verlust von IκBβ ebenfalls mit einer erhöhten Translokation von NFκB/p65 assoziiert ist. Hierfür wurden zytosolische und nukleäre Extrakte der *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}- und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen hergestellt und analysiert. In den Nuklei der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen (AH1158, AH1165 und AH1281 PPT) konnte eine verstärkte NFκB/p65-Expression detektiert werden (Abbildung 4.20B), was auf eine erhöhte NFκB/p65-Translokation und -Aktivität in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen schließen lässt.

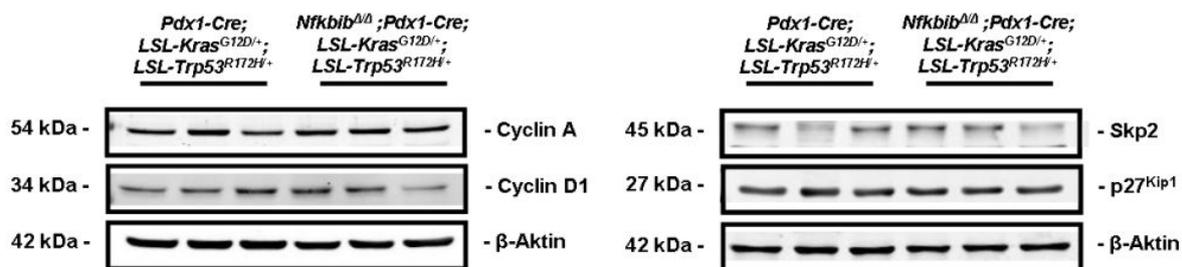


Abbildung 4.21: NFκB/p65-abhängige Expression Zellzyklus-regulierender Proteine wird durch verstärkte NFκB/p65-Expression im Nukleus nicht beeinflusst.

Western Blots zur Expressionsanalyse der Zellzyklusproteine Cyclin A, Cyclin D1, Skp2 und p27^{Kip1} in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen (n=3) und *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen (n=3).

Um zu untersuchen, ob der verstärkten Translokation von NFκB/p65 in den Nukleus der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen AH1158, AH1165 und AH1281 PPT eine erhöhte Expression von NFκB-Zielgenen folgt, wurde die Expression von Zellzyklusproteinen wie Cyclin D1, Skp2, Cyclin A und p27^{Kip1} untersucht (Abbildung 4.21). *Cyclin D1* und *Skp2* sind NFκB-Zielgene (Toualbi-Abed *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2006), deren aberrante Regulation eng mit der Tumorgenese assoziiert ist (Tashiro *et al.*, 2007; Gstaiger *et al.*, 2001). Hierbei zeigte sich jedoch, dass sich die Expression von Cyclin D1, Skp2, Cyclin A und p27^{Kip1} in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen nicht von den *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen unterschied (Abbildung 4.21). Die verstärkte Translokation/Aktivierung von NFκB/p65 in den Nukleus in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Zellen verursacht damit keine aberrante Regulation der Zellzyklusproteine Cyclin D1, Skp2, Cyclin A und p27^{Kip1}.

4.2.10 Identifizierung signifikanter E2F-Gensignaturen in murinem *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomgewebe

Um NFκB-abhängige Prozesse in den murinen Pankreaskarzinommodellen zu finden, wurden globale Genexpressionsanalysen durchgeführt und mit einer sogenannten Gengruppen-Anreicherungs-Analyse (kurz: *GSEA - Gene Set Enrichment Analysis*) untersucht.

Hierzu wurde den Proben aus *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen bzw. -gewebe, Proben aus *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen bzw. -gewebe als Kontrollen gegenübergestellt.

Pankreaskarzinomgewebe		ES	NES	NOMp	FDRq
<i>Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} vs. Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}</i>					
↗	SGCGSSAAA_V\$E2F1DP2_01	0.44	1.93	0.000	0.006
↗	V\$E2F1_Q6	0.42	1.92	0.000	0.003
↗	V\$E2F4DP2_01	0.41	1.90	0.000	0.003
↗	V\$E2F_02	0.41	1.89	0.000	0.002
↗	V\$E2F1DP1_01	0.41	1.89	0.000	0.002
↗	V\$E2F1DP2_01	0.41	1.89	0.000	0.002
↗	V\$E2F4DP1_01	0.39	1.79	0.000	0.005
↗	V\$E2F_Q6	0.38	1.78	0.000	0.006
↗	V\$E2F_Q4	0.38	1.75	0.000	0.008
↗	V\$E2F1_Q6_01	0.35	1.65	0.000	0.024
↗	V\$NRF2_Q4	0.36	1.64	0.000	0.023
↗	V\$E2F1_Q3	0.35	1.62	0.000	0.028

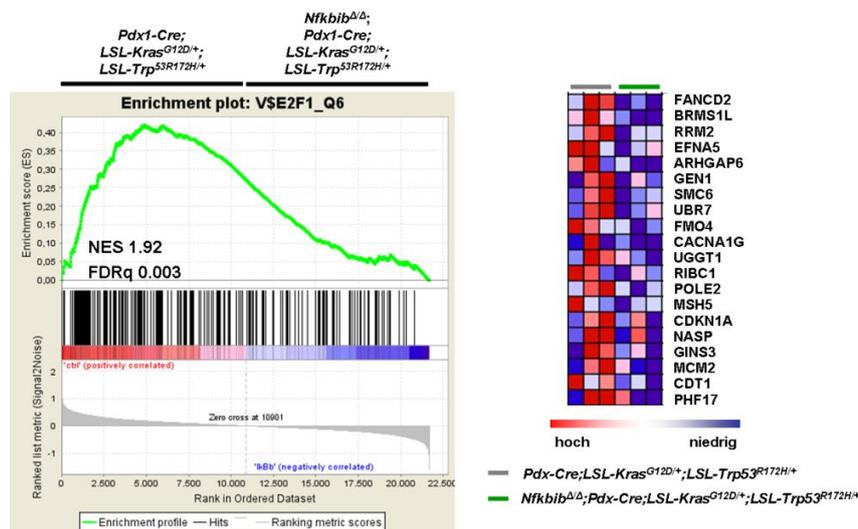


Abbildung 4.22: GSEA - Gene set enrichment analysis.

Oben: Gezeigt ist in tabellarischer Form die signifikante Anreicherung von Genen in murinen Pankreaskarzinomgewebe der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse im Vergleich zu *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen (*transcription factor target (TFT) genes*). **Unten:** Abgebildet ist das signifikante Anreicherungsprofil der Gene, welche sich eine gemeinsame DNA-Bindedomäne mit E2F1 teilen (*transcription factor target (TFT) genes*) sowie die dazugehörige Heatmap der Top 20 differentiell exprimierten Gene. ES=*enrichment score*, NES=*normalized enrichment score*, NOMp=*nominal p-value*, FDRq=*false discovery rate q-value*.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen eine signifikante Hochregulation von Zielgenen der E2F-Transkriptionsfaktor-Familie im Pankreaskarzinomgewebe der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse (Abbildung 4.22).

5 DISKUSSION

5.1 Wechselspiel zwischen dem Transkriptionsfaktor NFκB und dem Tumorsuppressor p53

Sowohl Mitglieder der NFκB- als auch der p53-Familie tragen als wichtige Schlüsselfaktoren zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei. Ihre Funktionen sind in der Entwicklung von Tumoren häufig dereguliert, wodurch beiden Faktoren bedeutende Rollen in der Tumorentstehung und -progression zugesprochen werden (O'Prey *et al.*, 2010; Schneider & Krämer, 2011). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Wechselwirkungen zwischen NFκB und p53 auf verschiedenen Ebenen zu beobachten sind (Perkins, 2007).

Wechselwirkungen zwischen NFκB und p53 sind in hohem Maße kontext- bzw. stimulusabhängig. Obwohl ihre Aktivitäten zunächst auf antagonistische Wirkungsweisen schließen lassen, existieren bereits auch mehrere Belege für eine synergistische Funktion des Wechselspiels zwischen NFκB und p53 (Schneider & Krämer, 2011; Tergaonkar & Perkins, 2007). Inwiefern diese beiden Faktoren während der Karzinogenese und Tumoraufrechterhaltung miteinander agieren und welche Konsequenz hierbei eine mögliche Interaktion zwischen NFκB und p53 mit sich bringt, ist bisher noch unzureichend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde in murinen Pankreaskarzinomzellen eine transkriptionelle Kooperation zwischen NFκB und dem mutierten p53, p53^{R172H}, entdeckt, die zur Expression des antiapoptotischen NFκB-Zielgens *Survivin* führte. Hierüber scheint der NFκB/p53^{R172H}-Komplex das Überleben von Pankreastumoren unter verschiedenen Stressbedingungen sicherzustellen. Darüber hinaus konnte in humanen Kolonkarzinomzellen auch eine gemeinsame Bindung von NFκB und p53-Wildtyp (p53^{WT}) an die Promotoren der NFκB-Zielgene *FasL* und *MnSOD* festgestellt werden.

5.1.1 Wechselspiel zwischen p53^{R172H} und NFκB/p65

In >50% humaner Tumoren liegen Mutationen im *TP53*-Gen, welches für p53 kodiert, vor. Diese genspezifischen Veränderungen sind nicht nur mit dem Verlust der Tumorsuppressor-Aktivität assoziiert (*loss of function*), sondern häufig auch mit der Erlangung neuer Funktionen (Suh *et al.*, 2011; Oren & Rotter, 2010).

Tumorsuppressoren werden häufig durch *frameshift*- oder *nonsense*-Mutationen inaktiviert. Die überwiegende Mehrheit genspezifischer Veränderungen im *TP53*-Gen bilden allerdings *missense*-Mutationen, welche einen Aminosäureaustausch zumeist in der DNA-Bindedomäne zur Folge haben (Muller & Vousden, 2014; Freed-Pastor & Prives, 2012). In der Folge wird ein mutiertes, aber vollständig langes p53-Protein exprimiert, welches aufgrund seiner intakten Tetramerisierungsregion verbleibendes p53^{WT} inaktivieren kann. Durch diese Hetero-Oligomerisierung wirkt mutiertes p53 dominant-negativ über p53^{WT} (Muller & Vousden, 2014; Okal *et al.*, 2014). Darüber hinaus können p53-mutierte Proteine auch onkogenes Potential erlangen (*gain of function*), die tumorrelevante Eigenschaften wie Invasion, Proliferation und Metastasenbildung positiv beeinflussen können und

zudem protektiv gegenüber chemotherapeutischen Agenzien wirken (Sigal & Rotter, 2000; Muller & Vousden, 2013; Blandino *et al.*, 1999). Hierzu zählt auch die murine p53-Mutation p53^{R172H}, welche zur p53-Mutation p53^{R175H} in humanen Tumoren analog ist. In früheren Studien konnte p53^{R172H} bereits eine onkogene Funktion in Pankreaskarzinommodellen zugesprochen werden (Morton *et al.*, 2010), wobei die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von p53^{R172H} in murinen Pankreaskarzinomzellen nicht nur eine verminderte Sensitivität gegenüber den Topoisomerase II-Inhibitoren Doxorubicin und Etoposid hervorruft, sondern auch gegenüber externen Apoptosestimuli wie TNF α protektiv zu wirken scheint, was in beiden Fällen für einen *gain of function*-Effekt von p53^{R172H} spricht. Topoisomerase II ist ein Enzym, welches essentiell an der DNA-Replikation, der Chromosomenkondensation und -verteilung beteiligt ist (Wang, 2002). Topoisomerase II-Inhibitoren werden daher routinemäßig für die Behandlung von malignen Tumoren eingesetzt (Wennerberg *et al.*, 2013; Baldwin & Osherooff, 2005). TNF α zählt zu den apoptoseauslösenden Faktoren über den extrinsischen Weg und ist ein klassischer Aktivator des NF κ B-Heterodimers p50/p65 (Hamacher *et al.*, 2008). Basierend auf dieser Tatsache und aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Studien, welche ebenfalls eine verminderte TNF α -Sensitivität in einer humanen p53^{R175H}-überexprimierenden Lungenkarzinomzelllinie (H1299) zeigte (Weisz *et al.*, 2007), legen die hier dargestellten Daten den Schluss nahe, dass mutiertes p53 die NF κ B-Aktivierung in Pankreaskarzinomzellen nach Zytokinstimulation fördert. Belegt wurde dies durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation sowohl von p53^{R172H} als auch von NF κ B/p65, was in einer erhöhten Caspase-Aktivität und demzufolge in einer verstärkten TNF α -induzierten Apoptose der p53^{R172H}-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen resultierte.

Auch ohne Einfluss äußerer Faktoren konnte eine Korrelation zwischen der Expression von p53^{R172H} und NF κ B-abhängigen Zielgenen, die an der Regulation des Zellüberlebens beteiligt sind, festgestellt werden (Schneider *et al.*, 2010). Dabei ließ sich in p53^{R172H}-rekonstituierten Pankreaskarzinomzellen auch ohne vorherige TNF α -Stimulation eine Induktion des antiapoptotischen NF κ B-Zielgens *Survivin* detektieren. Demzufolge scheint mutiertes p53 die antiapoptotische NF κ B-Basalaktivität in Tumorzellen zu erhöhen, welche jedoch unter Einfluss eines NF κ B-aktivierenden Stimulus wie TNF α noch weiter verstärkt wird.

Verschiedene Veröffentlichungen zeigen die Interaktion von mutiertem p53 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise TAp63, einem Transkriptionsfaktor und Mitglied der p53-Proteinfamilie (Muller & Vousden, 2014; Strano *et al.*, 2002; Gaiddon *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine direkte Interaktion zwischen p53^{R172H} und NF κ B/p65 in murinen Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden. Hierbei war nicht nur erst nach TNF α -Behandlung eine gemeinsame Bindung von p53^{R172H} und NF κ B/p65 an eine κ B-Konsensussequenz zu detektieren, sondern auch unter nativen Bedingungen scheint sich ein Transkriptionsfaktor-Komplex aus p53^{R172H} und NF κ B/p65 auszubilden. Dabei wird p53^{R172H} über NF κ B/p65 an die κ B-Konsensussequenz rekrutiert, da mutiertes p53 nicht fähig ist, an Promoterregionen entsprechender Zielgene zu binden (Muller & Vousden, 2014).

Die hier gezeigten Daten liefern erste Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung zwischen dem NF κ B- und dem deregulierten p53-Signalweg im Pankreaskarzinom. Hierüber erlangt p53^{R172H} eine neue

onkogene Funktion im Pankreaskarzinom. Damit übereinstimmend ist die Beobachtung, dass die humane p53^{R175H}-Mutation, die der murinen p53^{R172H}-Mutation analog ist, die nukleäre Lokalisation und Aktivität von induziertem NFκB/p65 verlängert (Weisz *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte in vorherigen Studien bereits eine positive Korrelation zwischen der Expression von mutiertem p53 und der nukleären NFκB/p65-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Nackenbereichs sowie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC - *non-small squamous cell carcinoma*) nachgewiesen werden (Weisz *et al.*, 2007; Meylan *et al.*, 2009). Ähnliche Daten wurden auch für das kolorektale Karzinom gezeigt. Auch hier wirkt die mutierte Variante von p53 verstärkend auf die NFκB-Aktivität, wodurch chronische Entzündungen und die entzündungsassoziierte Kolorektalkarzinogenese gefördert werden (Cooks *et al.*, 2013).

Ebenso wie die in vorherigen Studien gezeigten Daten liefern auch die hier dargestellten Ergebnisse einen weiteren Beitrag zur Klärung, weshalb in Tumoren eher das Auftreten von p53-Mutationen als von p53-Deletionen begünstigt wird (Deppert, 2007).

5.1.2 Wechselspiel zwischen p53-Wildtyp und NFκB/p65

Der Tumorsuppressor p53 ist ein zentraler Regulator, dessen zelluläre Akkumulationsmengen über Zellüberleben oder Apoptose entscheiden. Geringe p53-Proteinmengen fördern die Aktivierung von Genen, die mit Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Seneszenz assoziiert sind. Hierunter fällt beispielsweise die Aktivierung von *p21^{Cip1}*. Höhere p53-Proteinkonzentrationen aktivieren die p53-abhängige, proapoptotische Genexpression. Hierbei werden Gene wie *PUMA*, *BAX* und *NOXA* transkribiert. Dieser Dosis-abhängige Prozess wird auch als Hormesis bezeichnet (Schneider & Krämer, 2011).

Im Gegensatz zu p53^{R172H}, welches in Tumoren sehr stabil und demzufolge in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, ist das p53-Wildtypprotein sehr kurzlebig und liegt in unstimulierten Zellen nur in sehr geringen Mengen vor (Terzian *et al.*, 2008). Als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie DNA-Schädigung, Hypoxie und onkogenen Stress wird p53WT stabilisiert und reguliert vielfältige biologische Prozesse wie DNA-Reparatur und Zellzyklus, aber auch Apoptose und Seneszenz (Vousden & Prives, 2009). Eine Reaktivierung von p53WT in Tumorzellen erweist sich daher zunächst als eine attraktive Strategie in der Krebsbehandlung, wie auch bereits in einigen *in vivo*-Modellen gezeigt werden konnte. Tumore, in denen p53WT reaktiviert wurde, zeigten eine deutliche Reduktion der Tumorgöße, hervorgerufen durch Apoptoseinduktion und Seneszenz (Martins *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2007). Eine erfolgreiche Stabilisierung von p53WT konnte bereits mit Hilfe von niedermolekularen Substanzen wie Nutlin, einem p53-Mdm2-Bindungsinhibitor, erzielt werden und findet daher auch Gebrauch in der klinischen Anwendung (Vassilev *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Substanzen wie Hydroxyurea (HU) die Stabilisierung von p53WT fördern. HU ist ein Zytostatikum und induziert einen Replikationsarrest durch Inhibierung der Ribonukleotidreduktase (Schrell *et al.*, 1996; Koç *et al.*, 2004). Die Ribonukleotidreduktase katalysiert die Biosynthese von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Synthese (Koç *et al.*, 2004). Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Ribonukleotidreduktase-Aktivität mit malignen Zellveränderungen und Tumorstadium assoziiert ist (Tsimberidou *et al.*, 2002).

Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren wie HU finden daher häufig Anwendung in der Behandlung von hämatologischen Tumoren (Schrell *et al.*, 1996).

In humanen p53-profizienten Kolonkarzinomzellen konnte neben der HU-induzierten Stabilisierung von p53WT auch die Induktion NFκB-abhängiger Zielgene wie *TRAF1*, *FasL*, *MnSOD*, *Survivin* und *Bcl-x_L* beobachtet werden (Schneider *et al.*, 2010). Dies ließ annehmen, dass nicht nur die p53-Mutation p53^{R172H} zur Aktivierung von NFκB-abhängigen Zielgenen beiträgt, sondern auch wildtypisches p53 Einfluss auf die NFκB-Aktivität haben könnte. Bestätigt wurde dies, indem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass der durch HU-induzierte Replikationsarrest eine Rekrutierung von sowohl NFκB/p65 als auch p53WT an die Genpromotoren der NFκB-Zielgene *FASL* und *MnSOD* hervorruft, was auf die Ausbildung eines transkriptionell aktiven Komplexes aus NFκB/p65 und p53WT an spezifische Promotoren schließen lässt. Damit übereinstimmend zeigten frühere Studien, dass sowohl *MnSOD* als auch *FASL* nicht nur durch NFκB, sondern auch durch p53 reguliert werden (Vousden, 2010; Singh *et al.*, 2007). Dabei ist die Aktivierung von *MnSOD* von der in Zellen vorhandenen p53-Konzentrationsmenge abhängig. Während sich der MnSOD-Spiegel durch Transfektion einer geringen p53-Konzentration in p53-defiziente Prostatakarzinomzellen erhöht, wird er durch hohe p53-Mengen supprimiert (Dhar *et al.*, 2010). Möglicherweise beeinflusst der hier beobachtete NFκB/p65-p53WT-Komplex die Entscheidung, ob eine p53-abhängige Reparaturfunktion in die Aktivierung pro-apoptotischer Gene übergehen soll oder nicht.

In aggressiven Tumoren konnte bereits eine Hochregulation von FasL beobachtet werden, die das Überleben und Wachstum der Tumorzellen fördert (O'Brien *et al.*, 2005). Die in Tumorzellen unterschiedlicher Gewebetypen (Haut-, Darm-, Brust- und Speiseröhrenkrebs) detektierbare FasL-Expression verschafft diesen Zellen einen Vorteil, indem sie die Apoptose von Anti-Tumor spezifischen T-Zellen vermittelt (Andreola *et al.*, 2002) und infolgedessen die Aufrechterhaltung des Tumors fördert.

Auch unter TNFα-Exposition scheint p53WT Einfluss auf die NFκB-Signaltransduktion zu haben, da sich zeigte, dass p53-profiziente Kolonkarzinomzellen weniger sensitiv gegenüber TNFα sind als p53-defiziente Zellen. Ursache könnte hier die durch TNFα-Behandlung der p53-positiven Kolonkarzinomzellen hervorgerufene, konzentrationsabhängige Expression des NFκB-abhängigen, antiapoptotischen Zielgens *Bcl-x_L* sein (Schneider *et al.*, 2010). Die durch TNFα-induzierte p53WT-abhängige NFκB-Aktivierung zeigt eine bisher nicht bekannte Kontrollfunktion von p53WT im Zytokin-Signalweg.

In umgekehrter Richtung ist die TNFα-vermittelte Induktion des proapoptotischen p53-Zielgens *PUMA* NFκB-abhängig, die Regulation jedoch von p53 unabhängig (Wang *et al.*, 2009). Die Behandlung der p53-positiven Kolonkarzinomzellen mit Etoposid hingegen zeigte, dass die Induktion von *PUMA* in diesen Zellen NFκB/p65-unabhängig ist. Etoposid induziert die Expression von p53WT und damit auch die Transaktivierung des p53-abhängigen Zielgens *PUMA*, jedoch wird die *PUMA*-Expression nicht durch die siRNA-vermittelte Herunterregulation von NFκB/p65 beeinträchtigt. Diese Diskrepanz in der p53- und NFκB-abhängigen Aktivierbarkeit von *PUMA* scheint durch die Art des Stimulus bestimmt zu werden. Bekannt ist, dass das Wechselspiel zwischen p53 und NFκB in seiner Intensität und Konsequenz kontext- bzw. stimulusabhängig ist (Tergaonkar & Perkins, 2007). Zudem können beide Transkriptionsfaktoren je nach Kontext bzw. Stimulus auf verschiedenen Ebenen miteinander

wechselwirken, so dass sie kooperativ oder aber auch antagonistisch wirken können (Scian *et al.*, 2005; Schumm *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Weisz *et al.*, 2007; Nestic *et al.*, 2008; Szoltysek *et al.*, 2008).

Die transkriptionelle Aktivität sowohl von NFκB als auch von p53 wird des Weiteren durch die Aktivierung und Interaktion mit Kofaktoren beeinflusst, die ebenfalls stimulusabhängig oder zelltypspezifisch durch NFκB oder p53 an die DNA rekrutiert werden (Hayden & Ghosh, 2012; Beckermann & Prives, 2010). Hierbei ist beispielsweise die Rekrutierung von sogenannten Histon-Acetyltransferasen (HATs) zu erwähnen, die durch verschiedenartige Stimuli erfolgt. So konnte bereits gezeigt werden, dass die durch Apoptosestimuli hervorgerufene Rekrutierung von phosphoryliertem Tip60 an den Promotor von PUMA die Acetylierung von p53 induziert, wodurch PUMA induziert, die Expression des p53-Zielgens p21 jedoch nicht gefördert wird (Charvet *et al.*, 2011). Zudem konkurrieren sowohl NFκB als auch p53 um Kofaktoren wie CBP (*CREB-binding protein*) und p300 (Dhar *et al.*, 2010). CBP und p300 vermitteln die Kommunikation zwischen Transkriptionsfaktoren und der Transkriptionsmaschinerie, was sich entscheidend auf die folgende Transkription auswirkt (Huang *et al.*, 2007). Ob bzw. welche Kofaktoren an dem Wechselspiel zwischen NFκB und p53 beteiligt sind, muss in weiteren Studien geklärt werden.

5.1.3 Modelle und Auswirkungen des Wechselspiels zwischen NFκB/p65 und p53

Die hier aufgezeigten Analysen demonstrieren, dass sowohl p53^{R172H} als auch p53^{WT} die NFκB-Aktivität verstärken und somit die Tumorprogression bzw. das Zellüberleben fördern (Abbildung 5.1).

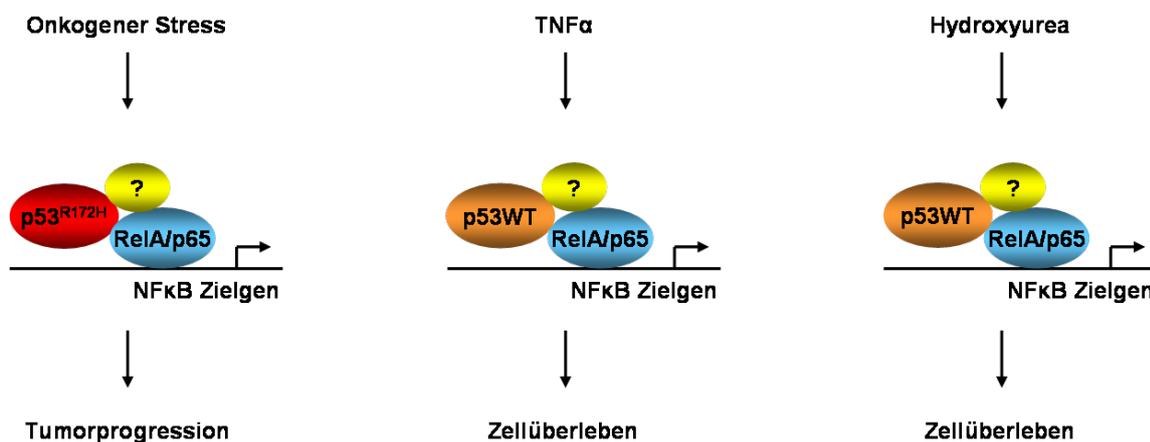


Abbildung 5.1: Modelle für das NFκB/p65 - p53 Wechselspiel.

Mutiertes p53 fördert die konstitutive NFκB-Aktivität durch eine verstärkte Expression antiapoptotischer NFκB-Zielgene in Tumorzellen und fördert dadurch die Tumorprogression. Nach TNFα-Stimulation binden p53^{R172H} und NFκB/p65 gemeinsam an eine κB-Konsensussequenz. Zudem wird die TNFα-induzierte NFκB-Aktivität durch p53^{WT} verstärkt. HU-induzierter Replikationsstress ist assoziiert mit der transkriptionellen Kooperation von NFκB/p65 und p53^{WT} an Promotoren von NFκB-Zielgenen. Dadurch wird die Aufrechterhaltung von Tumorzellen begünstigt.

Neben dem Beitrag zum Zellüberleben von Tumorzellen nimmt das Wechselspiel zwischen p53 und NFκB auch in einigen weiteren Prozessen eine wichtige Rolle ein. Darunter zählen unter anderem Zellzyklusprogression, Apoptose, Metastasierung, Immunüberwachung sowie die Regulierung des Stoffwechsels (Schneider & Krämer, 2010).

5.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Transkriptionsfaktoren NFκB und p53 entscheiden über das Schicksal von Zellen und sind in die Pathogenese der meisten Tumore involviert. Daher ist das im ersten Teil der Arbeit beobachtete Wechselspiel zwischen p53 und NFκB als ein wichtiger Regulator der Tumorgenese anzusehen. Die Ergebnisse zeigen einen Beitrag von sowohl p53WT als auch p53^{R172H} zur nukleären NFκB-Aktivität. Unter bestimmten Bedingungen wie S-Phasearrest bildet p53WT mit NFκB/p65 einen transkriptionell aktiven Komplex an den Promotoren der NFκB-abhängigen Zielgene *MnSOD* und *FasL*, wodurch das Überleben von Tumorzellen sichergestellt wird.

Die über p53^{R172H} verstärkte NFκB/p65-abhängige Expression von *Survivin* bewirkt eine Überlebensfunktion von NFκB im Pankreaskarzinom und stellt daher eine attraktive Zielstruktur in der Behandlung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas dar. Dabei scheint die vollständige Degradierung des mutierten p53-Proteins im Vordergrund zu stehen. In der Literatur werden bereits einige Substanzen beschrieben, welche im Stande sind, mutiertes p53 zu destabilisieren.

Hier ist beispielsweise der Einsatz von HDAC-Inhibitoren zu nennen, welche durch die Inhibierung des Zellwachstums antitumorale Effekte ausüben (Aldana-Masangkay & Sakamoto, 2011). HDAC-Inhibitoren wie SAHA destabilisieren mutierte p53-Proteine, indem sie die deacetylierende Wirkung von HDAC6 herabsetzen. Dadurch dissoziiert der stabilisierende *Hsp70/Hsp90*-Komplex von dem mutierten p53-Protein, wodurch dieses für die Proteasom-vermittelte Degradierung durch die E3-Ubiquitin-Ligasen MDM2 und CHIP (*carboxy-terminus of Hsc70 interacting protein*) zugänglich wird (Li *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2011b).

Dass sich mutiertes p53 als therapeutisches Angriffsziel in der Behandlung eines Pankreaskarzinoms tatsächlich als geeignet erweist, belegt eine aktuelle *proof-of-principle*-Studie. *In vivo* konnte hier gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie aus SAHA und dem HSP90-Inhibitor 17DMAG das Überleben von Mäusen, die mutiertes p53 exprimieren, signifikant verlängert (Alexandrova *et al.*, 2015).

Fernerhin stellen auch NFκB-abhängige Zielgene, deren Expression über p53^{R172H} verstärkt wird, wie hier für *Survivin* gezeigt, attraktive Angriffspunkte für Chemotherapeutika dar. *Survivin* ist ein Mitglied der IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie und liefert in vielen Tumorzellen einen essentiellen Beitrag zur Chemoresistenz bzw. zum Überleben von Krebszellen (Mobahat *et al.*, 2014). In klinischen Studien konnte das gegen *Survivin* gerichtete eingesetzte Medikament YM-155 bereits positive Resultate erzielen (Giaccone *et al.*, 2009).

5.2 Einfluss des NFκB-Inhibitors beta (IκBβ) auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms

IκB-Proteine besitzen im NFκB-Signalweg eine Schlüsselfunktion, da sie die NFκB-Aktivität durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors NFκB im Zytoplasma kontrollieren (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Der NFκB-Signalweg ist in humanen Tumoren häufig dereguliert (Shen & Tergaonkar, 2009). Diese Deregulation spiegelt sich zumeist in einer konstitutiven NFκB-Aktivierung wider (Yamamoto & Gaynor, 2004). Zahlreiche Studien demonstrieren einen Beitrag von NFκB in der Karzinogenese, Progression und Tumoraufrechterhaltung im Pankreaskarzinom (Aggarwal, 2004; Meylan *et al.*, 2009). Die Rolle des NFκB-Inhibitors IκBβ ist hierbei aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die in diesem Teil der Arbeit gezeigten Daten über die Funktion von IκBβ in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms liefern erste Hinweise, dass IκBβ die Entstehung und Entwicklung eines Pankreaskarzinoms in einem genetisch definierten Mausmodell zum einen in Abhängigkeit des p53-Status und zum anderen durch eine verstärkte NFκB-Aktivität moduliert.

5.2.1 Verminderte Zytokinexpression in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen hat keinen Einfluss auf die Karzinogenese eines Pankreaskarzinoms

Der Transkriptionsfaktor NFκB reguliert maßgeblich die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-8 und TNFα (Roshani *et al.*, 2014). Proinflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellwachstums und der Metastasierung von Tumoren (Li *et al.*, 2012). Die in Pankreaskarzinomen häufig detektierte Überexpression von Zytokinen wie IL-6 und IL-8 ist eng mit Zellwachstum assoziiert und stellt daher einen guten Angriffspunkt für die Behandlung eines Pankreastumors dar (Feurino *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Scheibel *et al.* und Rao *et al.* konnten mit Hilfe von murinen IκBβ-*Knockout*- und WT-Modellen bereits zeigen, dass die Zytokinexpression in Abhängigkeit von IκBβ reguliert wird (Scheibel *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte in vier Wochen alten *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäusen ebenfalls eine verminderte Zytokinexpression auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Im Vergleich zu *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäusen waren hier neben IL-6 und KC, welches aufgrund seiner Aktivierung eine funktionelle Homologie zu dem humanen IL-8 aufweist (Singer & Sansonetti, 2004), auch die proinflammatorischen Zytokine wie TNF-α und IL-1β herunterreguliert, was zunächst ebenfalls auf eine IκBβ-abhängige Regulation schließen lässt. Basierend auf diesen Beobachtungen und der Tatsache, dass proinflammatorische Zytokine das Zellwachstum fördern (Li *et al.*, 2012), ließ die hier aufgezeigte verminderte Zytokinexpression Grund zur Annahme, dass es in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen möglicherweise zu einer prolongierten Progression eines Pankreaskarzinoms kommen könnte, wie dies auch bereits für IKKβ *knockout*-Mäuse beobachtet werden konnte (Xia *et al.*, 2012). Allerdings erbrachte die Analyse der Überlebenszeit der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäuse keinen signifikanten Unterschied zu der Überlebenszeit der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäuse.

Neben einer I κ B β -abhängigen Regulation könnte die hier beobachtete verminderte Zytokinexpression im Pankreasgewebe der *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse auch mit einer verminderten Infiltration von Makrophagen korrelieren. Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) sind wesentliche Bestandteile des Mikromilieus in neoplastischen Geweben und bilden eine der wichtigsten Quellen für Zytokine (Coussens & Werb, 2002).

Die F4/80-Expressionsanalyse zeigte allerdings, dass die in pankreatischen Gewebeschnitten zwölf Wochen alter *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse herunterregulierte Zytokinexpression nicht mit einer verminderten Anzahl von Makrophagen im Tumorgewebe einhergeht. Unerwarteterweise wurde hier eine signifikant verstärkte Expression von F4/80 in den Geweben der *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen detektiert, was zunächst auf eine stark erhöhte Makrophageninfiltration schließen lässt. F4/80 bildet das murine Homolog des humanen EMR1 (*EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1*) und ist ein auf der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiertes Transmembranprotein (Hamann *et al.*, 2007).

Die gezeigten Daten legen den Schluss nahe, dass die verminderte Zytokinexpression von IL-1 β , IL-6, TNF α und KC in den *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nicht durch eine verminderte Anzahl rekrutierter Makrophagen zu erklären ist, sondern tatsächlich von I κ B β abhängig zu sein scheint, wie es auch bereits aus vorangegangenen Daten zu entnehmen ist (Scheibel *et al.*, 2010). Da es sich in dem verwendeten *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell nicht um einen konditionellen *Knockout* für I κ B β handelt, sondern hier ein genereller *Knockout* für I κ B β vorliegt, ist I κ B β auch in Makrophagen depletiert, was wiederum auf eine I κ B β -abhängige Expression der untersuchten Zytokine zurückzuführen ist (Scheibel *et al.*, 2010). Dennoch scheint die verminderte Expression der untersuchten Zytokine keine Relevanz für das Tumorstadium in *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen zu haben. Basierend auf der Tatsache, dass TAMs viele Zytokine, Chemokine und Proteasen sezernieren, die die Tumorangio-genese, das Tumorstadium und die Metastasierung fördern (Hao *et al.*, 2012), wäre es denkbar, dass die in das *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreasgewebe rekrutierten Makrophagen auch weitere Botenstoffe sezernieren, deren Regulation I κ B β -unabhängig ist. Infolgedessen könnte die hier detektierte verminderte Expression von IL-1 β , IL-6, TNF α und KC kompensiert werden.

Die Migration von Makrophagen wird von Chemokinen wie CXCL12 und Zytokinen wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gefördert (Hao *et al.*, 2012). VEGF liegt in Pankreastumoren überexprimiert vor und fördert das Tumorstadium (Tsuzuki *et al.*, 2001). Die signifikant verstärkte Infiltration der TAMs im Pankreasgewebe zwölf Wochen alter *Nfkbib Δ/Δ ;Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse könnte darauf basieren, dass die Tumorzellen der beiden Mausmodelle unterschiedlich stark oder gar unterschiedliche Lock-/Botenstoffe exprimieren, wodurch die TAMs angelockt werden. Ein hoher CCL2-Spiegel beispielsweise korreliert mit einer verstärkten Anzahl von TAMs (Hao *et al.*, 2012). Eine divergente Expression von Botenstoffen könnte mit der Deletion von I κ B β in Zusammenhang stehen. In den Nuclei der Pankreaskarzinomzellen aus *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen ließ sich eine, wenn auch nur sehr schwache, Expression von I κ B β detektieren, was auf eine nukleäre Funktion hinweisen könnte. Demzufolge könnte eine divergente Regulation von Botenstoffen tatsächlich in Abhängigkeit zu I κ B β stehen, zumal für I κ B β bereits eine Rolle als transkriptioneller

Koaktivator in der LPS-induzierten Transkription von IL-1 β beschrieben werden konnte (Scheibel *et al.*, 2010).

5.2.2 Der Verlust von I κ B β im murinen *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell scheint durch I κ B α kompensiert zu werden

Dass jedes I κ B-Familienmitglied eine einzigartige, nicht-redundante Funktion im NF κ B-Signalweg besitzt, konnte bereits mit Hilfe verschiedener *Knockout*-Mausmodelle gezeigt werden. Der generelle *knockout* von I κ B α im Mausmodell beispielsweise ist letal. Die Tiere sterben aufgrund einer exzessiven Granulopoese und Dermatitis sieben bis zehn Tage nach der Geburt (Beg *et al.*, 1995; Klement *et al.*, 1996). In p100 (NF κ B2) defizienten-Mäusen resultiert der *Knockout* in einer gastrischen Hyperplasie und einer verstärkten Proliferation von Lymphozyten (Ishikawa *et al.*, 1997). Bcl3-defiziente Mäuse entwickeln sich normal, sind jedoch unfähig, eine antigenspezifische Immunantwort auszulösen (Franzoso *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 1997). Trotz dieser bereits bekannten Daten bleibt zu erwähnen, dass die Analyse der eindeutigen Funktion der einzelnen I κ B-Proteine durch mögliche Kompensationsmechanismen erschwert wird. Das Fehlen eines I κ B-Familienmitgliedes kann durch ein anderes I κ B-Familienmitglied ersetzt werden (Hinz *et al.*, 2012).

Die generelle Deletion von I κ B β in einem murinen, genetisch definierten, *Kras^{G12D}*-abhängigen Pankreaskarzinommodell wies äußerlich zunächst keine phänotypischen Abnormalitäten auf. Die Mäuse waren fertil und entwickelten sich bis ins Erwachsenenalter wie Wildtypmäuse. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass I κ B β -*Knockout*-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen einen Immunphänotypen aufweisen, der sich durch die supprimierte Expression der Zytokine IL-1 β und TNF α auszeichnet (Scheibel *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2010).

Obwohl I κ B β eine der Schlüsselfunktionen in der NF κ B-Aktivierung zugesprochen wird (Oeckinghaus & Ghosh, 2009) und eine konstitutive NF κ B-Aktivität in soliden Tumoren zu beobachten ist, die die Proliferation von Tumorzellen fördert (Arlt & Schäfer, 2002), konnte in der Entstehung und Progression eines Pankreaskarzinoms in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen kein signifikanter Unterschied zu den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Kontrollmäusen beobachtet werden. Die PanIN-Progression der vier und zwölf Wochen alten Mäuse wies zwischen beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede auf.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust von I κ B α durch das Einbringen einer I κ B β -kodierenden Region in den I κ B α -Locus einer Maus (*Knockin*) in einer mit Wildtypmäusen vergleichbaren Viabilität resultiert (Cheng *et al.*, 1998), was für einen Kompensationsmechanismus spricht. In der *in vitro*-Analyse von *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen konnte tatsächlich eine Hochregulation von I κ B α auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese Überexpression von I κ B α könnte auf einen kompensatorischen Effekt von I κ B β hinweisen. Möglicherweise übernimmt I κ B α hier die inhibierende Funktion der fehlenden I κ B β -Untereinheit, so dass es nicht zu einer verstärkten NF κ B-Translokation in den Nukleus kommt, die beispielsweise die Entstehung und Progression eines Pankreastumors fördern würde. Diese Hypothese konnte durch die Analyse zytosolischer und nukleärer Fraktionen der *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und

Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}-Zellen unterstützt werden. Auf Proteinebene konnte weder im Zytosol noch im Nukleus ein Unterschied in der Expression von NFκB/p65 festgestellt werden. Der Verlust von IκBβ scheint demnach keinen Effekt auf die zelluläre Lokalisation von NFκB/p65 zu haben. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Mengen des translozierten NFκB/p65 in den Pankreaskarzinomzellen beider Tumormodelle nicht unterscheiden, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die NFκB-Aktivität in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen nicht höher ist. Die dennoch schwache Expression in den nukleären Fraktionen beider Zelltypen kann durch die bereits nachgewiesene basal konstitutive NFκB-Aktivität in Tumorzellen erklärt werden (Yamaguchi *et al.*, 2009; Braeuer *et al.*, 2006). Darüber hinaus scheint die IκBα-Überexpression auch keine biologische Relevanz auf die Sensitivität gegenüber Topoisomerase II-Inhibitoren zu haben.

Interessanterweise ergab die *in vitro*-Analyse weiterhin, dass die IκBα-Überexpression nur in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen detektiert werden konnte, welche p53WT exprimierten. In den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen hingegen wurde IκBα nicht hochreguliert. Diese Beobachtungen sprechen für eine p53WT-abhängige Regulation von IκBα, was auch durch die Verwendung einer IκBβ-spezifischen siRNA belegt werden konnte. Auch hier führte die Depletion von IκBβ in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinomzellen zu einem Expressionsanstieg von IκBα. Welcher Mechanismus dieser p53WT-abhängigen Regulation von IκBα unterliegt, muss in weiteren Versuchsreihen geklärt werden.

5.2.3 IκBβ-Defizienz verstärkt die nukleäre Translokation von NFκB/p65 in *Kras^{G12D}*- und *p53^{R172H}*-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen

Erste Analysen des zweiten IκBβ-defizienten Pankreaskarzinommausmodells (*Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*) zeigten, dass der Verlust von IκBβ und die gleichzeitige Expression von p53^{R172H} die Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms im Vergleich zu *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Kontrollmäusen akzeleriert, was zunächst eine Kompensation des IκBβ-Verlustes durch eine andere IκB-Form ausschließt. Dies konnte durch die *in vitro*-Analyse der IκBβ-defizienten Zellen aus den Pankreastumoren der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse im Wesentlichen bestätigt werden. Nur in einer der aus den Pankreaskarzinomen isolierten Zellreihen wurde eine minimale Hochregulation von IκBα detektiert.

Detailliertere Analysen der Tumormäuse ergaben weiterhin, dass sich die Pankreastumore der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*- und *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse weder in ihrer Größe noch in ihrem Gewicht unterschieden. In beiden Mausmodellen entwickelten sich Tumore mit ähnlicher Morphologie, was durch histologische Analysen validiert wurde. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es bereits in früheren Stadien zu essentiellen Veränderungen in der Tumorgenese kommen muss, die die Akzeleration des Pankreaskarzinoms in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen fördert. Unerwarteterweise ergab die Analyse der PanIN-Entwicklung zehn Wochen alter *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*- und *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse jedoch keinen näheren Aufschluss. Im Gegenteil, es konnte eine signifikant höhere Anzahl an ADMs in *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-

Kontrollmäusen nachgewiesen werden. ADMs im Pankreas gelten als eine wichtige Vorstufe der präkanzerösen PanIN-Läsionen (Shi *et al.*, 2013). Allerdings erfordert die Entwicklung von PanIN-Läsionen nicht unbedingt ADMs, da die neoplastische Transformation auch ohne die ADM-Vorstufe stattfinden kann (Reichert & Rustgi, 2011). Daher müssen neben duktalem und zentroazinären Zellen weitere Vorläuferpopulationen existieren, die für die Entstehung von Pankreaskarzinomen verantwortlich sind. Der Ursprungszelltyp für die PanIN-Entstehung ist jedoch bis dato noch nicht identifiziert worden (Reichert & Rustgi, 2011). Neuere Daten zeigen dennoch die Identifizierung einer weiteren Vorläuferpopulation. Bereits in einem Alter von sechs Wochen können im Bereich von ADM-Arealen so genannte atypische flache Läsionen (AFL) auftreten (Esposito *et al.*, 2012). Daher könnte die Entwicklung von PanINs in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse auch ohne ADM-Vorstufe ablaufen bzw. aus AFL hervorgehen. Welche Zellen die Vorläuferpopulationen der PanINs in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse bilden, muss in weiteren Versuchsansätzen geklärt werden.

Ausgehend davon, dass die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms jedoch in erster Linie aus PanIN-Läsionen resultiert (Hruban *et al.*, 2000), war anzunehmen, dass die Akzeleration der Pankreastumore in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen auf eine deutlich höhere Anzahl PanIN-Läsionen zurückzuführen ist. Interessanterweise unterschied sich jedoch die Menge an gezählten PanIN1A- und PanIN1B-Läsionen in den beiden Mausmodellen nicht voneinander. Dies lässt zunächst darauf schließen, dass es innerhalb der beiden Mausmodelle keinen Unterschied hinsichtlich der PanIN-Entwicklung gibt. Jedoch könnte der hier gewählte Analysezeitpunkt von zehn Wochen auch zu früh gewesen sein, um eine signifikante Aussage treffen zu können. Eine verstärkte PanIN-Entwicklung in den Pankreata der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse könnte auch erst nach 12 oder 15 Wochen zu beobachten sein. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten *in vivo*-Analysen der *Kras^{G12D}*-induzierten PanIN-Progression erbrachten demzufolge keine Erklärung für die Akzeleration des Pankreaskarzinoms in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen.

Obwohl die *in vivo*-Analyse der PanINs keine direkten Hinweise zur akzelerierten Pankreaskarzinogenese in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen lieferte, konnte mittels *in vitro*-Analyse eine verstärkte NFκB/p65-Expression in den nukleären Fraktionen der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden, was auf eine verstärkte NFκB-Aktivität in den Pankreastumoren der Mäuse dieses Genotyps hinweisen könnte. Möglicherweise ist die beobachtete akzelerierte Pankreaskarzinogenese in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen durch eine erhöhte Transaktivierung NFκB-abhängiger Gene zu erklären. Dabei wäre die Expressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren interessant. Die Regulation beispielsweise von VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) ist von einer konstitutiven NFκB-Aktivierung abhängig, wie sie häufig in Tumoren aufzufinden ist (Xie *et al.*, 2010; Aggarwal, 2004). Darüber hinaus konnte im humanen Mammakarzinom bereits eine positive Korrelation zwischen der Expression von mutiertem p53 und der Expression von VEGF festgestellt werden, welche zudem mit einer schlechten Prognose für die Betroffenen einhergeht (Linderholm *et al.*, 2001; Fontemaggi *et al.*, 2009).

Denkbar wäre auch eine mögliche Wechselwirkung zwischen NFκB/p65 und p53^{R172H}, welche sich in einer verstärkten Transaktivierung NFκB-abhängiger Gene widerspiegeln könnte, die die Karzinogenese in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen fördert. Da die erhöhte NFκB-Translokation nur in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Pankreaskarzinomzellen zu beobachten war, ist eine mögliche Verstärkung der wachstumsfördernden NFκB-Aktivität über p53^{R172H} vorstellbar.

NFκB ist allerdings an der Regulation vieler Gene, die das Überleben von Zellen sichern sowie die Differenzierung und Proliferation von Zellen steuern, beteiligt (Hayden & Ghosh, 2012). Die Identifizierung der hier transaktivierten NFκB-Zielgene könnte erste Hinweise auf den Mechanismus der in dieser Arbeit beobachteten akzelerierten Karzinogenese in den *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäusen liefern.

Eine erste Expressionsanalyse NFκB-abhängiger Zellzyklusproteine wie Cyclin D1 oder Skp2 ließ jedoch zunächst keine Schlussfolgerung zu, die zur Klärung der Akzeleration des Pankreaskarzinoms beitragen konnte. Da NFκB an der Regulation von mehr als 500 Zielgenen beteiligt ist, die an der Steuerung vieler biologischer Prozesse mitwirken (Gupta *et al.*, 2010), sollte die Durchführung einer globalen Expressionsanalyse mittels Microarray die Identifizierung NFκB-abhängiger Gene in dem hier verwendeten Modellsystem erleichtern. Dabei zeigte sich im Pankreaskarzinomgewebe der *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse eine signifikante Hochregulation von E2F-Zielgenen. Die Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellproliferation, sind aber gleichzeitig auch an der Induktion pro-apoptotischer Gene beteiligt (Reimer *et al.*, 2006; Iaquinta & Lees, 2007). Insbesondere E2F1 werden sowohl onkogene als auch tumorsuppressorische Eigenschaften zugesprochen (Polager & Ginsberg, 2008). Bevor in weiteren Versuchsansätzen Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus durchgeführt werden, sollten die beobachteten E2F-Signaturen zunächst mittels qRT-PCR überprüft werden. Viel entscheidender ist jedoch die Proteinexpression, die letztlich Aufschluss über den molekularen Mechanismus liefern kann. Die hier beobachteten E2F-(insbesondere E2F1) Gensignaturen geben interessanterweise keinen eindeutigen Hinweis darauf, weshalb die Mäuse mit einer IκBβ-Defizienz ein verkürzteres Überleben aufweisen. Möglicherweise wäre eine Transkriptomanalyse zu einem früheren Zeitpunkt in oder vor der Karzinogenese aufschlussreicher, um eine Erklärung für das verkürzte Überleben der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse zu geben, als der hier gewählte Zeitpunkt.

5.2.4 Ausblick und therapeutische Ansätze

Im Hinblick auf onkogene Mechanismen konnten zahlreiche Studien die Relevanz des Transkriptionsfaktors NFκB belegen. NFκB stellt daher eine attraktive Zielstruktur für die Tumorthherapie dar (Karin, 2006).

Die im zweiten Teil dieser Arbeit beobachtete verstärkte Expression von NFκB/p65 im Nukleus der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Pankreaskarzinomzellen lassen auf eine erhöhte NFκB-Aktivität in diesen Zellen schließen. Diese Annahme könnte der Grund für die beobachtete Akzelerierung des Pankreaskarzinoms in *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Tumormäusen sein. In der Literatur konnten bereits zahlreiche Inhibitoren des NFκB-Signalwegs

beschrieben werden. Dazu zählen Peptide, kleine RNAs (z.B. miRNAs), virale Proteine sowie natürliche Präparate (z.B. Curcumin), wobei viele dieser Inhibitoren noch nicht für das Pankreaskarzinommodell angewendet wurden (Prabhu *et al.*, 2014). Da in ~70% der Pankreaskarzinome eine konstitutive Aktivierung des NFκB-Signalweges vorliegt, wäre es sinnvoll, einige dieser Substanzen im Pankreaskarzinom zu testen (Wang *et al.*, 1999; Prabhu *et al.*, 2014).

Für die Blockierung des NFκB-Signalweges wäre beispielsweise die Verwendung von IKK-Inhibitoren möglich, wodurch die verbleibenden IκB-Proteine im Zytoplasma nicht mehr phosphoryliert und degradiert werden, und NFκB infolgedessen nicht mehr in den Nukleus transloziert wird (Cilloni *et al.*, 2006).

Darüber hinaus lässt die Koexpression von p53^{R172H} in den *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen vermuten, dass die anzunehmende verstärkte NFκB-Aktivität über p53^{R172H} erhöht wird, was sich wiederum in einer vermehrten Transaktivierung NFκB-abhängiger Gene widerspiegeln könnte, die das Tumorstadium begünstigen. Infolgedessen könnte die akzelerierende Tumorentwicklung auch durch ein Wechselspiel zwischen NFκB/p65 und p53^{R172H} zu erklären sein (Abbildung 5.1). Um hier allerdings mögliche Angriffspunkte zu identifizieren, müsste vorab geklärt werden, inwieweit die erhöhte nukleäre NFκB/p65-Expression tatsächlich mit einer verstärkten NFκB-Aktivität korreliert und ob diese auch durch p53^{R172H} beeinflusst wird.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl NFκB als auch p53 sind entscheidende Faktoren für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und daher häufig in Tumorzellen dereguliert (Ruland, 2011; Villunger *et al.*, 2003; Green & Kroemer, 2009). Eine steigende Anzahl von Studien belegt bereits einen Beitrag beider Transkriptionsfaktoren zur Onkogenese und auf allen Ebenen der Tumorgenese. Da Wechselspiele zwischen NFκB und p53 auf mehreren Ebenen stattfinden, würde die gezielte Aufklärung der Interaktionen die Kenntnisse der molekularen Mechanismen der Tumorgenese erweitern.

Schwerpunkt des ersten Teils der vorliegenden Dissertation war die Analyse des Wechselspiels zwischen NFκB und p53. Hierfür wurden genetisch definierte, murine Pankreaskarzinomzellen sowie humane Kolonkarzinomzellen verwendet. Das Wechselspiel zwischen NFκB und p53 wurde nach dem physiologischen Stimulus TNFα sowie nach der durch Replikationsarrest induzierten Signaltransduktion analysiert. Dabei wurde zum einen der Einfluss einer murinen p53-Mutante, p53^{R172H}, auf die induzierte NFκB-Signaltransduktion untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl NFκB/p65 als auch p53^{R172H} nicht nur erst nach TNFα-Stimulation, sondern auch unter nativen Bedingungen an eine κB-Konsensussequenz binden. Als Konsequenz dieser Komplexbildung konnte in p53-defizienten Pankreaskarzinomzellen, in denen nach stabiler Transfektion die Expression von p53^{R172H} rekonstituiert wurde, die Induktion des antiapoptotischen NFκB-Zielgens *Survivin* beobachtet werden. Die Herunterregulation von NFκB/p65 als auch von p53^{R172H} korrelierte mit einer verminderten Expression von *Survivin*. Dies beweist, dass die Aktivierung des antiapoptotischen NFκB-Zielgens *Survivin* p53-abhängig ist. Mutiertes p53 fördert die antiapoptotische NFκB-Aktivität in Tumorzellen. Dies könnte die Prävalenz von p53-Mutationen in humanen Tumoren erklären.

Ähnliches konnte auch für p53^{WT} beobachtet werden. Der durch Hydroxyurea hervorgerufene Replikationsarrest induzierte eine gemeinsame Bindung von NFκB/p65 und p53^{WT} an die Promotoren der NFκB-Zielgene *MnSOD* und *FasL*. Neben NFκB/p65 scheint auch p53^{WT} für die Replikationsarrest-induzierte Aktivierung von NFκB-Zielgenen benötigt zu werden.

In vivo konnte im zweiten Teil der Dissertation gezeigt werden, dass der generelle IκBβ (*Nfkbib*)-*Knockout* in einem murinen *Kras*^{G12D}-abhängigen Pankreaskarzinommodell zunächst keinen Einfluss auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms hat. IκB-Proteine inhibieren NFκB im Zytoplasma und besitzen daher eine Schlüsselfunktion im NFκB-Signalweg (Sun & Ley, 2008). Die durchschnittliche Überlebenszeit der *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäuse unterschied sich nur unwesentlich von der Überlebenszeit der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäuse. *In vitro*-Analysen der isolierten *Nfkbib*^{Δ/Δ};*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinomzellen lieferten den Hinweis, dass der Verlust von IκBβ in diesem Mausmodell durch eine andere IκB-Form, IκBα, kompensiert zu werden scheint.

Die Analyse eines weiteren murinen *Kras*^{G12D}-abhängigen Pankreaskarzinommodells, welches zusätzlich p53^{R172H} exprimierte, ergab jedoch, dass die Deletion von IκBβ im Vergleich zu *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D/+};*LSL-Trp53*^{R172H/+}-Kontrollmäusen in einer signifikant verkürzten Überlebensdauer resultiert. Dies spricht dafür, dass die Entwicklung des Pankreaskarzinoms in IκBβ-defizienten Tumormäusen akzeleriert wird. Dennoch ergab weder die Untersuchung der Tumorhistologie noch die Analyse der PanIN-Progression Aufschluss für die akzelerierte Pankreaskarzinogenese der

Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse. Mittels *in vitro*-Analysen hingegen konnte im Nukleus der isolierten *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Pankreaskarzinomzellen eine verstärkte Translokation von NFκB/p65 nachgewiesen werden, was in diesen Zellen auf eine verstärkte NFκB-Aktivität schließen lassen könnte. Die Akzeleration des Pankreaskarzinoms in *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäusen könnte demzufolge auch auf eine verstärkte tumorbegünstigende NFκB-Aktivierung zurückzuführen sein, die zudem über p53^{R172H} gesteigert werden könnte. Um jedoch die genaue Ursache für das verkürzte Überleben der *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}*-Mäuse identifizieren zu können, sind weiterführende Analysen notwendig.

7 SUMMARY

NFκB as well as p53 are crucial factors for the maintenance of cellular homeostasis and frequently dysregulated in cancer (Ruland, 2011; Villunger et al., 2003; Green & Kroemer, 2009). An increasing number of studies confirm a contribution of both transcription factors to oncogenesis and all steps of tumorigenesis. Since crosstalk of NFκB and p53 takes place at multiple levels, elucidating their interactions can expand the body of knowledge regarding molecular mechanisms of tumorigenesis.

In the first part of this work, molecular and cell biology methods were used to analyze how mutant and wildtype p53 influence NFκB signaling. Therefore, murine pancreatic cancer cells and human colon carcinoma cell lines with defined genetic alterations were tested. Crosstalk between NFκB and p53 was analyzed after TNFα stimulation and induction of replicational arrest by HU.

Mutant p53^{R172H}-expressing pancreatic cancer cells showed less sensitivity towards different stimuli. Upon TNFα stimulation but also under native conditions, mutant p53^{R172H} formed a transcriptionally relevant complex with NFκB/p65 on its target DNA. In a newly established cellular system in which a p53 mutant is expressed from its endogenous promoter, an induction of an anti-apoptotic NFκB target gene, *Survivin*, was observed. Downregulation of NFκB/p65 and p53^{R172H} correlated with a decreased expression of *Survivin* which proved the dependency of both factors. Hence, mutant p53^{R172H} activated tumor-promoting NFκB/p65 target gene expression. Mutant p53 contributed to anti-apoptotic NFκB activity in cancer cells which could be an explanation for the prevalence of p53 mutations in human tumors.

Induction of replicational stress by hydroxyurea triggered a binding of p53^{WT} and NFκB/p65 to specific promoters of NFκB target genes, *MnSOD* and *FasL*. Consequently, in addition to NFκB/p65 p53^{WT} appeared to be required for the induction of NFκB target genes during S-phase arrest.

In the second part of this work, mouse models were used to study the role of IκBβ in the carcinogenesis of pancreatic cancer. IκB proteins sequester NFκB in the cytosol and therefore represent key factors in NFκB signaling (Sun & Ley, 2008). Loss of IκBβ in a *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* mouse model did not have any effect on tumorigenesis. Median survival of *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* mice differed only insignificantly from median survival of *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* mice. *In vitro* analysis of isolated *Nfkbib^{Δ/Δ};Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* pancreatic cancer cells suggest that the loss of IκBβ within this mouse model is compensated by another member of the IκB family, IκBα.

Analysis of IκBβ deletion in another *Kras^{G12D}*-dependent pancreatic cancer mouse model, additionally expressing p53^{R172H}, resulted in a significantly reduced median survival, indicating an acceleration of pancreatic cancer progression in IκBβ deficient tumor mice. Neither tumor histology nor analysis of PanIN progression provided insights into the mechanism. However, *in vitro* analysis showed an increased translocation of NFκB/p65 into the nucleus of isolated *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* pancreatic cancer cells which suggests a higher NFκB activity. The acceleration of pancreatic cancer in *Nfkbib^{Δ/Δ};Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}* mice might be a result of tumor-promoting NFκB/p65 target gene expression, potentially enhanced by p53^{R172H}.

8 LITERATUR

- Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6(3): 203-8
- Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM (2011) The role of HDAC6 in cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011: 875824
- Alexandrova EM, Yallowitz AR, Li D, Xu S, Schulz R, Proia DA, Lozano G, Dobbelstein M, Moll UM (2015) Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature* [Epub ahead of print]
- Ak P, Levine AJ (2010) p53 and NF- κ B: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J* 24(10): 3643-52
- Allen PJ, D'Angelica M, Gonen M, Jaques DP, Coit DG, Jarnagin WR, DeMatteo R, Fong Y, Blumgart LH, Brennan MF (2006) A selective approach to the resection of cystic lesions of the pancreas: results from 539 consecutive patients. *Ann Surg* 244(4): 572-82
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S (2002) Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195(10): 1303-16
- Ansari SA, Safak M, Del Valle L, Enam S, Amini S, Khalili K (2001) Cell cycle regulation of NF-kappa b-binding activity in cells from human glioblastomas. *Exp Cell Res* 265(2): 221-33
- Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268(10): 2764-72
- Arlt A, Schäfer H (2002) NFkappaB-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40(8): 336-47
- Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schäfer H (2001) Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20(7):859-68. Erratum in: *Oncogene* (2002) 21(16): 2611
- Baldwin EL, Osheroff N (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5(4): 363-72
- Beckerman R, Prives C (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(8): a000935
- Beg AA, Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274(5288): 782-4
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D (1995) Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* 9(22): 2736-46
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, 289-300
- Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2): 474-82

- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch AM, Wu J, Chang DK, Cowley MJ, Gardiner BB, Song S, Harliwong I, Idrisoglu S, Nourse C, Nourbakhsh E, Manning S, Wani S, Gongora M, Pajic M, Scarlett CJ, Gill AJ, Pinho AV, Rooman I, Anderson M, Holmes O, Leonard C, Taylor D, Wood S, Xu Q, Nones K, Fink JL, Christ A, Bruxner T, Cloonan N, Kolle G, Newell F, Pinese M, Mead RS, Humphris JL, Kaplan W, Jones MD, Colvin EK, Nagrial AM, Humphrey ES, Chou A, Chin VT, Chantrill LA, Mawson A, Samra JS, Kench JG, Lovell JA, Daly RJ, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Kakkar N, Zhao F, Wu YQ, Wang M, Muzny DM, Fisher WE, Brunicardi FC, Hodges SE, Reid JG, Drummond J, Chang K, Han Y, Lewis LR, Dinh H, Buhay CJ, Beck T, Timms L, Sam M, Begley K, Brown A, Pai D, Panchal A, Buchner N, De Borja R, Denroche RE, Yung CK, Serra S, Onetto N, Mukhopadhyay D, Tsao MS, Shaw PA, Petersen GM, Gallinger S, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Schulick RD, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Capelli P, Corbo V, Scardoni M, Tortora G, Tempero MA, Mann KM, Jenkins NA, Perez-Mancera PA, Adams DJ, Largaespada DA, Wessels LF, Rust AG, Stein LD, Tuveson DA, Copeland NG, Musgrove EA, Scarpa A, Eshleman JR, Hudson TJ, Sutherland RL, Wheeler DA, Pearson JV, McPherson JD, Gibbs RA, Grimmond SM (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491(7424): 399-405
- Blandino G, Levine AJ, Oren M (1999) Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 18(2): 477-85
- Bonizzi G, Karin M (2004) The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25(6): 280-8
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Braeuer SJ, Büneker C, Mohr A, Zwacka RM (2006) Constitutively activated nuclear factor-kappaB, but not induced NF-kappaB, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 4(10): 715-28
- Brosh R, Rotter V (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9(10): 701-13
- Brune KA, Lau B, Palmisano E, Canto M, Goggins M, Hruban RH, Klein AP (2010) Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *J Natl Cancer Inst* 102(2): 119-26
- Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, Kracht M (2004) Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J Biol Chem* 279(48): 49571-4
- Chandler NM, Canete JJ, Callery MP (2004) Increased expression of NF-kappa B subunits in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 118(1): 9-14
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen M (2005) Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* 192(2): 504-11
- Charvet C, Wissler M, Brauns-Schubert P, Wang SJ, Tang Y, Sigloch FC, Mellert H, Brandenburg M, Lindner SE, Breit B, Green DR, McMahon SB, Borner C, Gu W, Maurer U (2011) Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53. *Mol Cell* 42(5): 584-96
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93(5): 827-39
- Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R (1998) Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med* 188(6): 1055-62
- Chicas A, Molina P, Bargonetti J (2000) Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2): 383-90

- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265(5170): 346-55
- Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Morotti A, Messa E, Carturan S, Giugliano E, Pautasso M, Bracco E, Rosso V, Sen A, Martinelli G, Baccarani M, Saglio G (2006) The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* 20(1): 61-7
- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kB2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3: 958-965
- Coffill CR, Muller PA, Oh HK, Neo SP, Hogue KA, Cheek CF, Vousden KH, Lane DP, Blackstock WP, Gunaratne J (2012) Mutant p53 interactome identifies nardilysin as a p53R273H-specific binding partner that promotes invasion. *EMBO Rep* 13(7): 638-44
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364(19): 1817-1825
- Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forshev T, Rosenfeld N, Harpaz N, Itzkowitz S, Harris CC, Rotter V, Gorgoulis VG, Oren M (2013) Mutant p53 prolongs NF-kB activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* 23(5): 634-46
- Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 21(20): 5375-85
- Courtois G, Gilmore TD (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25(51): 6831-43
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-7
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3771-8
- Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17(4): 525-35
- de Jong K, Verlaan T, Dijkgraaf MG, Poley JW, van Dullemen H, Bruno MJ, Fockens P (2011) Interobserver agreement for endosonography in the diagnosis of pancreatic cysts. *Endoscopy* 43(7): 579-584
- Deppert W (2007) Mutant p53: from guardian to fallen angel? *Oncogene* 26(15): 2142-4
- Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V (2003) RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem* 278(26): 23278-84
- Dhar SK, Xu Y, St Clair DK (2010) Nuclear factor kappaB- and specificity protein 1-dependent p53-mediated bi-directional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene. *J Biol Chem* 285(13): 9835-46
- Do PM, Varanasi L, Fan S, Li C, Kubacka I, Newman V, Chauhan K, Daniels SR, Bocchetta M, Garrett MR, Li R, Martinez LA (2012) Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev* 26(8): 830-45

- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005) NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446(5): 475-82
- Dong J, Jimi E, Zhong H, Hayden MS, Ghosh S (2008) Repression of gene expression by unphosphorylated NF- κ B p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev* 22(9): 1159-73
- Dragatsis I, Zeitlin S (2001) A method for the generation of conditional gene repair mutations in mice. *Nucleic Acids Res* 29(3): E10
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13(20): 2658-69
- Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Klöppel G (2012) [New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]. *Pathologe*. Nov;33 Suppl 2: 189-93
- Everhardt J, Wright D (1995) Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 273(20): 1605-9
- Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA (2012) The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18(16): 4266-76
- Feurino LW, Zhang Y, Bharadwaj U, Zhang R, Li F, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q, Min L (2007) IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther* 6(7): 1096-100
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008: pdb.prot4986
- Fong A, Sun SC (2002) Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF- κ B B2/p100. *J Biol Chem* 277(25): 22111-4
- Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, Terrenato I, Mottolese M, Muti P, Domany E, Del Bufalo D, Strano S, Blandino G (2009) The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 16(10): 1086-93
- Franzoso G, Carlson L, Scharon-Kersten T, Shores EW, Epstein S, Grinberg A, Tran T, Shacter E, Leonardi A, Anver M, Love P, Sher A, Siebenlist U (1997) Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity* 6(4): 479-90
- Freed-Pastor WA, Prives C (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26(12): 1268-86
- Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C (2001) A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 21(5): 1874-87
- Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB (1995) Structure of NF- κ B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 373(6512): 303-10
- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-60
- Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, van Klaveren RJ, Chaudhary S, Gunther A, Shamsili S (2009) Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27(27): 4481-6

- Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, Prives C (2001) p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1036-41
- Göhler T, Reimann M, Cherny D, Walter K, Warnecke G, Kim E, Deppert W (2002) Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* 277(43): 41192-203
- Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458(7242): 1127-30
- Greten FR, Karin M (2004) The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206(2): 193-9
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W (2001) Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5043-8
- Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB (2010) Inhibiting NF-kB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta* 1799(10-12): 775-87
- Hall PA, Meek D, Lane DP (1996) p53--integrating the complexity. *J Pathol* 180(1): 1-5
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2008) Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 7: 64
- Hamann J, Koning N, Pouwels W, Ulfman LH, van Eijk M, Stacey M, Lin HH, Gordon S, Kwakkenbos MJ (2007) EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol* 37(10): 2797-802
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-74
- Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM (2012) Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012: 948098
- Hayden MS, Ghosh S (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18(18): 2195-224
- Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132(3): 344-62
- Hayden MS, Ghosh S (2012) NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26(3): 203-34
- Hertlein E, Wang J, Ladner KJ, Bakkar N, Guttridge DC (2005) RelA/p65 regulation of IkappaBbeta. *Mol Cell Biol* 25(12): 4956-68
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4(6): 437-50
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7(5): 469-83
- Hinz M, Arslan SÇ, Scheidereit C (2012) It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB. *Immunol Rev* 246(1): 59-76
- Ho WC, Fitzgerald MX, Marmorstein R (2006) Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA. *J Biol Chem* 281(29): 20494-502

- Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW (2006) I κ B kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* 26(2): 457-71
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6(8): 2969-72
- Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE (2001) Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 7(4): 251-8
- Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M (2007) Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 36(4): 831-49
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S (2003) Sequential modification of NEMO/I κ B γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- κ B activation by genotoxic stress. *Cell* 115(5): 565-76
- Huang WC, Ju TK, Hung MC, Chen CC (2007) Phosphorylation of CBP by IKK α promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF- κ B. *Mol Cell* 26(1): 75-87
- Hutti JE, Pfefferle AD, Russell SC, Sircar M, Perou CM, Baldwin AS (2012) Oncogenic PI3K mutations lead to NF- κ B-dependent cytokine expression following growth factor deprivation. *Cancer Res* 72(13): 3260-9
- Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH (2000) Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol* 24(11): 1544-8
- Iaquinta PJ, Lees JA (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 19(6): 649-57
- Iodice S, Gandini S, Löhr M, Lowenfels AB, Maisonneuve P (2008) Venous thromboembolic events and organ-specific occult cancers: a review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 6(5): 781-8
- Ishikawa H, Carrasco D, Claudio E, Ryseck RP, Bravo R (1997) Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF- κ B2. *J Exp Med* 186(7): 999-1014
- Ito CY, Kazantsev AG, Baldwin AS Jr (1994) Three NF- κ B sites in the I κ B α promoter are required for induction of gene expression by TNF α . *Nucleic Acids Res* 22(18): 3787-92
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15(24): 3243-8
- Janssens S, Tschopp J (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ* 13(5): 773-84
- Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267(5203): 1498-502
- Joerger AC, Fersht AR (2008) Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77: 557-82
- Jones NB, Hatzaras I, George N, Muscarella P, Ellison EC, Melvin WS, Bloomston M (2009) Clinical factors predictive of malignant and premalignant cystic neoplasms of the pancreas: a single institution experience. *HPB (Oxford)* 11(8): 664-70

- Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, Goggins M (2012) Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142(4): 730-733
- Karin M (2006) NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 45(6): 355-61
- Karin M (2009) NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(5): a000141
- Karin M, Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5(10): 749-59
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV (2002) The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32(1): 128-34
- Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, Wang H, Lee W, French DM, Grewal IS, Cochran AG, Gordon NC, Yin J, Starovasnik MA, Dixit VM (2002) BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 17(4): 515-24
- Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS (2006) NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13(5):738-47
- Klein AP (2013) Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer* 13(1): 66-74
- Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Griffin C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern S, Hruban RH (2004) Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 64(7): 2634-8
- Klement JF, Rice NR, Car BD, Abbondanzo SJ, Powers GD, Bhatt PH, Chen CH, Rosen CA, Stewart CL (1996) IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* 16(5): 2341-9
- Knippschild U, Krüger M, Richter J, Xu P, García-Reyes B, Peifer C, Halekotte J, Bakulev V, Bischof J (2014) The CK1 Family: Contribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis. *Front Oncol* 4:96
- Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF (2004) Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 279(1): 223-30
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387(6630): 299-303
- Laffan TA, Horton KM, Klein AP, Berlanstein B, Siegelman SS, Kawamoto S, Johnson PT, Fishman EK, Hruban RH (2008) Prevalence of unsuspected pancreatic cysts on MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 191(3): 802-7
- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381): 15-6
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-31
- Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9(10): 749-58
- Liang C, Zhang M, Sun SC (2006) beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal* 18(8): 1309-17

- Li D, Marchenko ND, Moll UM (2011a) SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ* 18(12): 1904-13
- Li D, Marchenko ND, Schulz R, Fischer V, Velasco-Hernandez T, Talos F, Moll UM (2011b) Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 9(5): 577-88
- Li F, Sethi G (2010) Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1805(2): 167-80
- Li M, Zhang Y, Feurino LW, Wang H, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q (2008) Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci* 99(4): 733-7
- Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM (1999a) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 284(5412): 321-5
- Li Q, Verma IM (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10): 725-34
- Li W, Albrecht AM, Li M (2012) Inflammation and Pancreatic Cancer: A Tale of Two Cytokines. *Cell Biol: Res Ther* 1:1. doi:10.4172/2324-9293.1000e104
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M (1999b) The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189(11): 1839-45
- Lin AW, Lowe SW (2001) Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5025-30
- Linderholm BK, Lindahl T, Holmberg L, Klaar S, Lennerstrand J, Henriksson R, Bergh J (2001) The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 61(5): 2256-60
- Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee DF, Chang Z, Li J, Peng B, Fleming JB, Wang H, Liu J, Lemischka IR, Hung MC, Chiao PJ (2012) KrasG12D-induced IKK2/β/NF-κB activation by IL-1α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21(1): 105-20
- Liu DP, Song H, Xu Y (2010) A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 29(7): 949-56
- Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Gao YT, Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P, Duell EJ (2012) Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 23(2): 374-82
- Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM, Miyamoto S (2006) PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8(9):986-93
- Magnani M, Crinelli R, Bianchi M, Antonelli A (2000) The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). *Curr Drug Targets* 1(4): 387-99
- Maier HJ, Wagner M, Schips TG, Salem HH, Baumann B, Wirth T (2013) Requirement of NEMO/IKKγ for effective expansion of KRAS-induced precancerous lesions in the pancreas. *Oncogene* 32(21): 2690-5

- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G (2001) I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276(48): 45225-35
- Maniati E, Bossard M, Cook N, Candido JB, Emami-Shahri N, Nedospasov SA, Balkwill FR, Tuveson DA, Hagemann T (2011) Crosstalk between the canonical NF- κ B and Notch signaling pathways inhibits Pparg expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *J Clin Invest* 121(12): 4685-99
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203): 436-44
- Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI (2006) Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127(7): 1323-34
- McCool KW, Miyamoto S (2012) DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* 246(1): 311-26
- Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, Jacks T (2009) Requirement for NF- κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* 462(7269): 104-7
- Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS (2001) Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 286(8):921-9
- Milewski WM, Duguay SJ, Chan SJ, Steiner DF (1998) Conservation of PDX-1 structure, function, and expression in zebrafish. *Endocrinology* 139(3): 1440-9
- Miliani de Marval PL, Zhang Y (2011) The RP-Mdm2-p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget* 2(3): 234-8
- Miyamoto S (2011) Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res* 21(1):116-30.
- Miyamoto S, Verma IM (1995) Rel/NF- κ B/I κ B story. *Adv Cancer Res* 66: 255-92
- Mobahat M, Narendran A, Riabowol K (2014) Survivin as a preferential target for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 15(2): 2494-516
- Moll UM, Petrenko O (2003) The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1(14): 1001-8
- Morris JP 4th, Wang SC, Hebrok M (2010) KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* 10(10): 683-95
- Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, Frame MC, Evans TR, Sansom OJ (2010) Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 246-51
- Muller PA, Vousden KH (2013) p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15(1): 2-8
- Muller PA, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25(3): 304-17
- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GI, Schmid RM (2007) Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* 134(6): 1151-60

- Nesic D, Grumont R, Gerondakis S (2008) The nuclear factor-kappaB and p53 pathways function independently in primary cells and transformed fibroblasts responding to genotoxic damage. *Mol Cancer Res* 6(7): 1193–1203
- Nishikori M (2005) Classical and alternative NF-kB activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Hematopathol* 45:15–24
- Nowak DE, Tian B, Jamaluddin M, Boldogh I, Vergara LA, Choudhary S, Brasier AR (2008) RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes. *Mol Cell Biol* 28(11): 3623-38
- O'Brien DI, Nally K, Kelly RG, O'Connor TM, Shanahan F, O'Connell J (2005) Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 9(5): 1031-44
- Oeckinghaus A, Ghosh S (2009) The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(4): a000034
- Oettle (2014) Progress in the knowledge and treatment of advanced pancreatic cancer: From benchside to bedside. *Cancer Treat Rev.* 2014 Oct;40(9):1039-1047
- Ohmori Y, Fukumoto S, Hamilton TA (1995) Two structurally distinct kappa B sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. *J Immunol* 155(7): 3593-600
- Okal A, Matissek KJ, Matissek SJ, Price R, Salama ME, Janát-Amsbury MM, Lim CS (2014) Re-engineered p53 activates apoptosis in vivo and causes primary tumor regression in a dominant negative breast cancer xenograft model. *Gene Ther* 21(10): 903-12
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T (2004) Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119(6): 847-60
- O'Prey J, Crighton D, Martin AG, Vousden KH, Fearhead HO, Ryan KM (2010) p53-mediated induction of Noxa and p53AIP1 requires NFkappaB. *Cell Cycle* 9(5): 947-52
- Oren M, Rotter V (2010) Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): a001107
- O'Shea JM, Perkins ND (2010) Thr435 phosphorylation regulates RelA (p65) NF-kappaB subunit transactivation. *Biochem J* 426(3): 345-54
- Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 49-62
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28(6): 622-9
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6): 509-15
- Polager S, Ginsberg D (2008) E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 18(11): 528-35

- Poruk KE, Weiss MJ (2015) The current state of surgery for pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol* 61(2): 101-15
- Prabhu L, Mundade R, Korc M, Loehrer PJ, Lu T (2014) Critical role of NF- κ B in pancreatic cancer. *Oncotarget* 5(22): 10969-75
- Rao P, Hayden MS, Long M, Scott ML, West AP, Zhang D, Oeckinghaus A, Lynch C, Hoffmann A, Baltimore D, Ghosh S (2010) I κ B acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature* 466(7310): 1115-9
- Reichert M, Rustgi AK (2011) Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest* 121(12): 4572-8
- Reimer D, Sadr S, Wiedemair A, Goebel G, Concin N, Hofstetter G, Marth C, Zeimet AG (2006) Expression of the E2F family of transcription factors and its clinical relevance in ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1091: 270-81
- Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen GM, Bondy ML, Gallinger S, Schwartz AG, Syngal S, Cote ML, Axilbund J, Schulick R, Ali SZ, Eshleman JR, Velculescu VE, Goggins M, Vogelstein B, Papadopoulos N, Hruban RH, Kinzler KW, Klein AP (2012). ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov* 2(1): 41-6
- Roshani R, McCarthy F, Hagemann T (2014) Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 345(2): 157-63
- Rothwarf DM, Karin M (1999) The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 1999(5):RE1
- Ruland J. (2011) Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. *Nat Immunol* 12(8): 709-14
- Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH (2000) Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404(6780): 892-7
- Sampath J, Sun D, Kidd VJ, Grenet J, Gandhi A, Shapiro LH, Wang Q, Zambetti GP, Schuetz JD (2001) Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* 276(42): 39359-67
- Scheibel M, Klein B, Merkle H, Schulz M, Fritsch R, Greten FR, Arkan MC, Schneider G, Schmid RM (2010) I κ B is an essential co-activator for LPS-induced IL-1 β transcription in vivo. *J Exp Med* 207(12): 2621-30
- Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M (2004) NF- κ B: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5(10): 1348-58
- Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wiczorek M, Wagner T, Reichardt S, von Werder A, Schmid RM, Weih F, Heinzl T, Saur D, Krämer OH (2010) Cross talk between stimulated NF- κ B and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29(19): 2795-806
- Schneider G, Krämer OH (2011) NF κ B/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1815(1): 90-103
- Schneider G, Saur D, Siveke JT, Fritsch R, Greten FR, Schmid RM (2006) IKK α controls p52/RelB at the skp2 gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *EMBO J* 25(16): 3801-12
- Schrell UM, Rittig MG, Koch U, Marschalek R, Anders M (1996) Hydroxyurea for treatment of unresectable meningiomas. *Lancet* 348(9031): 888-9

- Schumm K, Rocha S, Caamano J, Perkins ND (2006) Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF-kappaB subunit. *EMBO J* 25(20): 4820-32
- Schwarz EM, Krimpenfort P, Berns A, Verma IM (1997) Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev* 11(2): 187-97
- Scian MJ, Stagliano KE, Anderson MA, Hassan S, Bowman M, Miles MF, Deb SP, Deb S (2005) Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol* 25(22): 10097-110
- Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5): 705-16
- Sethi G, Sung B, Aggarwal BB (2008) Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(1): 21-31
- Shen HM, Tergaonkar V (2009) NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis* 14(4): 348-63
- Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF (2013) Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 32(15):1950-8
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-55
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65(1): 5-29
- Sigal A, Rotter V (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60(24): 6788-93
- Singer M, Sansonetti PJ (2004) IL-8 is a key chemokine regulating neutrophil recruitment in a new mouse model of Shigella-induced colitis. *J Immunol* 173(6): 4197-206
- Singh NP, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2007) Role of dioxin response element and nuclear factor-kappaB motifs in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated regulation of Fas and Fas ligand expression. *Mol Pharmacol* 71(1): 145-57
- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108: 73-112
- Solomon H, Buganim Y, Kogan-Sakin I, Pomeranec L, Assia Y, Madar S, Goldstein I, Brosh R, Kalo E, Beatus T, Goldfinger N, Rotter V (2012) Various p53 mutant proteins differently regulate the Ras circuit to induce a cancer-related gene signature. *J Cell Sci* 125(Pt 13): 3144-52
- Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, Weisz L, Maor-Aloni R, Siegfried Z, Shiff I, Kogan I, Shay M, Kalo E, Blandino G, Simon I, Oren M, Rotter V (2010) Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 17(3): 273-85
- Storz P (2013) Targeting the alternative NF-kB pathway in pancreatic cancer: a new direction for therapy? *Expert Rev Anticancer Ther* 13(5): 501-4
- Strano S, Fontemaggi G, Costanzo A, Rizzo MG, Monti O, Baccarini A, Del Sal G, Levrero M, Sacchi A, Oren M, Blandino G (2002) Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem* 277(21): 18817-26
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15545-50

- Suh YA, Post SM, Elizondo-Fraire AC, Maccio DR, Jackson JG, El-Naggar AK, Van Pelt C, Terzian T, Lozano G (2011) Multiple stress signals activate mutant p53 in vivo. *Cancer Res* 71(23): 7168-75
- Sun SC (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 21(1): 71-85
- Sun SC, Ley SC (2008) New insights into NF- κ B regulation and function. *Trends Immunol* 29(10): 469-78
- Szoltyssek K, Pietranek K, Kalinowska-Herok M, Pietrowska M, Kimmel M, Widlak P (2008) TNF α -induced activation of NF κ B protects against UV-induced apoptosis specifically in p53-proficient cells. *Acta Biochim Pol* 55(4): 741-748
- Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M (2007) Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 98(5): 629-35
- Tergaonkar V (2009) p53 and NF κ B: fresh breath in the cross talk. *Cell Res* 19(12): 1313-5
- Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I (2002) p53 stabilization is decreased upon NF κ B activation: a role for NF κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 1(5): 493-503
- Tergaonkar V, Perkins ND (2007) p53 and NF- κ B crosstalk: IKK α tips the balance. *Mol Cell* 26(2): 158-9
- Terzian T, Suh YA, Iwakuma T, Post SM, Neumann M, Lang GA, Van Pelt CS, Lozano G (2008) The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev* 22(10): 1337-1344
- Toualbi-Abed K, Daniel F, Güller MC, Legrand A, Mauriz JL, Mauviel A, Bernuau D (2008) Jun D cooperates with p65 to activate the proximal κ B site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* 29(3): 536-43
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27(8): 495-501
- Tsimberidou AM, Alvarado Y, Giles FJ (2002) Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2(4): 437-48
- Tsuzuki Y, Mouta Carreira C, Bockhorn M, Xu L, Jain RK, Fukumura D (2001) Pancreas microenvironment promotes VEGF expression and tumor growth: novel window models for pancreatic tumor angiogenesis and microcirculation. *Lab Invest* 81(10): 1439-51
- Valovka T, Hottiger MO (2011) p65 controls NF- κ B activity by regulating cellular localization of I κ B β . *Biochem J* 434(2): 253-63
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303(5659): 844-8
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445(7128): 661-5
- Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A (2005) Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30(1): 43-52

- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Müllauer F, Böck G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302(5647): 1036-8.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* 78(9791): 607-20
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369(18): 1691-703
- Vousden KH (2010) Alternative fuel--another role for p53 in the regulation of metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16): 7117-8
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3): 413-31
- Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, Yuan A, Lin CW, Yang SC, Chan WK, Li KC, Hong TM, Yang PC (2009) p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 11(6): 694-704
- Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ (1999) The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5(1): 119-27
- Wang Y, Godin-Heymann N, Dan Wang X, Bergamaschi D, Llanos S, Lu X (2013) ASPP1 and ASPP2 bind active RAS, potentiate RAS signalling and enhance p53 activity in cancer cells. *Cell Death Differ* 20(4): 525-34
- Webster GA, Perkins ND (1999) Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 19(5): 3485-95
- Weichert W, Boehm M, Gekeler V, Bahra M, Langrehr J, Neuhaus P, Denkert C, Imre G, Weller C, Hofmann HP, Niesporek S, Jacob J, Dietel M, Scheiderei C, Kristiansen G (2007) High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor-kappaB-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis. *Br J Cancer* 97(4): 523-30
- Weisz L, Damalas A, Liontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G, Maor-Aloni R, Kalis M, Levrero M, Strano S, Gorgoulis VG, Rotter V, Blandino G, Oren M (2007) Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* 67(6): 2396-401
- Wennerberg E, Sarhan D, Carlsten M, Kaminsky VO, D'arcy P, Zhivotovsky B, Childs R, Lundqvist A (2013) Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK and T cell-mediated killing by augmented TRAIL-receptor signalling. *Int J Cancer* 133(7): 1643-52
- Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF (2004) Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum* 1: 99-102
- Wietek C, O'Neill LA (2007) Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem Sci* 32(7): 311-9
- Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (2000) Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60(7): 2002-6.
- Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X (2004) Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23(13): 2330-8

- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW (1999) The SCF beta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I kappa B alpha and beta-catenin and stimulates I kappa B alpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13: 270-283
- Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, Brandl M, Jaeckel S, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2011) A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. *Pancreas* 40(1): 144-50
- Wu ZH, Miyamoto S (2008) Induction of a pro-apoptotic ATM-NF-kappaB pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J* 27(14): 1963-73
- Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, Ke E, Zhang Y, Oldfield E, Shaw RJ, Verma IM (2012) Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol* 14(3): 257-65
- Xiao G, Cvijic ME, Fong A, Harhaj EW, Uhlik MT, Waterfield M, Sun SC (2001) Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J* 20(23): 6805-15.
- Xie TX, Xia Z, Zhang N, Gong W, Huang S (2010) Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep* 23(3): 725-32
- Yamaguchi N, Ito T, Azuma S, Ito E, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Watanabe S, Semba K, Inoue J (2009) Constitutive activation of nuclear factor-kappaB is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci* 100(9): 1668-74
- Yamamoto Y, Gaynor RB (2004) I kappa B kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29(2): 72-9
- Yeo TP, Lowenfels AB (2012) Demographics and Epidemiology of Pancreatic Cancer *Cancer J* 18(6): 477-84
- Zimmermann M, Arachchige-Don AS, Donaldson MS, Dallapiazza RF, Cowan CE, Horne MC (2012) Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to doxorubicin. *J Biol Chem* 287(27): 22838-53

9 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht. Folgende Publikationen wurden gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 der aktuellen Promotionsordnung der Fakultät angezeigt:

Schneider G*, Henrich A*, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wieczorek M, Wagner T, Reichardt S, von Werder A, Schmid RM, Weih F, Heinzel T, Saur D, Krämer OH (2010) Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29: 2795-806

* gleichberechtigte Autoren

Conradt L, Henrich A, Wirth M, Reichert M, Lesina M, Algül H, Schmid RM, Krämer OH, Saur D, Schneider G (2013) Mdm2 inhibitors synergize with topoisomerase II inhibitors to induce p53-independent pancreatic cancer cell death. *International Journal of Cancer* 132: 2248-57

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation in so vielfältiger Weise unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank...

... Herrn PD Dr. Günter Schneider für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung der interessanten Themen und die motivierende und diskussionsfreudige Betreuung.

... Frau Prof. Angelika Schnieke für die Übernahme der Betreuung und des Erstgutachtens der Doktorarbeit am Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

... Herrn Prof. Dr. Oliver Krämer für die gute Zusammenarbeit, freundliche Unterstützung und hilfreichen Diskussionen.

... Herrn Prof. Dr. Dieter Saur für die Bereitstellung zahlreicher Mauslinien und die Unterstützung bei tierexperimentellen Arbeiten.

... allen Tierpflegern des ZPF der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar für ihre Fürsorge und die tolle Zusammenarbeit. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Elisabeth Heymann.

... allen damaligen Laborkollegen/-innen für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung im Laboralltag und die hilfreichen Diskussionen. Dabei geht mein besonderer Dank an Dr. Matthias Wirth, Dr. Sandra Annetzberger, Dr. Petra Bachhuber, Dr. Sandra Diersch, Kerstin Hoffmann, Birgit Kohnke-Ertel und Dr. Mariel Paul, die jeder auf seine Art maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere bei Matthias möchte ich mich noch mal ganz herzlich für seine ausdauernde, großartige Unterstützung zu jeder Zeit bedanken.

... Franzi, Mariel, Petra, Sandra und Sindi sowie meinen jetzigen Laborkolleginnen in Tübingen für ihre unermüdliche Bestärkung, stetige Unterstützung und aufbauenden Worte. Vielen lieben Dank!

... meiner Familie und Steffen für ihre vielfältige Unterstützung und unendliche Geduld während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Dissertation.

11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift