

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
Gastroenterologisches Forschungslabor

**Das High Mobility Group Protein A1 reguliert die Transkription
des Insulinrezeptor Gens und dadurch die Translation von Cyclin
D1 im duktalem Pankreaskarzinom**

Sebastian Kolb

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)

2007

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
Gastroenterologisches Forschungslabor

Das High Mobility Group Protein A1 reguliert die Transkription des Insulinrezeptor Gens und dadurch die Translation von Cyclin D1 im duktalem Pankreaskarzinom

Sebastian Kolb

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
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender der Dissertation: **Univ.-Prof. Dr. J. J. Hauner**

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann**
- 2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid**

Die Dissertation wurde am 01.02.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.04.2007 angenommen.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Schmid für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und die hilfreichen Gespräche danken.

Für die praktische Betreuung danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schmid, insbesondere meinem Betreuer Dr. Schneider.

Und ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Geduld und ihre immerwährende Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Pankreaskarzinom	1
1.1.	Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms	1
1.2.	Genetische Veränderungen im Pankreaskarzinom	3
1.2.1.	<i>K-RAS</i>	3
1.2.2.	<i>CDKN2A</i> Lokus	3
1.2.3.	<i>SMAD4/DPC4</i>	4
1.2.4.	Der Tumorsuppressor <i>p53</i>	5
2.	High Mobility Group Protein A1	6
2.1.	Regulation	6
2.2.	Physiologische und biochemische Eigenschaften	7
2.3.	Post translationelle Modifikationen	9
2.4.	Interaktionspartner	9
2.5.	HMGA1 Proteine und Chromatinstruktur	10
2.6.	Vorkommen und Onkogenese	12
3.	Cyclin D1	13
3.1.	Regulation von Cyclin D1	14
3.1.1.	Transkriptionelle Regulation	14
3.1.2.	Translationelle Regulation	15
3.1.3.	Regulation durch Degradierung	16
4.	Insulinrezeptor	18
II.	Material und Methoden	21
1.	Zellkultur	21
1.1.	Kultivierung der Zellen	21
1.2.	Passagieren der Zellen	21
1.3.	siRNA Transfektion der Zellen	21
1.4.	Inhibierung der proteosomalen Aktivität durch MG132	22
1.5.	Zellzahlbestimmung	22
1.6.	BrdU-Färbung	22
1.7.	Zellzyklus-Analysen	23
2.	Extraktion und Reinigung von Proteinen	23
2.1.	Proteinextraktion aus Zelllinien im Ganzellaufschluss	23
2.2.	Proteinbestimmung	24
2.3.	Western Blot Analyse	24
2.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.2.	Western Blot	24
3.	DNA und RNA Analysen	26
3.1.	Real Time PCR	26
3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.2.1.	PCR zur Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten	27
3.3.	Klonierungstechniken	28
3.3.1.	Transformation von kompetenten Bakterien	28
3.3.2.	PCR-Analyse von Transformandenklonen	29
3.3.3.	Agarosegelelektrophorese	29
3.3.4.	Plasmidvervielfältigung	30
3.4.	Isolierung von DNA und RNA	30
3.4.1.	DNA-Isolierung	30

3.4.2.	RNA-Isolierung	30
3.4.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.4.4.	Herstellung von cDNA	31
3.5.	Chromatin Immunopräzipitation	31
3.5.1	ChIP-PCR	32
III.	Ergebnisse	34
1.	Knock down der HMGA1 Proteine in zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	34
2.	Biologische Effekte des HMGA1 Knock downs	36
2.1.	Proliferationsrate	36
2.2.	Zellzahl	37
2.3.	Zellzyklus	39
3.	Der Knock down der HMGA1 Proteine beeinflusst die Zellzyklus-Regulatoren.....	41
3.1.	Cyclin D1, Cyclin A und das Retinoblastoma Protein (pRB).....	41
4.	HMGA1 reguliert indirekt die Translation von Cyclin D1	43
4.1.	Transkription	43
4.2.	Degradierung	44
4.3.	Translation.....	46
5.	Die Expression des Insulinrezeptors ist in HMGA1-transfizierten Zellen reduziert ...	48
5.1.	Insulinrezeptor mRNA Expression	48
5.2.	Insulinrezeptor Proteinexpression	49
5.3.	Chromatin Immunopräzipitation	50
6.	Der INSR Knock down zeigt den gleichen Phänotyp wie der HMGA1 Knock down	53
6.1.	Insulinrezeptor mRNA Expression	53
6.2.	Insulinrezeptor Proteinexpression	54
6.3.	Proliferationsrate	56
6.4.	<i>Cyclin D1</i> mRNA Expression	57
6.5.	Cyclin D1-Proteinexpression	59
6.6.	Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1	59
IV.	Diskussion	60
V.	Zusammenfassung.....	64
VI.	Literaturverzeichnis.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des duktales Pankreaskarzinoms	2
Abbildung 2: Zellzyklus- und Apoptoseregulation durch den <i>CDKN2A</i> Locus.....	4
Abbildung 3: Proteinsequenz von HMGA1a und HMGA1b	6
Abbildung 4: Struktur des <i>HMGA1</i> Gens	7
Abbildung 5: Bindung von HMGA1 an die kleinere Furche der DNA	8
Abbildung 6: Sekundäre Modifikationen der HMGA1 Proteine	9
Abbildung 7: β -Interferon Enhanceosom.....	11
Abbildung 8: Phosphorylierung von pRB durch Cyclin D1 und Cyclin E	13
Abbildung 9: Translationsinitiation durch den eIF4F-Komplex.....	15
Abbildung 10: Translationskontrolle durch den PI3K/AKT/mTOR Signalweg.....	16
Abbildung 11: Modell des Insulinrezeptors	18
Abbildung 12: Modell der HMGA1 Bindestellen im <i>INSR</i> Promotor	20
Abbildung 13: Knock down der <i>HMGA1</i> mRNA in DanG-Zellen.....	34
Abbildung 14: Knock down der <i>HMGA1</i> mRNA in MiaPaCa2-Zellen	35
Abbildung 15: BrdU Inkorporation nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	36
Abbildung 16: BrdU Inkorporation nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen	37
Abbildung 17: Wachstumskurve nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	38
Abbildung 18: Wachstumskurve nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen	38
Abbildung 19: PI-Färbung nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	39
Abbildung 20: PI-Färbung nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen.....	40
Abbildung 21: Zellzyklusregulatoren nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	42
Abbildung 22: Zellzyklusregulatoren nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen.....	42
Abbildung 23: <i>Cyclin D1</i> mRNA nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	43
Abbildung 24: <i>Cyclin D1</i> mRNA nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen.....	44
Abbildung 25: Cyclin D1-Degradierung nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	45
Abbildung 26: Cyclin D1-Degradierung nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen...	45
Abbildung 27: 4E-BP1 nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen.....	46
Abbildung 28: 4E-BP1 nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen	47
Abbildung 29: <i>INSR</i> mRNA nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	48
Abbildung 30: <i>INSR</i> mRNA nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen.....	49
Abbildung 31: <i>INSR</i> -Proteinexpression nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	50
Abbildung 32: <i>INSR</i> -Proteinexpression nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen....	50
Abbildung 33: ChIP nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen	51
Abbildung 34: ChIP nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen.....	51
Abbildung 35: Knock down der <i>INSR</i> mRNA in DanG-Zellen.....	53
Abbildung 36: Knock down der <i>INSR</i> mRNA in MiaPaCa2-Zellen	54
Abbildung 37: Proteinexpression nach <i>INSR</i> Knock down in DanG-Zellen.....	55
Abbildung 38: Proteinexpression nach <i>INSR</i> Knock down in MiaPaCa2-Zellen	55
Abbildung 39: BrdU Inkorporation nach <i>INSR</i> Knock down in DanG-Zellen	56
Abbildung 40: BrdU Inkorporation nach <i>INSR</i> Knock down in MiaPaCa2-Zellen	57
Abbildung 41: <i>Cyclin D1</i> mRNA nach <i>INSR</i> Knock down in DanG-Zellen	58
Abbildung 42: <i>Cyclin D1</i> mRNA nach <i>INSR</i> Knock down in MiaPaCa2-Zellen	58
Abbildung 43: Modell der indirekten Cyclin D1-Regulation durch HMGA1	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete erste Antikörper im Western Blot Verfahren	25
Tabelle 2: Verwendete zweite Antikörper im Western Blot Verfahren	26
Tabelle 3: Verwendete Real Time PCR Primer	27
Tabelle 4: Verwendete Vektoren.....	27
Tabelle 5: Verwendete Antikörper bei der Chromatin Immunopräzipitation	32
Tabelle 6: Verwendete Primer bei der CHIP-PCR.....	33

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CDK	Cyclin dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent assay
FACS	Fluorescent associated cell sorter (Durchflußzytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunde(n)
IGF	Insulin like Growth Factor
kDa	kilo Dalton
MG132	Myo-Genics (carbogen-zooxy- _L -leucyl- _L -leucyl- _L -leucnal)
Min	Minute(n)
μ	Mikro
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
PanIN	pankreatische interepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma (duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
Pen	Penicillin
PI	Propidium Iodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Strep	Streptomycin
SDS	Sodium dodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TGF- α	Transforming Growth Factor-alpha
TGF- β	Transforming-Growth-Factor-beta

I. Einleitung

1. Pankreaskarzinom

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt die fünft häufigste krebsbedingte Todesursache in der westlichen Welt dar. In den Vereinigten Staaten erkranken daran jährlich mehr als 30.000 Menschen und nahezu jeder von ihnen wird an dieser Krankheit sterben. Die Letalität dieser Erkrankung liegt bei über 95% und somit überleben weniger als 5% fünf Jahre. Aktuell wird die Lebenserwartung mit weniger als sechs Monaten angegeben. Aufgrund der hohen Insensitivität des Pankreaskarzinoms gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung bleibt in der Regel nur noch ein operativer Eingriff als letzte Option offen. Allerdings besteht bei nur 15-20% der Patienten überhaupt die Möglichkeit einer Resektion, da das Pankreaskarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein stark invasives Verhalten aufweist und über das lymphatische System weiteres Gewebe metastasiert hat. Selbst von diesen wenigen resektablen Patienten überleben nur ungefähr 20% die nächsten fünf Jahre (39, 81, 82).

Aus diesem Grund ist es notwendig, nach neuen zielgerichteten Therapieansätzen auf molekularer Ebene zu suchen. Um aber überhaupt potentielle molekulare Zielstrukturen für eine medikamentöse Therapie zu entdecken, ist es notwendig, die molekularen Veränderungen innerhalb des Pankreaskarzinoms zu verstehen.

1.1. Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms

Histologische Untersuchungen an Pankreaskarzinomen haben ergeben, dass über 85% der Tumore duktales Ursprungs sind (47, 97). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich an Pankreaskarzinom Zelllinien duktales Herkunft vorgenommen. Aus diesem Grund beschränkt sich diese Arbeit auf das duktales Pankreaskarzinom.

Klinische und histopathologische Untersuchungen haben zur Etablierung eines Tumorprogressionsmodells für das duktales Pankreaskarzinom geführt. Dieses beschreibt Vorläuferformen des Pankreaskarzinoms, sogenannte pankreatische interepitheliale Neoplasien (PanIN-1 – PanIN-3), die je nach Schwere der genetischen und morphologischen Schäden aufsteigend

eingestuft werden (siehe Abbildung 1). Die frühesten Vorläuferformen, PanIN-1A und -1B zeichnen sich durch eine Zellkörperverlängerung und erhöhte Schleimproduktion aus. Zusätzlich verändert sich bei PanIN-1B die flache duktale Architektur in eine papilläre. Bei ungefähr 40% aller über 50 jährigen kann man diese Art von Veränderung auch in nicht malignem Pankreas antreffen. In diesen frühen Vorläuferformen lassen sich zudem u. a. bereits K-RAS Mutationen (siehe unten) nachweisen.

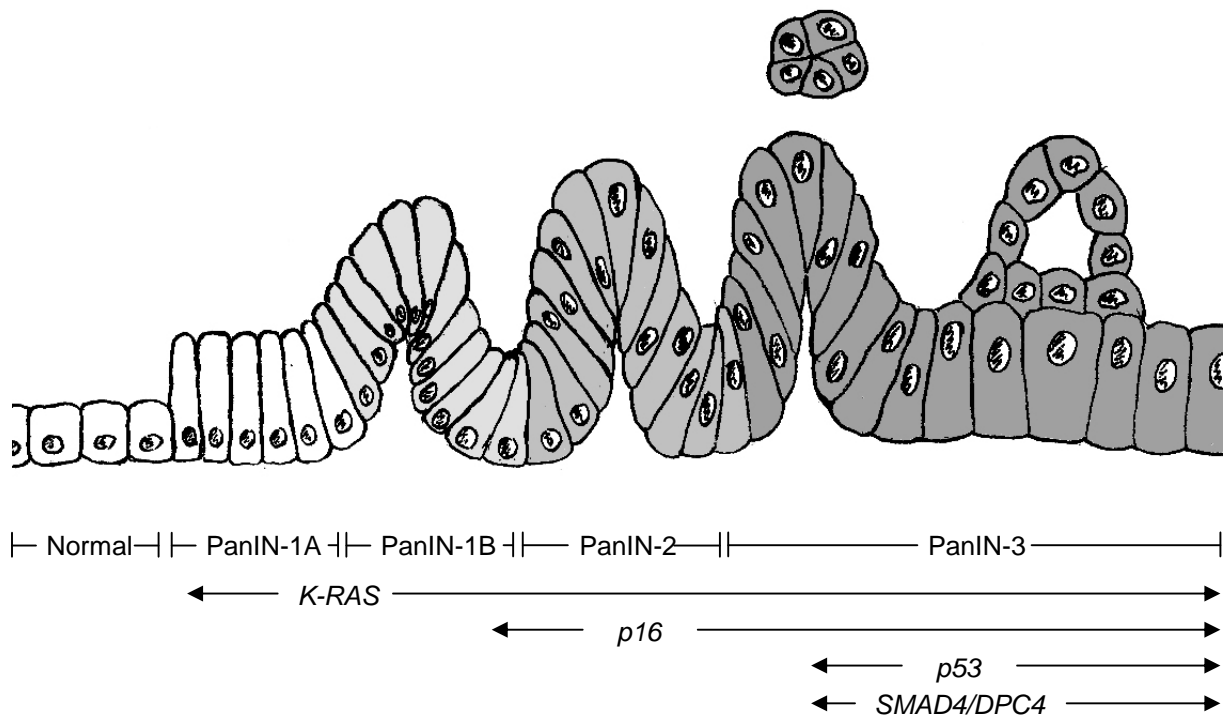


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des duktaalen Pankreaskarzinoms

(nach Hruban 2000)

Mit zunehmender Tumorprogression entwickeln sich aus den frühen Formen PanIN-2, die sich durch moderate nukleäre Veränderungen auszeichnen. Die letzte Stufe der Vorläuferformen in der Tumorprogression, die PanIN-3, sind durch schwere nukleäre Abnormalitäten wie abnorme Mitose und Abknospung von Zellen in das Lumen charakterisiert. Im Gegensatz zu frühen PanIN Formen findet man PanIN-3 nur noch in weniger als 5% nichtbefallenem Pankreas, wohingegen sie in 30-50% von invasiven PDAC vorkommen (39, 41, 80).

1.2. Genetische Veränderungen im Pankreaskarzinom

1.2.1. *K-RAS*

Untersuchungen an Karzinomen sowie an Vorläuferformen haben ergeben, dass in fast allen Pankreaskarzinomen und PanIN-Läsionen – z. T. sogar in morphologisch unauffälligem Pankreasgewebe – die GTPase *K-RAS* mutiert ist. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation bei der an Kodon 12 ein einzelnes Nukleotid substituiert worden ist (von GGT zu GAT bzw. GTT, in seltenen Fällen auch CGT) (2, 3, 13, 23, 90). Dadurch wird ein Glycin durch ein Aspartat, Valin oder Arginin ersetzt. Diese Mutation führt zu einem Verlust der intrinsischen katalytischen Eigenschaft von *K-RAS*, was zur Folge hat, dass *K-RAS* konstitutiv aktiv bleibt, da es sein gebundenes Guanin-Triphosphat nicht mehr spalten kann. *K-RAS* hat pleiotrophe Funktionen. So vermittelt es u. a. Zellproliferation, -überleben und -migration. Da man mutiertes *K-RAS*^{G12D} bereits in frühen Vorläuferformen nachweisen kann, geht man davon aus, dass *K-RAS* an der Initiation der Tumorentwicklung maßgeblich beteiligt ist. Aufgrund von gut funktionierenden, zellinternen Sicherheitsmechanismen, wie Onkogen induzierter Apoptose und Seneszenz, die einer unkontrollierten Zellproliferation entgegen wirken sollen, kommt es in den frühen PanIN-Läsionen noch nicht zu Tumorbildungen (48, 84).

1.2.2. *CDKN2A* Lokus

Ein weiterer, in 95% der Fälle von duktalem Pankreaskarzinom biallelisch mutierter Genlokus ist der Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 2A (*CDKN2A*) Lokus auf Chromosom 9p21. Dieser Genlokus enthält die Information für zwei funktionelle Genprodukte, die Tumorsuppressoren p16^{INK4A} und p14^{ARF}. INK4A wirkt als Cyclin-abhängige-Kinase Inhibitor auf den Komplex aus Cyclin D1 und Cyclin-abhängige-Kinase (engl. cyclin dependent kinase = CDK) 4 und 6, und verhindert so indirekt die Deaktivierung von die RB (Retinoblastoma). ARF hingegen inhibiert die Aktivität von Mdm2, einem negativen Regulator von p53. Dies verhindert die Markierung des Tumorsuppressors p53 für den 26S-proteosomalen Abbau (siehe Abbildung 2). Mutationen im *CDKN2A* Lokus treten erst ab den PanIN-2-Läsionen vermehrt auf (44, 49, 80).

Unter normalen, nicht kanzerogenen Umständen wird INK4A für die Entwicklung und Gewebhomeostasis nicht benötigt und wird dementsprechend nicht expremiert (39). Allerdings bewirkt aktiviertes *K-RAS* über die RAS/MEK-Kaskade und die Transkriptionsfaktoren Ets1 und Ets2 eine Initiation der Transkription von p16^{INK4A} (82).

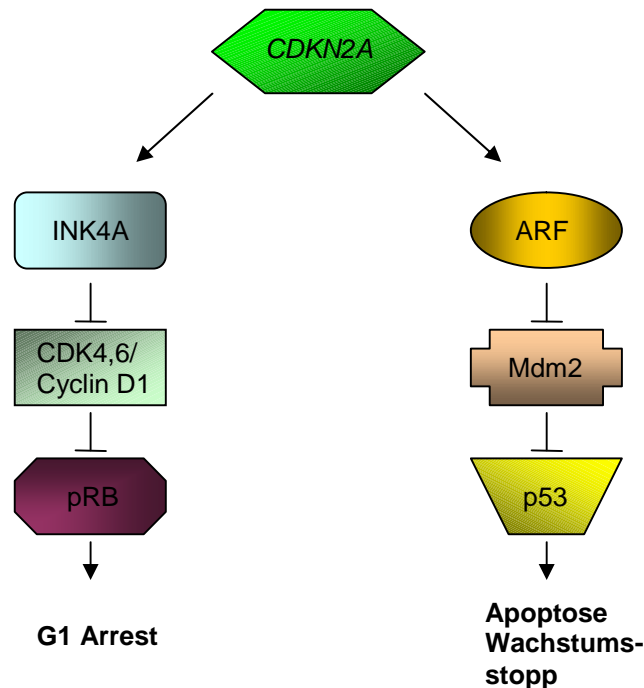


Abbildung 2: Zellzyklus- und Apoptoseregulation durch den *CDKN2A* Locus

(nach Schneider 2003)

1.2.3. *SMAD4/DPC4*

Der Tumorsuppressor *SMAD4* oder *DPC4* (für engl. depleted in pancreatic carcinoma) ist in über 50% der Pankreaskarzinome mutiert oder deletiert. Es ist auf Chromosome 18q21 lokalisiert und stellt eine wichtige Komponente in der Signaltransduktion des Transforming Growth Factors- β (TGF- β) dar. Nach Ligandenstimulation des Rezeptors kommt es zur Phosphorylierung von SMAD2/3 Proteinen, die ihrerseits mit SMAD4 einen Heterodimer bilden. Dieser Komplex translokalisiert in den Nukleus und löst dort die Transkription spezieller, gewebespezifischer Zielgene aus. So inhibiert die TGF- β Signalkaskade in vielen epithelialen Zelllinien und Geweben die Zellproliferation, in dem sie einen G1-Arrest auslöst. Läsionen in dieser Signalkaskade unterstützen die Karzinombildung in verschiedenen epithelialen Geweben, darunter der Pankreas. Wahrscheinlich ist die Tumorsuppressoraktivität von SMAD4 zum

größten Teil auf die proliferationsinhibierende Wirkung von TGF- β zurückzuführen. Allerdings wurde neulich eine TGF- β unabhängige Funktion von SMAD4 gezeigt.

So ergab eine Restaurierung der SMAD4 Expression im humanen Pankreaskarzinom in Xenotransplantationsexperimenten eine verringerte Tumorbildung, ohne dabei die TGF- β Sensitivität wieder herzustellen. Des Weiteren hat die Restauration der SMAD4 Expression eine Repression der Angiogenese und einen Wiederaufbau der extrazellulären Matrix zur Folge.

Mutation im *SMAD4* Gen treten gehäuft erst in der späten PanIN-Formen in Kombination mit aktivierten *K-RAS* auf (39, 80)

1.2.4. Der Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der das Genom reguläre Zellen vor genetischen Rearrangements und der Anhäufung von Mutationen schützt. Im aktiven Zustand ist p53 an der Checkpoint-Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion und der Seneszenz beteiligt. Extrazellulärer Stress (z. B. radioaktive Strahlung) oder intrazellulärer Stress (z. B. Onkogen Aktivierung) haben eine Aktivierung von p53 zur Folge (7, 22, 94, 99).

p53 ist in mehr als 50% der duktaalen Pankreaskarzinome mutiert. Meistens handelt es sich dabei um eine Missense-Mutation in der DNA erkennenden Domäne des Proteins. Für gewöhnlich geht mit der Mutation auch der Verlust des Wildtypallels einher. p53 Mutationen treten gehäuft erst in den späten Vorläuferformen PanIN-3 auf und sind somit auf einen späten Zeitpunkt in der Pankreaskarzinomentwicklung beschränkt (80, 82).

Mittels des CDK Inhibitors p21^{Cip1} kann p53 auch Einfluss auf die Aktivität des Komplexes aus Cyclin E/CDK 2 nehmen, und somit den Phosphorylierungsstatus von pRB mit beeinflussen. Auf diese Weise kann p53 indirekt einen G1-Arrest bewirken (82).

2. High Mobility Group Protein A1

Das High Mobility Group Protein A1 (HMGA1) gehört zur High Mobility Group (HMG) Proteinfamilie. Diese besteht aus den Proteinsubfamilien HMGA (ehemals HMGI/Y), HMGB (ehemals HMG-1 und -2) und HMGN (ehemals HMG-14 und -17) (64). Die Subfamilie HMGA spaltet sich ihrerseits in zwei unabhängige Mitglieder auf: HMGA1 und HMGA2. Das Augenmerk dieser Doktorarbeit liegt auf den HMGA1 Proteinen, weswegen die anderen Mitglieder der High Mobility Group Proteinfamilie hierin vernachlässigt werden.

Das *HMGA1* Gen befindet sich im humanen Organismus an dem genetischen Locus 6p21 (30). Zudem sind aber weitere inaktive Pseudogene bekannt. Das *HMGA1* Gen kodiert für die beiden funktionellen Genprodukte HMGA1a und HMGA1b. Diese beiden Proteine unterscheiden sich voneinander durch eine interne, elf Aminosäuren große Deletion im HMGA1b Protein, die durch alternatives Splicing der *HMGA1* mRNA zustande kommt (43) (siehe Abbildung 3).

HMGA1a

*NH₂ (M)SESSSKSSQPLASKQEKDGE**TEKRGRGRPRK**QPP**VSPGTALVGSC**KEPSEV**TPKRPRGRPK**GSKNKGAAKTRKTT**TPGRKPRGRPK**LEKEEEEGISQESSEEEQ COO*

HMGA1b

*NH₂ (M)SESSSKSSQPLASKQEKDGE**TEKRGRGRPRK**QPPKEPSEV**TPKRPRGRPK**GSKNKGAAKTRKTT**TPGRKPRGRPK**LEKEEEEGISQESSEEEQ COO*

■ AT-Hook

■ Bei HMGA1b deletierter Proteinbereich

Abbildung 3: Proteinsequenz von HMGA1a und HMGA1b

2.1. Regulation

Das *HMGA1* Gen ist durch einen komplexen Aufbau gekennzeichnet und besteht aus acht Exons (I-VIII) (siehe Abbildung 4). Diese acht Exons werden in mindestens acht verschiedene mRNA Formen umgeschrieben, welche durch ein kompliziertes Muster von alternativen Transkript- und Spleiß-Varianten zustande kommen. Die meisten dieser mRNA Formen unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem 5'- und 3'- untranslatierten Bereich (30, 43). Zusätz-

lich verfügt das *HMGAI* Gen über vier funktionelle Promotor/Enhancer-Regionen, die sich vor den Exons I-IV befinden. Diese vier Promotor/Enhancer-Regionen sind in der Lage, unabhängig von einander die Transkription des *HMGAI* Gens zu initiieren. Je nach dem, um was für ein stimulierendes Signal bzw. um welchen Zelltyp es sich handelt, beginnt die Transkription an einem oder mehreren verschiedenen Startpunkten, z. B. initiiert TPA in murinen Epithelzellen die Transkription an allen vier Startpunkten, wohingegen TPA in humanen Erythroleukämie-Zellen die Transkription ausschließlich am ersten Startpunkt veranlasst (64). Die Regulation des *HMGAI* Gens wird von vielen verschiedenen biologischen Faktoren, umweltbedingten Faktoren und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Dies beinhaltet u. a. Serum, Epithelial Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor α (TGF- α), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Interferon- β 1, Endotoxin, Retinolsäure, Hypoxie, Morphine sowie die Transkriptionsfaktoren AP-1, c-Myc und das humane Papillomavirusprotein E6 (65). Interessanterweise sind viele dieser Faktoren dafür bekannt, mit der Tumorentwicklung und Metastasenbildung in Verbindung zu stehen.

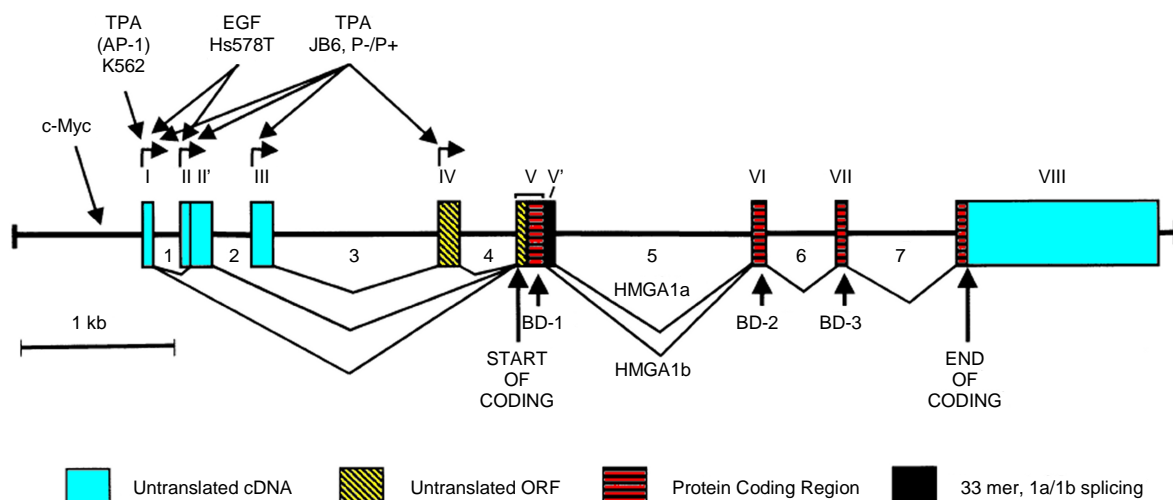


Abbildung 4: Struktur des *HMGAI* Gens (nach Reeves 2001)

2.2. Physiologische und biochemische Eigenschaften

HMGA1 Proteine zeichnen sich durch ein theoretisches molekulares Gewicht von 10,6 – 12 kD aus, tatsächlich befinden sie sich aber in einer SDS-Gelelektrophorese bei ungefähr 19 kD. Zudem sind sie in 5% Perchlorsäure lösbar, verfügen über eine ungewöhnlich hohe Konzentration an basischen, sauren und prolinen Aminosäuren und sind *in vivo* sehr stark phosphory-

liert. Eines der Hauptkennzeichen der HMGA1 Proteine ist ihre hohe intrinsische Flexibilität. Diese erreichen sie durch das Fehlen einer sekundären Proteinstruktur, solange sie nicht an Partner-Moleküle (DNA oder andere Proteine) gebunden oder sekundär modifiziert sind. Interagieren sie allerdings mit einem ihrer Partner, so nehmen die HMGA1 Proteine induzierte strukturelle Formen an. Somit ermöglicht ihnen ihre intrinsische Flexibilität die Interaktion mit ihren vielen verschiedenen Partner-Molekülen (64). Mit den DNA bindenden Domänen, den AT-Hooks (siehe Abbildung 3), sind die HMGA1 Proteine in der Lage, an die kleinere Furche von AT-reichen DNA-Abschnitten zu binden (70) (siehe Abbildung 5).

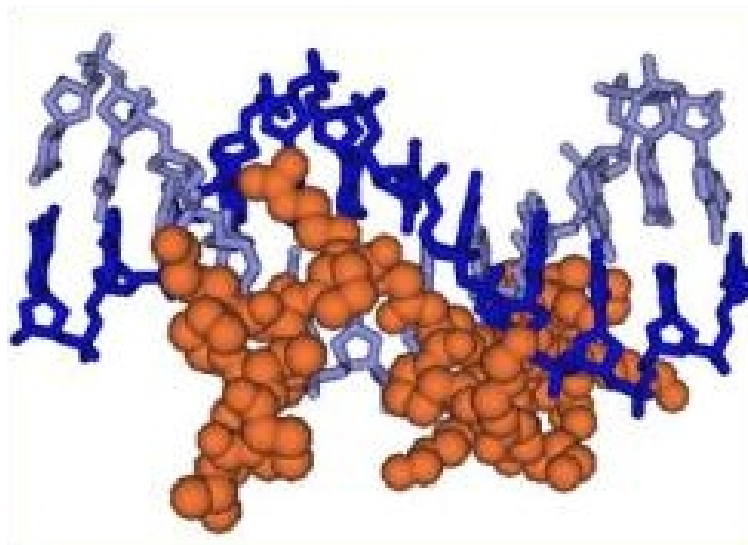


Abbildung 5: Bindung von HMGA1 an die kleinere Furche der DNA

(mit freundlicher Genehmigung von alcedo-biotech GmbH)

Jedes HMGA1 Protein verfügt über drei, unabhängig voneinander funktionierende AT-Hooks. Das AT-Hook Peptidmotiv ist während der Evolution von Bakterien zu höheren Organismen stark konserviert geblieben. Es besteht aus den Aminosäuren Pro-Arg-Gly-Arg-Pro, wobei die vier letzten Aminosäuren invariabel sind. Die HMGA1 Proteine erkennen primär die Chromatinstruktur und sekundär die Nukleotidsequenz ihrer Substrate, was zur Folge hat, dass sie bevorzugt an verdrehter oder in „Supercoils“ angeordneter DNA binden. Zudem sind sie in der Lage, lineare DNA Abschnitte zu verbiegen, gerade zu ziehen, aufzuwinden und Schlaufen zu induzieren. Zusätzlich können sie *in vitro* „Supercoils“ in entspannte Plasmid-DNA einfügen und außerdem lokale Veränderungen im Rotationsverhalten der DNA auf der Oberfläche des Nukleosoms bewirken (64).

2.3. Post translationelle Modifikationen

HMGA1 Proteine werden *in vivo* sehr stark post translationell modifiziert. Diese Modifikationen beinhalten Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen und Poly-ADP-Ribosylierungen (65). Durch diese nachträglichen Veränderungen können die Eigenschaften der HMGA1 Proteine gravierend beeinflusst werden. So reduziert die Phosphorylierung von Thr⁵³ und Thr⁷⁸ durch CDK1 die Bindungsaffinität von HMGA1a an die DNA um mehr als das 20fache (67). Des Weiteren wird HMGA1 an mehreren Stellen von CK2 (Ser¹⁰² und Ser¹⁰³) (95, 96) und PKC (Thr²¹, Ser⁴⁴ und Ser⁶⁴) (6) nach Stimulierung diverser Signalkaskaden phosphoryliert. Ferner führt die Acetylierung von Lys⁷¹ durch P/CAF zu einer Kaspase 3 abhängigen Apoptose (26). Dieser Apoptose geht eine komplette Hyperphosphorylierung mit einer anschließenden Hypophosphorylierung aller HMGA1 Proteine in der Zelle voraus. Deletionsexperimente haben gezeigt, dass für die HMGA1 induzierte Apoptose zusätzlich der dritte AT-Hook essentiell ist (19) (siehe Abbildung 6).

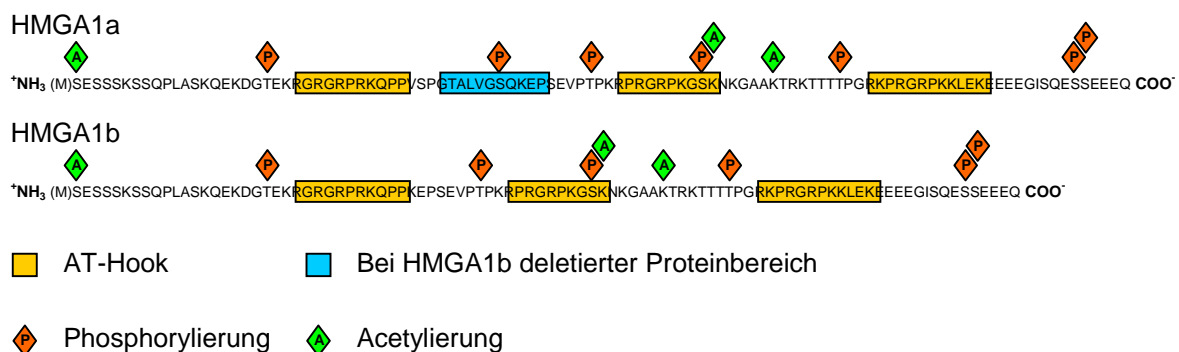


Abbildung 6: Sekundäre Modifikationen der HMGA1 Proteine

2.4. Interaktionspartner

In Anbetracht der Tatsache, dass HMGA1 Proteine an vielen Prozessen beteiligt sind, ist es nicht überraschend, dass sie in der Lage sind, mit vielen verschiedenen Partnerproteinen zu interagieren. Die meisten dieser Partnerproteine fungieren als Transkriptionsfaktoren oder sind am Aufbau und Erhalt der Chromatinstruktur beteiligt.

Die Interaktionspartner können spezifisch bestimmte Regionen der HMGA1 Proteine erkennen. So binden z. B. der Heterodimer aus ATF-2/c-Jun sowie die Transkriptionsfaktoren NF-Y und IRF-1 an größere Bereiche der HMGA1 Proteine. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Interaktion anderer Proteine, wie z. B. des Serum Response Factors (SRF), des NFκB p50/p65 Heterodimers sowie des Homodimers aus NFκB p50 auf kurze Abschnitte der HMGA1 Proteine (64).

Voraussetzung für die Interaktion zwischen Partnerproteinen und HMGA1 Proteinen ist, dass sich im Überlappungsbereich der beiden Proteine mindestens ein AT-Hook und eine sekundär modifizierte Aminosäure befinden. Zusätzlich sind einige der Interaktionspartner in der Lage, zwischen den beiden Spleißvarianten von HMGA1 unterscheiden und spezifisch nur an HMGA1a zu binden. Deren Überlappungsbereich mit den HMGA1 Proteinen enthält den im HMGA1b Protein deletierten Abschnitt. Da die HMGA1b Proteine nicht über diesen Bereich verfügen, können diese Interaktionspartner daher nur mit der HMGA1a Spleiß-Variante interagieren (64).

2.5. HMGA1 Proteine und Chromatinstruktur

HMGA1 Proteine sind in die Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur involviert. So sind sie in den G/Q- und C-Banden von murinen Metaphase-Chromosomen angereichert (24) und kolokalisieren gemeinsam mit Histon H1 und Topoisomerase II in den Scaffold Attachment Regions (SARs) (77). Werden die HMGA1 Proteine durch synthetische multi-AT-Hook (MATH) Proteine experimentell verdrängt, führt dies zu einer unvollständigen Kondensation der mitotischen Chromosomen. Dies hat zu der Erkenntnis geführt, dass HMGA1 Proteine an den dynamischen Veränderungen der Chromatinstruktur während der verschiedenen Stadien des Zellzyklus beteiligt und für den Erhalt und die Stabilisierung der Form von mitotischen Chromosomen notwendig sind (88).

Zusätzlich zu der Bindung an ganze Chromosomen, sind HMGA1 Proteine in der Lage, mit ihrem AT-Hook sowohl an Nukleosomenbestandteile (69) als auch an die, auf den Nukleosomen verlaufende DNA zu binden. Dabei können sie lokale Rotationsveränderungen in diese, an der Nukleosomenoberfläche verlaufenden, AT-reichen DNA-Abschnitte induzieren (72).

Als architektonische Transkriptionsfaktoren sind HMGA1 Proteine an der Regulation der Transkription multipler Gene beteiligt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Transkriptionsfaktoren nehmen sie aber nur indirekt an der Initiation der Transkription teil; durch dreidimensionale Veränderungen der DNA-Struktur erleichtern sie die Anlagerung von Partner-Transkriptionsfaktoren und ermöglichen somit den Transkriptionsstart (64). HMGA1 Proteine können die Transkription durch Ummodellierung der Chromatinstruktur auf zwei verschiedene Weisen kontrollieren. Im Fall des Hühner β -globin Gens induzieren sie Langstreckenveränderungen in der DNA, in dem sie mittels einer großen Schleife zwei, an den verschiedenen Enden des Gens liegenden Enhancer-Elemente zueinander bringen (10). Im Gegensatz dazu erzeugen HMGA1 Proteine im Fall des Interleukin Rezeptors 2α Gens nur eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur, in dem sie das Rotationsverhalten der DNA auf der Oberfläche eines inhibierenden Nukleosoms modifizieren und somit die Bindung des Transkriptionsfaktors Elf-1 an die DNA ermöglichen (68).

Zudem sind HMGA1 Proteine für die Aneinanderlagerung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu sogenannten Enhanceosomen notwendig (54). Das bestuntersuchte Beispiel hierfür ist das β -Interferon Gen, bei dem die HMGA1 Proteine lokale Veränderungen in der Promotor-DNA erzeugen und somit die Anlagerung der Partner-Transkriptionsfaktoren (der c-Jun/ATF-2 Heterodimer, IRF-3/7 und der NF κ B p50/p65 Heterodimer) an die DNA erleichtern (25, 92) (siehe Abbildung 7).

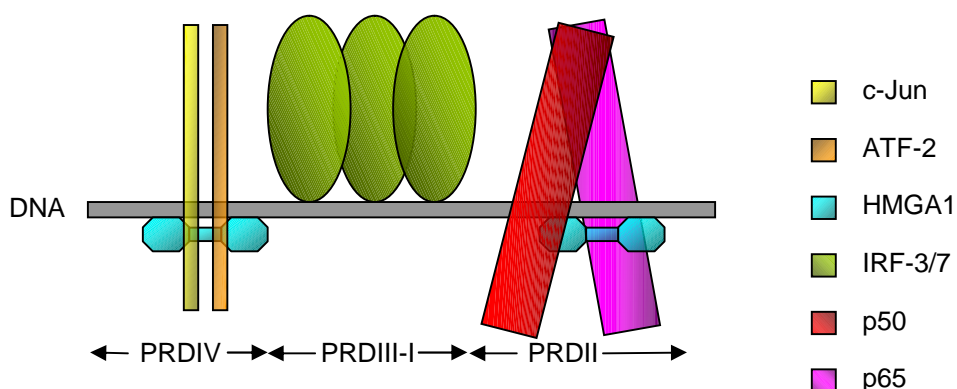


Abbildung 7: -Interferon Enhanceosom

2.6. Vorkommen und Onkogenese

HMGA1 Proteine sind an der Kontrolle des Zellwachstums, der Proliferation und der Differenzierung beteiligt (12). Daher werden sie während der Embryogenese stark exprimiert und können in embryonalem Gewebe leicht nachgewiesen werden (15). *Post natal* hingegen fällt die Proteinexpression in fast allen Geweben auf ein niedriges Niveau ab oder ist gar nicht mehr nachzuweisen (12). Nur in, auch nach der Geburt weiter proliferierendem Gewebe, wie z. B dem Thymus und den Hoden kann man weiterhin eine Expression der HMGA1 Proteine feststellen. Allerdings lässt sich in ruhenden Zellen die Aktivierung der HMGA1 Gene und Proteine kurze Zeit nach Zugabe von Wachstum stimulierenden Faktoren beobachten (30, 42, 60).

Eine abnormale Überexpression der HMGA1 Proteine ist sowohl für Bakterien als auch für höhere Organismen toxisch (71). Eine Anreicherung der Proteine hat eine Acetylierung von Lys⁷¹ und damit eine Kaspase-3 abhängige Apoptose zur Folge (26). Die wenigen Zellen, die diesem Zelltod entgehen, sind in ihren biochemischen und physiologischen Verhalten stark verändert. So sind diese Zellen immortalisiert und neoplastisch. Zudem zeichnen sich durch eine konstante Überexpression der HMGA1 Proteine aus. Dabei verhält sich der Level an überexprimierten HMGA1 Proteinen direkt proportional zur Bösartigkeit der Tumore und deren Metastasierungspotential (89). Dieses Verhältnis hat für viele verschiedene Krebsarten Gültigkeit, so dass HMGA1 als diagnostischer Marker in Erwägung gezogen wurde (33, 34). Dies beinhaltet sowohl Krebsarten wie Brust-, Darm-, Lungen-, Prostata- und Gebärmutterhalskrebs (65) als auch das Pankreaskarzinom (1, 93). Interessanterweise geht die Überexpression der Unterform HMGA1b mit noch größerer Bösartigkeit und größerem Metastasierungspotential einher als die von HMGA1a (66).

Microarray-Analysen von HMGA1 überexprimierenden Zellen haben gezeigt, dass die Überexpression zu einer Veränderung in verschiedenen Gensets, die z. B. für Apoptose, DNA-Reparatur, Tumorinitiation, Gewebeinvasion und Migration kodieren, führt (66).

3. Cyclin D1

In vielen verschiedenen Arten von Tumoren kann man eine Überexpression von Cyclin D1 nachweisen. Diese Überexpression korreliert mit einem frühen Krebsbeginn und dem Risiko der Tumorprogression und Metastasis. Auch für das Pankreaskarzinom wurde gezeigt, dass Cyclin D1 häufig stark überexprimiert ist (38, 81).

Cyclin D1 ist der zelleigene Hauptsensor und Mediator für extrazelluläre Wachstums- und Proliferationssignale in der frühen bis mittleren G1-Phase. Nach Stimulation durch z. B. Serum wird die Expression von Cyclin D1 stark angeregt. Daraus resultiert eine Bindung an CDKs, was eine lokale Ummodellierung der Chromatinstruktur von Genen, die an der Zellproliferation beteiligt sind, zur Folge hat (31).

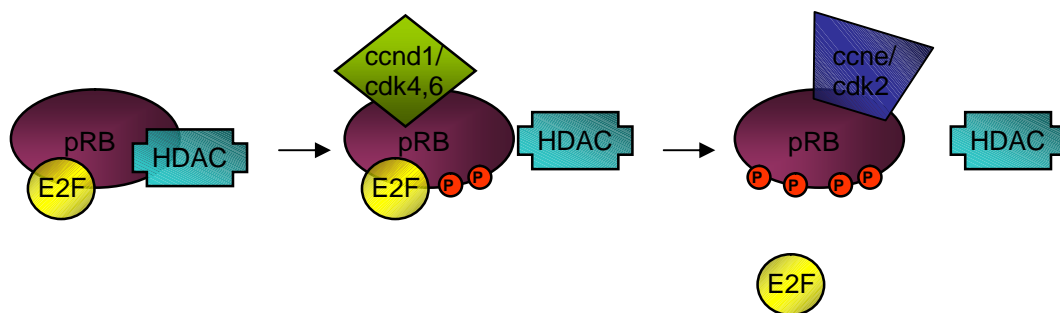


Abbildung 8: Phosphorylierung von pRB durch Cyclin D1 und Cyclin E

Cyclin D1 fungiert als regulatorische Untereinheit in dem Komplex aus Cyclin D1/CDK4, 6. Dieses Holoenzym ist zusammen mit dem Komplex aus Cyclin E/CDK2 maßgeblich an der sequentiellen Phosphorylierung und damit einhergehenden funktionellen Inaktivierung des Retinoblastoma Proteins (pRB) beteiligt. Das Retinoblastoma Protein (pRB) fungiert als Hauptregulator der Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase. Es bindet sowohl an Histondeacetylasen (HDACs) als auch an den Transkriptionsfaktor E2F und verhindert somit dessen Aktivität u. a. am *Cyclin E* Promotor. Der Komplex aus Cyclin D1/CDK4, 6 phosphoryliert pRB C-terminal, was zu einer Freisetzung der HDAC führt. Dadurch wird die Repression des *Cyclin E* Promotors aufgehoben, was eine erhöhte Cyclin E Expression zur Folge hat.

Im Anschluss daran vervollständigt der Komplex aus Cyclin E/CDK2 die Phosphorylierung und Inaktivierung von pRB, woraufhin E2F freigesetzt wird und die Zelle in die S-Phase übergeht (17, 31) (siehe Abbildung 8).

3.1. Regulation von Cyclin D1

Die Konzentration eines Proteins innerhalb der Zelle kann auf drei verschiedenen Kontroll-ebenen reguliert werden. Zum einen kann durch eine kontrollierte Gentranskription der Bestand an mRNA an die Bedürfnisse der Zelle angepasst werden. Des Weiteren kann durch eine regulierte Translation der mRNA zum fertigen Protein die Proteinkonzentration auf einem den zellulären Bedingungen entsprechendem Level gehalten werden. Auch die Degradierung eines Proteins durch das 26S-Proteasom stellt eine weitere Möglichkeit der Regulation des Proteingehalts in der Zelle dar.

3.1.1. Transkriptionelle Regulation

Im Fall von Cyclin D1 sind viele verschiedene extra- wie intrazelluläre Faktoren in die Initiation der Transkription involviert. Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie der Epithelial Growth Factor (EGF), der Insulin like Growth Factor (IGF) I und II, Aminosäuren, lysophosphatische Säure sowie Hormone wie Androgen, Retinolsäure und der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ Ligand. Des Weiteren können segregierte Faktoren von Fettzellen, gastrointestinale Hormone wie Gastrin, Tissue Growth Factor β , das Schilddrüsenhormon verwandte Protein (PTHrP) und Endostatin die Expression der mRNA in den jeweiligen Zellen regulieren. Zusätzlich sind viele verschiedene onkogene Signale wie ras, src, ErbB2, β -catenin, NF κ B, STATs sowie das SV40 small T-Antigene an der Transkription beteiligt (31). Diese wirken durch distinkte DNA-Bereiche im Promotorbereich von *Cyclin D1*. Zu diesen gehören u. a. T-Zell Faktor-, E2F-, NF κ B (40) und ATF/CRE (79) Erkennungsstellen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Genprodukte von *CDK2NA* p16^{INK4a} und p14^{ARF} zusätzlich zu ihren, in Kapitel 1.2.2. beschriebenen Funktionen, an den *Cyclin D1* Promotor binden können und dadurch dessen Aktivität inhibieren (18).

3.1.2. Translationelle Regulation

Die Translation der *Cyclin D1* mRNA erfolgt, wie bei den meisten eukaryotischen mRNAs in einer Cap-Struktur abhängigen Weise (37, 74). Die Cap-Struktur m^7GpppN (wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt) befindet sich am 5' Ende aller zellulärer eukaryotischer mRNAs (abgesehen von denen in Organellen) und wird von dem eukaryotischen Initiations-Faktor 4E (eIF4E) gebunden. eIF4E ist Bestandteil des heterotrimeren eIF4F Komplexes. Dieser besteht des Weiteren noch aus den beiden Proteinen eIF4G, welches als Rückgrat und Andockstation für die anderen Proteine des Komplexes und die 40S ribosomale Untereinheit fungiert, und eIF4A, einer ATP-abhängige RNA-Helikase, die für die Entwindung der zu translatierenden mRNA zuständig ist (siehe Abbildung 9). Die Bildung des eIF4F-Komplexes wird durch die Verfügbarkeit von eIF4E limitiert (51, 73).

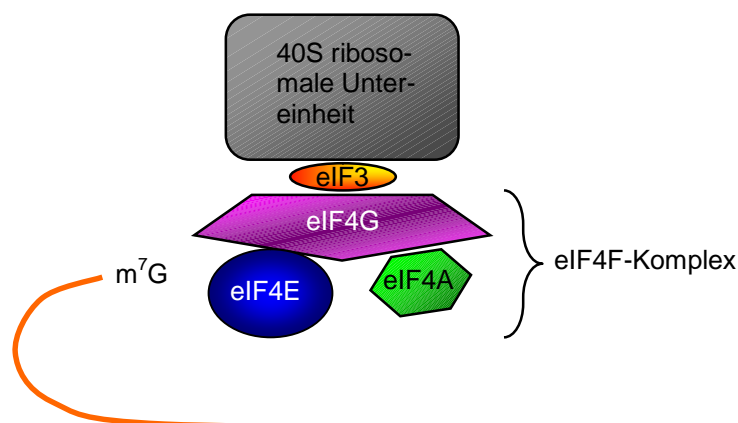


Abbildung 9: Translationsinitiation durch den eIF4F-Komplex

Die Interaktion zwischen eIF4G und eIF4E erfolgt über eine ungefähr 15 Aminosäuren lange Peptidsequenz. Diese Peptidsequenz teilen sich sowohl eIF4G- als auch die eIF4E-Inhibitorproteine (4E-BP1-3 bzw. PHAS-I für phosphorylated heat and acid soluble protein stimulated by insulin). Dies resultiert in einer Konkurrenz zwischen eIF4G und den 4E-BPs um die eIF4E Bindestelle. Die 4E-BP/eIF4E Bindung inhibiert die Cap-Struktur abhängige Translation, da der eIF4F-Komplex nicht mehr ausgebildet werden kann (73). Diese Bindung wird durch eine PI3K/AKT/mTOR (siehe Abbildung 10) abhängige Phosphorylierung reguliert: hypophosphoryliert sind die 4E-BPs fest an eIF4E gebunden, wohingegen eine Hyperphosphorylierung durch mTOR die Bindungsaffinität der 4E-BPs stark reduziert. Somit wird die

Translation von Cyclin D1 über die PI3K/AKT/mTOR Signalkaskade durch Phosphorylierung von 4E-BP reguliert (5, 37, 52, 76, 78).

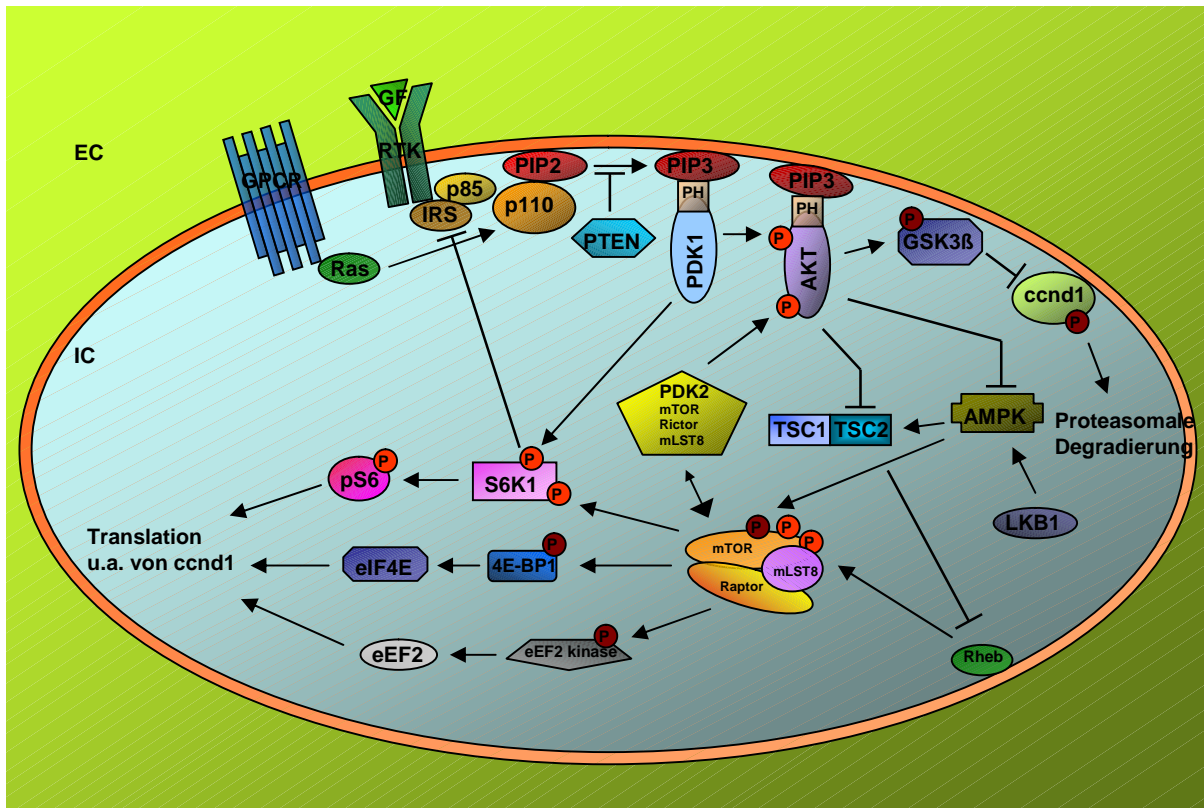


Abbildung 10: Translationskontrolle durch den PI3K/AKT/mTOR Signalweg

3.1.3. Regulation durch Degradierung

Die Degradierung von Cyclin D1 erfolgt ebenfalls über die PI3K/AKT-Signalkette (siehe Abbildung 10). Der Cyclin D1 Abbau wird mittels der Phosphorylierung von Threonin²⁶⁸ durch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) initiiert (21). Dies hat einen CRM1 vermittelten nukleären Export von Cyclin D1 zur Folge (8). Im Zytoplasma wird das phosphorylierte Cyclin D1 von dem E1-E2-Skp1/Cullin/F-Box-Komplex erkannt und mit Ubiquitin verknüpft (50, 57, 58). Die Ubiquitinierung hat eine rasche Degradierung des Proteins in den 26S-Proteasomen zur Folge (63). Obwohl der größte Teil des zelleigenen Cyclin D1 Abbaus über den Ubiquitin abhängigen 26S-Proteasomen-Abbau erfolgt, gibt es auch eine Ubiquitin unabhängige Cyclin D1 Degradierung durch das 26S-Proteasom. In diesem Fall wird der nukleo-

zytoplasmatische Transport und die Markierung für das 26S-Proteasom von dem Ornithin-decarboxylase regulierenden Protein ODC-Antizyme (OAZ1) vermittelt (59).

4. Insulinrezeptor

Die Aktivität der PI3K/AKT-Signalkette wird von verschiedenen membrangebundenen Rezeptoren reguliert. Darunter befinden sich diverse Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (5, 61). Ein wichtiger Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen für die Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade ist der Insulinrezeptor (INSR). Der Insulinrezeptor wird in zwei Isoformen, IRa und IRb unterteilt. Zusätzlich zu den beiden Isoformen gibt es noch den mit dem INSR sehr ähnlichen Insulin like Growth Factor 1 (IGF1) Rezeptor sowie Hybride aus den beiden Insulinrezeptorisoformen und dem IGF1R (IRa::IGF1R; IRb::IGF1R). Die beiden Insulinrezeptorisoformen unterscheiden sich durch eine gewebeabhängige Expression des 11. Exons der *INSR* mRNA. Während IRa über die von Exon 11 kodierten 12 carboxiterminalen Aminosäuren der α -Untereinheit verfügt, fehlen diese bei IRb. Die Insulinrezeptorisoformen und der IGF1R sind tetramere Proteine, welche aus jeweils zwei identischen extrazellulären α -Ketten und zwei transmembranen β -Untereinheiten aufgebaut (siehe Abbildung 11) sind (98).

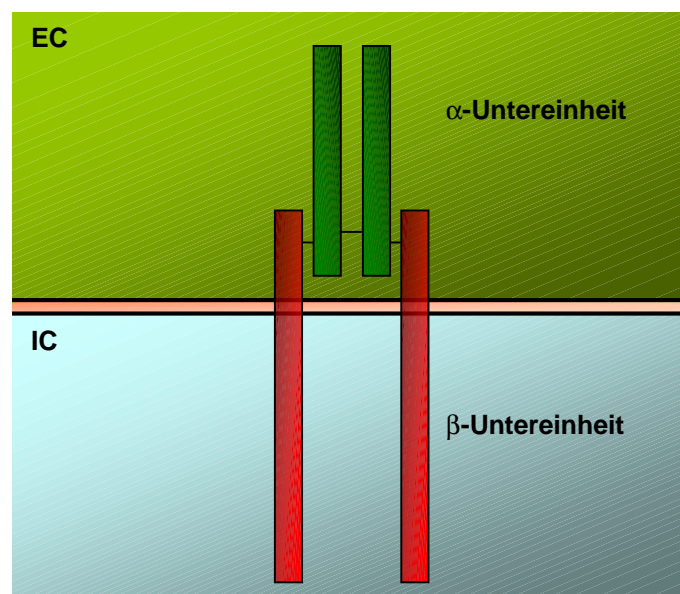


Abbildung 11: Modell des Insulinrezeptors

Die Expression von IRa beschränkt sich auf fetales Gewebe, das adulte Zentralnervensystem und hämatopoetische Zellen, wohingegen IRb in klassischen insulinsensitiven Geweben wie der adulten Leber, den Muskeln und dem Fettgewebe prädominiert. Im Gegensatz zu IRa ist

IRb hochaffin gegenüber Insulin, dafür kann IRa aufgrund der Expression des 11. Exons sowohl Insulin als auch IGF1 binden (98).

Nach Liganden-Stimulation des Rezeptors wird die β -Untereinheit an der juxtamembranen (Tyr⁹⁶⁰), der Kinase- (Tyr¹¹⁴⁶, Tyr¹¹⁵⁰ und Tyr¹¹⁵¹) und der carboxyterminalen Domäne (Tyr¹³¹⁶ und Tyr¹³²²) autophosphoryliert (36). Dies hat eine Rekrutierung und Tyrosinphosphorylierung von Insulinrezeptorsubstrat (IRS1-4) sowie anderer Scaffold-Proteine wie z. B. SHC, CBL, APS, SH2B, GAB1, GAB2, DOCK1 und DOCK2 zur Folge, wobei IRS1 und IRS2 die beiden wichtigsten Vertreter in der Weiterleitung des Insulinsignals sind (98). Die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bindet anschließend über ihre SH2 (Roussarcoma Oncogene Homology 2) Domäne an das phosphorylierte Tyrosin des YxxM-Motivs von IRS, woraufhin die katalytische p110-Untereinheit der PI3K freigesetzt und die PI3K/AKT-Signalkaskade in Gang gesetzt wird (5).

Das *INSR* Gen wird zu den „Housekeeping“ Genen gezählt. Es ist für das Zellwachstum essentiell und wird daher in allen Zellen auf einem gewissen basalen Niveau expremiert. Dennoch ist in verschiedenen Geweben eine unterschiedlich hohe Expression des *INSR* Gens zu beobachten. So wird es z. B. in der Leber, in Muskelzellen, im Gehirn und in Fettgewebe stark expremiert, was daraufhin weißt, dass es eine gewebespezifische Aktivierung des *INSR* Gen-Promotors geben könnte (56).

Die Promotorregion des *INSR* Gens erstreckt sich über 1800 bp vom Startcodon ATG in 5' Richtung und verfügt über einen hohen GC-Anteil. Sie enthält mehrere GGGCGG-Wiederholungen, die wahrscheinlich als Bindestellen für den ubiquitär expremierten Transkriptionsfaktor Sp1 fungieren (29). Vermutlich wird das oben erwähnte basale Expressionsniveau des *INSR* Gens durch Sp1 vermittelt (56). Der Promotor besitzt weder eine TATA-Box noch eine andere Konsensusinitiatorsequenz. Dafür verfügt er über mehrere Transkriptionsinitiationsstellen innerhalb der ersten 300 bp langen, stark GC-haltigen Region (29).

Gewebespezifische Initiation des *INSR* Gen-Promotors kann durch verschiedene Nährstoffe und Hormone vermittelt werden. So sind die Glukosekonzentration, Insulin selbst, Glucokortikoide, Mineralkortikoide u. a. an der Regulation der *INSR* Gen-Expression beteiligt (14, 56). In letzter Zeit haben verschiedene Studien gezeigt, dass auch HMGA1 an der transkriptionellen Regulation des *INSR* Gens beteiligt ist (11). So bildet HMGA1 gemeinsam mit Sp1 und

dem CCAAT-Enhancer bindenden Protein β (C/EBP β) in transformierten Leberzellen einen Nukleoproteinkomplex, der für die erhöhte Expression des IR in den Zellen mitverantwortlich ist. Dieser Nukleoproteinkomplex bindet spezifisch an zwei abgegrenzte Promotorregionen, C2 und E3 (siehe Abbildung 12) (29). Auch für Brustkrebszellen wurde eine Transkriptionsaktivierung durch HMGA1 nachgewiesen. In diesem Fall bildet es allerdings einen Komplex mit Sp1 und dem Activator Protein 2 (AP2) (62).

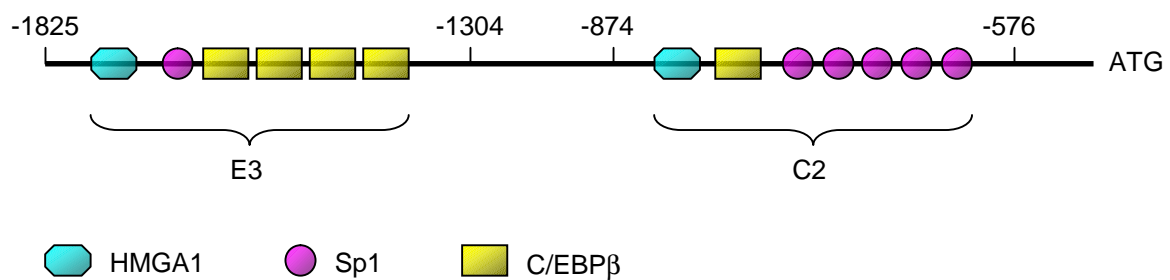


Abbildung 12: Modell der HMGA1 Bindestellen im *INSR* Promotor (nach Foti 2003)

Das *INSR* Gen wird in vielen Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert. Zu diesen Tumoren gehören Krebsarten wie Brust-, Darm- und Eierstockkrebs (35, 53, 55, 87). Es wird vermutet, dass die Überexpression eines funktionellen Insulinrezeptors in diesen Krebsarten eine positive Auswirkung auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung hat. Auch für das Pankreaskarzinom wurde gezeigt, dass Insulin zur Proliferationssteigerung führen kann (27).

II. Material und Methoden

1. Zellkultur

Zur Untersuchung des HMGA1 Knock down Phänotyps wurde mit zwei unabhängigen Pankreaskarzinom-Zelllinien gearbeitet. Bei den hierfür verwendeten Zelllinien handelte es sich um MiaPaCa2 und DanG.

1.1. Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung wurden die Zelllinien DanG und MiaPaCa2 in RPMI (Invitrogen) bzw. DMEM (Invitrogen) Medium, dem 10% FCS (Invitrogen) und 1% Penicilin/Streptomycin (Invitrogen) zugesetzt wurden, bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration in Zellkulturflaschen (BD Bioscience) inkubiert.

1.2. Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS (Invitrogen) gewaschen, für 5min in Trypsin (Invitrogen) bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium abgewaschen und für 5min bei RT und 1100rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und 10% der Zellsuspension in einer neuen Zellkulturflasche (BD Bioscience) weitergezogen.

1.3. siRNA Transfektion der Zellen

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion passagiert (siehe oben), in einer Konzentration von 50.000 Zellen/6-Lochplatten-Loch bzw. 2.500 Zellen/96-Lochplatten-Loch ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration inkubiert. Zu Beginn der Transfektion wurden die Pankreaskarzinom-Zellen mit FCS-freien Medium gewaschen und anschließend mit FCS-freien Medium überschichtet. Die siRNA wurde in Optimem (Invitrogen) aufge-

nommen und zu den Zellen in einer Konzentration von 200nM gegeben. Als Vehikel zum Einschleusen der siRNA in die Zellen wurde Oligofectamine (Invitrogen) in einer finalen Konzentration von 0,25% verwendet. Nach 4h bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration wurde die Transfektion durch Zugabe von Medium, dem 20% FCS (Invitrogen) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) zugesetzt wurde, abgeblockt. Zur Vermeidung von Toxizität wurde das Medium nach 24h Stunden gegen neues ausgetauscht. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 72h bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration inkubiert.

1.4. Inhibierung der proteosomalen Aktivität durch MG132

Die Pankreaskarzinom-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert. 60h nach der Transfektion wurde der Proteasomeninhibitor MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) in einer Konzentration von 10µM zugegeben und die Zellen für weitere 12h bei 37°C und 5,0% CO₂ Konzentration inkubiert.

1.5. Zellzahlbestimmung

Pankreaskarzinom-Zellen wurden nach dem obigen Protokoll in einer 12-Lochplatte (BD Bioscience) mit einer Konzentration von 25.000 Zellen/12-Lochplatten-Loch transfiziert. Alle 24h wurden Triplicate-Proben genommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

1.6. BrdU-Färbung

Pankreaskarzinom-Zellen wurden nach obigen Protokoll in einer 96-Lochplatte (BD Bioscience) mit einer Konzentration von 2.500 Zellen/96-Lochplatten-Loch transfiziert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde der BrdU-Zellproliferation ELISA Kit (Roche) verwendet. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen für 2h mit dem Pyrimidinanalog 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) bei 37°C inkubiert, was zu einer Inkorporation von BrdU in die DNA proliferierender Zellen führt. Anschließend wurden die Zellen gemäss des Herstellerprotokolls weiterbehandelt. Mit Hilfe eines anthos 2001-Spektrophotometers (anthos 2001, lab.tec instruments) wurde die durch die BrdU-Inkorporation hervorgerufene Farbänderung

des Nachweisreagenz bei einer Wellenlänge von 370 nm (Referenz-Wellenlänge 492 nm) bestimmt.

1.7. Zellzyklus-Analysen

Pankreaskarzinom-Zellen wurden nach dem obigen Protokoll in einer 6-Lochplatte (BD Bioscience) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen abtrypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen, in Propidium-Iodid (PI) Puffer (0,1% Natriumcitrat; 0,1% Triton X-100; 50µg/ml PI) aufgenommen und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Durchfluss-Cyctometer (FACSan, BD Bioscience) entsprechend ihres Chromatingehalts sortiert. Zellen mit einem Chromatingehalt von 2n (diploid) wurden der G1-Phase, Zellen mit einem Chromatinanteil zwischen 2n und 4n der S-Phase und Zellen mit ~4n der G2-Phase zugerechnet. Die Summe aller Zellen wurde auf 100% gesetzt und so der prozentuale Anteil der verschiedenen Fraktionen bestimmt.

2. Extraktion und Reinigung von Proteinen

2.1. Proteinextraktion aus Zelllinien im Ganzellaufschluss

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot wurden Ganzellextrakte aus humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien gewonnen. Die kultivierten PDAC-Zelllinien wurden nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von IP-Puffer (50mM HEPES, pH 7,9, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0, 0,5% NP-40, 10% Glycerin, 1% Phosphataseinhibitor, 1% Proteaseinhibitor) und darauffolgender Homogenisierung. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 15min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert, der Überstand übernommen und nach Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

2.2. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Ganzzellextrakte wurde nach der Bradfordmethode (Bradford, 1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard gemessen. Durch Bindung der Proteine an Coomassie® Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad laboratories) ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465nm nach 595nm. Mit Hilfe eines anthos 2001-Spektrophotometers (anthos 2001, lab.tec instruments) wurde diese Änderung bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt.

2.3. Western Blot Analyse

2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine der Ganzzellextrakte wurden in Laemmli-Ladepuffer (250mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 20mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 aufgenommen und für 5min bei 95°C denaturiert. In einem diskontinuierlichen SDS-Elektrophorese-system nach Laemmli (1970) wurden die in gleicher Proteinkonzentration aufgetragenen Ganzzellextrakte mittels eines Sammelgels (Sammelgelpuffer: 0,13M Tris/HCl, pH 6,8, 4,5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,2% TEMED) und eines Trenngels (Trenngelpuffer: 0,39M Tris/HCl, pH 8,9, X% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,05 % APS, 0,2% TEMED) in einer Hoefer SE 250 Elektrophorese-Kammer (Amersham Biosciences) der Größe nach aufgetrennt. Abhängig von der Größe der nachzuweisenden Proteine wurde der Acrylamidgehalt des Trenngels bestimmt und mit der entsprechenden Menge Acrylamid hergestellt (siehe Tabelle 1). Die vertikale Auftrennung der Proteine geschah in einem Elektrophoresepuffer (192mM Glyzin, 250mM TRIS, 1% SDS, pH 8,8). Die Molekulargewichte wurden anhand eines mitaufgetragenen Proteingrößenstandard (10kDa - 250kDa) (Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad laboratories) bestimmt.

2.3.2. Western Blot

In einem semi-dry Verfahren (PerfectBlue™ Semi-Dry-Electroblotter, PeqLab) wurden die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bei 150mA pro 46cm² Gelfläche in

Transferpuffer (39mM Glyzin, 48mM TRIS, 0,038% SDS, 20% Ethanol) auf eine Polyvinylidendifluorid (PDVF)-Membran (Millipore Corporation) transferiert. Entsprechend der Größe der zu transferierenden Proteine wurde die Transferdauer bestimmt (siehe Tabelle 1). Um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer 60min in Odyssey-Puffer (LI-COR Biosciences) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen spezifischen primären Antikörper (siehe Tabelle 1) über Nacht bei 4°C in Odyssey-Puffer (LI-COR Biosciences) auf einem Schwenker inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Western Blot Waschpuffer (PBS; 0,1% NP-40) für jeweils 10min wurde der spezifische fluorophorgekoppelte sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 2) mit einer Anregungswellenlänge von 680nm für 1h zugegeben. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper durch dreifaches Waschen mit Western Blot Waschpuffer (PBS; 0,1% NP-40) für jeweils 10min entfernt und die Visualisierung der Immunkomplexe erfolgte. Bei einer Emissionswellenlänge von 700nm wurden die Immunkomplexe mit einem Odyssey-Infrarot-Scanner (LI-COR Biosciences) und entsprechenden Einstellungen in der Odyssey-Software (Version 2.0.1, LI-COR Biosciences) sichtbar gemacht.

Zur Demonstration der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde die ubiquitär exprimierte Cytoskelettkomponente β -Aktin auf der gleichen Membran nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 30min in einem „Stripping“ Puffer (25mM; 2% SDS; pH 2,0) inkubiert und anschließend für eine weitere Stunde mit Odyssey-Puffer geblockt. Die darauffolgende Inkubation mit dem β -Aktin-Antikörper (siehe Tabelle 1) erfolgte über Nacht bei 4°C in Odyssey-Puffer (LI-COR Biosciences). Die darauffolgende Arbeitsweise zur Visualisierung des β -Aktins wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Tabelle 1: Verwendete erste Antikörper im Western Blot Verfahren

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Proteingröße	Prozentigkeit SDS-Gel	Transferzeit
Monoklonaler Ratten-Anti-Cyclin D1 Antikörper (Calbiochem)	humanes Cyclin D1	1:250	36kDa	15%	20min
Polyklonaler Hase-Anti-Cyclin A-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology)	humanes Cyclin A; AS 1 - 432	1:200	55kDa	15%	20min
Monoklonaler Maus-Anti-RB Antikörper (BD Bioscience)	humanes RB; AS 332 - 344	1:500	110kDa	7,5%	45min
Polyklonaler Hase-4E-BP1-Antikörper (Cell Signaling Technology)	humanes 4E-BP1	1:500	19kDa	15%	20min

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Protein- größe	Prozentigkeit SDS-Gel	Transferzeit
Monoklonaler Maus-Anti-Insulin Rezeptor β -Antikörper (Cell Signaling Technology)	humaner Insulin Rezeptor	1:500	95 kDa	7,5%	45min
monoklonaler Maus-Anti- β -Aktin-Antikörper (Sigma)	humanes β -Aktin	1:2000	42 kDa		

AS = Aminosäure; kDa = kilo Dalton

Tabelle 2: Verwendete zweite Antikörper im Western Blot Verfahren

Antikörper	Spezifität	Verdünnung
polyklonaler Alexa Fluor [®] 680-Ziege-Anti-Hase-Antikörper (Molecular Probes)	IgG (schwere und leichte Kette)	1:2000
polyklonaler Alexa Fluor [®] 680-Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Molecular Probes)	IgG (schwere und leichte Kette)	1:2000

AS = Aminosäure; kDa = kilo Dalton

3. DNA und RNA Analysen

3.1. Real Time PCR

Zur spezifischen Bestimmung der mRNA-Expression einzelner Zielgene wurden Real Time PCR-Analysen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 5 μ l cDNA von transfizierten Pankreaskarzinom-Zellen mittels Real Time PCR (50°C 2min, 95°C 10min, 1 PCR-Zyklus; 60°C 1min, 95°C 15sec, 40 PCR-Zyklen; Probenvolumen 25 μ l) in einem Real Time PCR-Gerät (ABI PRISM 7700 detection system, PE Applied Biosystems) amplifiziert. Die Menge der amplifizierten DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs SYBR®Green (Power SYBR®Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) von dem Real Time PCR-Gerät quantifiziert. In einem weiteren Experiment wurde die mRNA-Expression des Housekeeping-Gens Cyclophilin (ppia) bestimmt und die vorher gemessenen Werte darauf normalisiert.

Intronüberspannende, Zielgen-spezifische Primerpaare (siehe Tabelle 3) wurden mit der Software Primer Express™ (PE Applied Biosystems) ausgewählt und von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert.

Zur Bestimmung der quantitativen Expression der mRNA wurden spezifische Plasmidverdünnungsreihen (5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 , und $1,6 \times 10^2$ Moleküle) der Zielgene hergestellt und in jeder Real Time PCR mitgeführt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3: Verwendete Real Time PCR Primer

Primername	Sequenz
Hmgal fwd	5´ -CAGCGAAGTGCCAACACCTAAG-3´
Hmgal rev	5´ -CCTTGGTTTCCTTCCTGGAGTT-3´
Cyclophilin (ppia) fwd	5´ -ATGGTCAACCCACCGTGT-3´
Cyclophilin (ppia) rev	5´ -TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC-3´
Cyclin D1 (ccnd1) fwd	5´ -GCCGAGAAGCTGTGCATCTAC-3´
Cyclin D1 (ccnd1) rev	5´ -GTTCAATGAAATCGTGC GGG-3´
Insulinrezeptor (insr) fwd	5´ -ACCTGCACCACAAATGCAAGA-3´
Insulinrezeptor (insr) rev	5´ -AGACGTCACCGAGTCGATGGT-3´

Tabelle 4: Verwendete Vektoren


Name	Verwendung	Vektor	Herkunft
pRT-hmgal	Real Time PCR-Standardkurve	pCR®II-TOPO®	Invitrogen
pRT-ppia	Real Time PCR-Standardkurve	pCR®II-TOPO®	Invitrogen
pRT-ccnd1	Real Time PCR-Standardkurve	pCR®II-TOPO®	Invitrogen
pRT-insr	Real Time PCR-Standardkurve	pCR®II-TOPO®	Invitrogen

3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.1. PCR zur Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten

Zur Herstellung der spezifischen Real Time PCR-Plasmidverdünnungsreihen wurden mit den Real Time PCR-Primern sequenzspezifischen DNA-Fragmente amplifiziert.

Dazu wurde mit den intronüberspannenden, Zielgen-spezifischen Primerpaaren (siehe Tabelle 3) in einer Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) 100-150bp lange DNA-Fragmente synthetisiert. Die dabei verwendete Anzahl der Verdopplungszyklen variierte entsprechend der Amplifikationseffizienz zwischen 30 und 40 Zyklen. Die Durchführung der PCR erfolgte bei folgenden Bedingungen:

1.	Initiale Denaturierung der DNA	94°C	3min	
2.	Denaturierung	94°C	30sek	 30 - 40 x
	Anlagerung der Primer	X°C	30sek	
	Elongation durch die Polymerase	72°C	30sek	
3.	Terminale Elongation	72°C	7min	

Als Ausgangsmenge für eine PCR wurden 100ng cDNA eingesetzt. Mittels der Software Primer Express™ (PE Applied Biosystems) wurden die Oligonukleotidprimer (MWG Biotech AG, Ebersberg) und deren Anlagerungstemperatur (X°C) bestimmt. Die Primer wurden in einer finalen Konzentration von 300nM eingesetzt. Die verwendete Polymerase benötigt zur Synthetisierung von 1000bp ungefähr eine Minute. Dementsprechend wurde die verwendete Elongationszeit gewählt. Die PCR wurde unter Verwendung des REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma) in einem Volumen von 30µl durchgeführt.

Der Erfolg der Amplifizierung der DNA-Fragmente in der PCR wurde anschließend in einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.3. Klonierungstechniken

Zur weiteren Herstellung der spezifischen Real Time PCR-Plasmidverdünnungsreihen wurden die PCR-Fragmente in den pCR®II TOPO-Vektor (Invitrogen) ligiert.

Die bei der PCR verwendete Taq-DNA-Polymerase (RedTaq™ DNA Polymerase, Sigma) fügt den PCR-Fragmenten am 3'-Ende einen aus einem einzelnen Adenosin bestehenden Überhang an. Der linearisierte und „aktivierte“ pCR®II TOPO-Vektor (Invitrogen) verfügt an seinen 3'-Enden über Thymidin-Überhänge, die an Topoisomerase I reversiv gekoppelt sind. Kommt es zu einer Aneinanderlagerung der Adenosine des PCR-Fragments mit den Topoisomerase gekoppelten Thymidinen des Vektors, so wird das PCR-Fragment mit Hilfe der TOPO-TA cloning®-Methode (Invitrogen) in den Vektor ligiert.

3.3.1. Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Anreicherung des Ligationsansatzes wurde die ligierte DNA in kompetenten Bakterien vervielfältigt.

Zu diesem Zweck wurden 3µl eines 10µl Ligationsansatzes vorsichtig zu kompetenten, auf Eis aufgetauten Bakterien (E.coli TOP10, Invitrogen) gegeben. Die Bakterien wurden für 30min auf Eis inkubiert und anschließend für exakt 30sec auf 42°C erwärmt (Hitzeschock). Im Anschluss daran wurden die Bakterien sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glukose) wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C geschüttelt, während der sie ihre Antibiotikumresistenz ausbilden konnten. Anschließend wurden empirisch ermittelte Mengen des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Erfolg der Transformation des Ligationsansatzes in die Bakterien wurde mit Hilfe von PCR-Analysen untersucht.

3.3.2. PCR-Analyse von Transformandenklonen

Um den Erfolg der Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien zu überprüfen, wurden die Bakterien in einer PCR auf die Plasmid-DNA untersucht.

Dazu wurden die zu untersuchenden Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, auf eine neue Agarplatte mit dem Selektionsantibiotikum zur späteren Anzucht in Flüssigmedium überimpft und die Pipettenspitze direkt in das Reaktionsgefäß mit dem PCR-Ansatz ausgestrichen. Durch die Verwendung von Plasmid-spezifischen Primern (siehe Tabelle 3) wurde das Vorkommen der Plasmid-DNA in den Bakterien überprüft. Zum Aufschluss der Bakterienmembran wurde die PCR mit einer initialen Denaturierung von 10min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer Agarosegelelektrophorese auf ihre Richtigkeit kontrolliert.

3.3.3. Agarosegelelektrophorese

Um einzelne DNA-Fragmente einer PCR nachzuweisen, wurden diese ihrer Größe entsprechend in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Zu diesem Zweck wurde die DNA auf Agarosegele aufgetragen. Die Agarosegele wurden durch Aufkochen von Agarose in 1xTAE Puffer (40mM Tris-Azetat, 1mM EDTA, 0,35% Eisessig) und Zugabe von Ethidiumbromid (0,1%) hergestellt. Die dabei verwendete Konzentration der Agarose (PeqGold Universal Agarose, PeqLab) variierte entsprechend der Grö-

ße des nachzuweisenden DNA-Fragments (0,7-3% Agarose). Die einzelnen DNA-Fragmente wurden der Größe nach elektrophoretisch (80-100V, Sunrise™, Gibco BRL) aufgetrennt. Der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid ermöglichte eine Visualisierung der DNA unter UV-Licht (302nm).

Zur Bestimmung der Größe der DNA wurden DNA-Marker mit einer Größe von 100-10.000bp (DNA-Leiter Mix, PeqLab) und 50-1.031bp (50bp DNA-Leiter, PeqLab) verwendet.

3.3.4. Plasmidvervielfältigung

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde LB-Medium (Fluka) nach Zugabe des Selektionsantibiotikums mit dem plasmidtragenden Klon angeimpft und für ungefähr 16 Stunden bei 37°C und 200rpm im Bakterienschüttler geschüttelt. Flüssigmedium wurde entweder mit einem von einer Agarplatte gepickten Klon oder mit einer dauerhaft angelegten Glycerinkultur (400µl Glycerin, 500µl Bakteriensuspension; Lagerung –80°C) angeimpft.

3.4. Isolierung von DNA und RNA

3.4.1. DNA-Isolierung

DNA wurde aus 5ml (Mini Prep) oder 150ml Bakteriensuspension (Maxi Prep) nach Anleitung und Kit (QIAprep® Spin Miniprep Kit, EndoFree® Plasmid Maxi Kit) der Firma Qiagen isoliert.

3.4.2. RNA-Isolierung

RNA wurde aus kultivierten Zelllinien mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) und nach Protokoll der Firma Qiagen isoliert.

3.4.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch im Spektralphotometer (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop/PeqLab) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen.

Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde aus dem Verhältnis OD260/OD280 bestimmt. Dieser Quotient muss über 1,6 liegen.

3.4.4. Herstellung von cDNA

Die Konzentration der RNA von Pankreaskarzinom-Zellen wurde quantifiziert (siehe oben) und mit RNase-freiem Wasser normalisiert. Mit Hilfe des TaqMan® Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (25°C für 10min, 50°C für 1 Stunde, 95°C für 5min).

3.5. Chromatin Immunopräzipitation

Pankreaskarzinom-Zellen wurden nach dem obigen Protokoll in 6-Lochplatten (BD Bioscience) kultiviert. Nach 72h wurden sie mit 37% PFA und 1,25M Glycin fixiert, mit kaltem PBS gewaschen, gerntet und für 2min bei 4°C und 1600rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Lyse-Puffer 1 (50mM Tris pH 8,0; 2mM EDTA pH 8,0; 0,1% NP-40; 10% Glycerol; 1% Proteaseinhibitor; 1% Phosphataseinhibitor) aufgenommen und die Zellkerne durch mehrmaliges Aufziehen in einer G25-Kanüle isoliert. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 3.000rpm wurden die Zellkerne in Lyse-Puffer 2 (50mM Tris pH 8,0; 5mM EDTA pH 8,0; 1% SDS) aufgenommen und das Chromatin mittels eines Ultraschallgeräts (Bandelin Sonoplus 2070) in ungefähr 300bp bis 400bp große Fragmente gespalten. Die Chromatinextrakte wurden danach für 10min bei 4°C und 14.000rpm zentrifugiert, der Überstand schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Probenverarbeitung wurden 100µg Chromatin in Dilutionspuffer (50mM Tris pH 8,0; 0,5mM EDTA pH 8,0; 0,5% NP-40; 200mM NaCl) aufgenommen. 20µg Chromatin wurden als Input-Proben in Elutionpuffer (10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 1% SDS) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zur Präabsorption wurden die ChIP-Proben für 4h mit Agarose A (Kaninchen-Antikörper) bzw. Agarose G (Maus-, Ziege-, u.a. Antikörper) bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die ChIP-Proben für 1min bei 4°C und 800rpm abzentrifugiert und der Über-

stand über Nacht mit dem entsprechenden Antikörper (siehe Tabelle 5) bei 4°C auf einem Rotator gefärbt. Zur Immunopräzipitation wurden die ChIP-Proben für 4h mit Agarose A bzw. Agarose G bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die gefärbten ChIP-Proben wurden für 1min bei 4°C und 800rpm abzentrifugiert und jeweils dreimal mit Hochsalzpuffer (20mM Tris pH 8,0; 2mM EDTA pH 8,0; 1% NP-40; 500mM NaCl; 0,1% SDS), LiCl-Puffer (20mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 0,5% NP-40; 250mM LiCl; 0,5% Na-deoxycholat) und Niedrigsalzpuffer (10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die ChIP-Proben in Elutionpuffer aufgenommen und für 30min auf 65°C erwärmt. Anschließend wurden die ChIP-Proben für 2min bei 4°C und 5000rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,25M wurde zu den Input- und ChIP-Proben gegeben und die Proben anschließend bei 65°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 2h bei 45°C mit Proteinase K inkubiert. Die Proben wurden zu gleichen Volumina mit Phenol/Chloroform gemischt und für 5min bei 4°C und 14rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen mit Chloroform gemischt und für 5min bei 4°C und 14rpm abzentrifugiert. Natriumacetat wurde bis zu einer Endkonzentration von 10% zu dem Überstand gegeben und die DNA mit 100% EtOH und tRNA für 30min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde für 15min bei 4°C und 14.000rpm abzentrifugiert und mit 70% EtOH gewaschen. Nach einstündiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 37°C gelöst.


Tabelle 5: Verwendete Antikörper bei der Chromatin Immunopräzipitation

Antikörper	Spezifität
Polyklonaler Hase-Anti-C/EBP β -Antikörper (Santa Cruz Biotechnology)	C-Terminus von C/EBP β
Polyklonaler Ziege-Anti-hmga1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology)	N-Terminus von hmga1
monoklonaler Maus-Anti- β -Aktin-Antikörper (Sigma)	humanes β -Aktin

3.5.1 ChIP-PCR

Um die im ChIP gewonnenen Promotor-Abschnitte in einer darstellungsfähigen Konzentration zu erhalten wurden die DNA-Fragmente mit Promotor-spezifischen Primerpaaren (siehe Tabelle 6) in einer PCR amplifiziert. Die dabei verwendete Anzahl der Verdopplungszyklen

variierte entsprechend der Amplifikationseffizienz zwischen 30 und 40 Zyklen. Die Durchführung der PCR erfolgte bei folgenden Bedingungen:

1.	Initiale Denaturierung der DNA	94°C	3min	
2.	Denaturierung	94°C	1sek	 30 - 40 x
	Anlagerung der Primer	58°C	1sek	
	Elongation durch die Polymerase	72°C	1sek	
3.	Terminale Elongation	72°C	7min	

Als Ausgangsvolumen für eine PCR wurden 1µl (Input-Probe) -5µl (ChIP-Probe) der DNA verwendet. Die Primer wurden in einer finalen Konzentration von 300nM eingesetzt. Die PCR wurde unter Verwendung des REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma) in einem Volumen von 50µl durchgeführt.

Der Erfolg der Amplifizierung der DNA-Fragmente in der PCR wurde anschließend in einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tabelle 6: Verwendete Primer bei der ChIP-PCR

Primernamen	Sequenz
Insulinrezeptor E3 fwd	5´ -AGATCTGGCCATTGCACTCCA-3´
Insulinrezeptor E3 rev	5´ -ATACCTGCATGCCAGTTCTGGG-3´
Flip fwd	5´ -CTCACTGTGTGAGGCCGAGTCC-3´
Flip rev	5´ -GGGCCACAGAGCGAGACTCTG-3´

III. Ergebnisse

1. Knock down der HMGA1 Proteine in zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien

Erhöhte HMGA1-Proteinexpression wurden in vielen verschiedenen Krebsarten beobachtet und das duktales Pankreaskarzinom ist in dieser Hinsicht keine Ausnahme (1, 64, 93). Um herauszufinden, welche Rolle die HMGA1 Proteine im PDAC spielen, wurde mittels RNA-Interferenz HMGA1 spezifisch herunter reguliert. Mit Hilfe dieses Werkzeugs konnte die *HMGA1* mRNA Expression 72h nach der siRNA-Transfektion in zwei von einander unabhängigen Pankreaskarzinom-Zelllinien stark reduziert werden. Wie mit Hilfe von Real Time PCR ermittelt, ergab sich für die Zelllinie DanG eine Reduktion der mRNA Expression auf 3,3% und im Fall der MiaPaCa2-Zelllinie eine Reduktion auf 2,8%, während untransfizierte und kontrolltransfizierte Zellen unbeeinträchtigt blieben (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

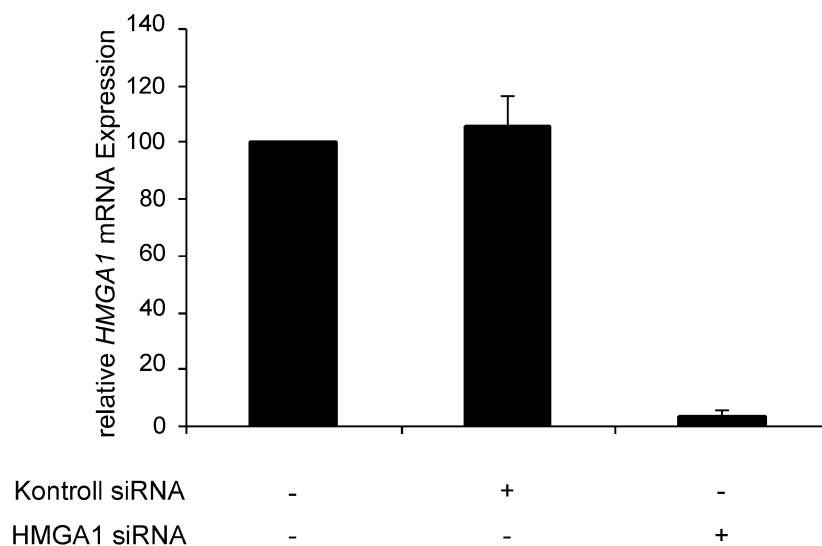


Abbildung 13: Knock down der *HMGA1* mRNA in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *HMGA1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

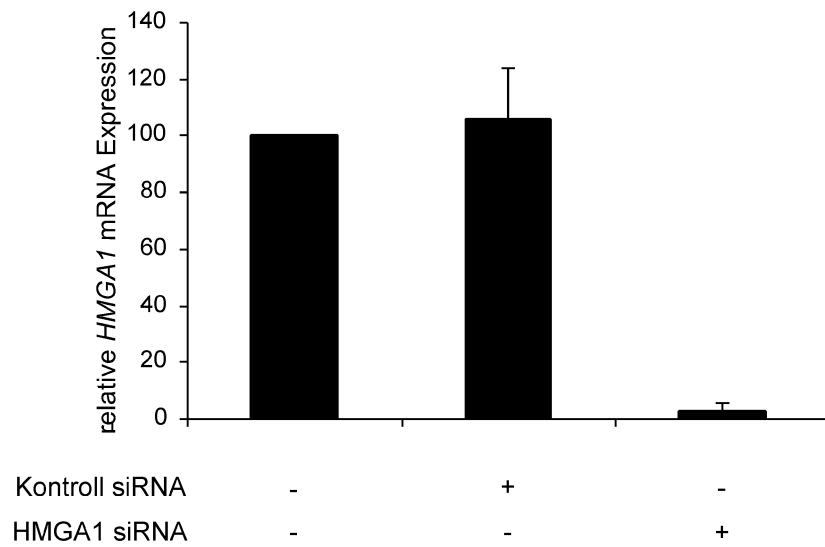


Abbildung 14: Knock down der *HMGA1* mRNA in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *HMGA1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

2. Biologische Effekte des HMGA1 Knock downs

Um die biologischen Effekte des Knock downs der HMGA1 Proteine zu untersuchen, wurden verschiedene biologische Versuche durchgeführt.

2.1. Proliferationsrate

HMGA1 Proteine sind dafür bekannt, eine kritische Rolle bei der Zellproliferation zu spielen (42). Um herauszufinden, ob der Knock down die Proliferationsrate von PDAC-Zelllinien beeinflusst, wurden die Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und für 72h in Kultur gehalten. Mit Hilfe von BrdU Inkorporation wurde die Proliferationsrate in den examinieren Zelllinien bestimmt. Im Fall der Zelllinie DanG ergab sich eine Verringerung der Proliferationsrate auf 45,5%, während es bei der Zelllinie MiaPaCa2 eine Reduktion auf 57,9% war. Untransfizierte und kontrolltransfizierte PDAC-Zellen zeigten keinerlei Reduktion in ihrem Proliferationsverhalten (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

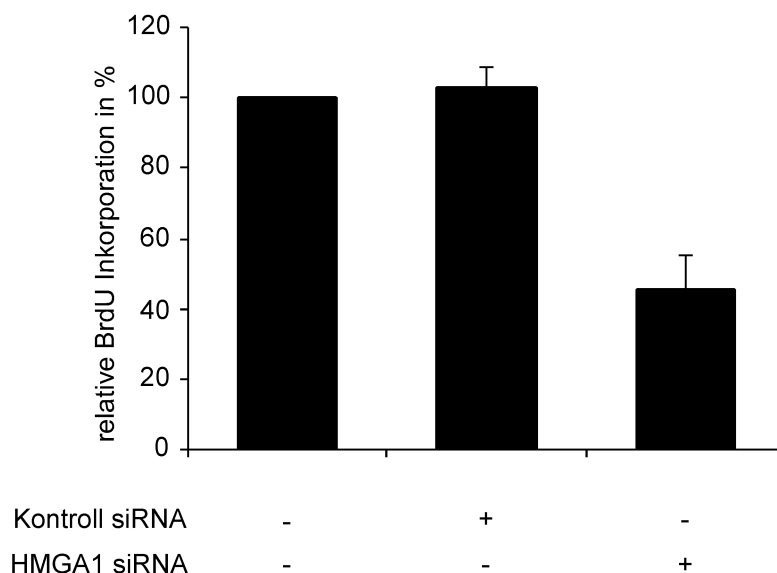


Abbildung 15: BrdU Inkorporation nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert. Die relative BrdU Inkorporation wurde 72h nach der Transfektion ermittelt.

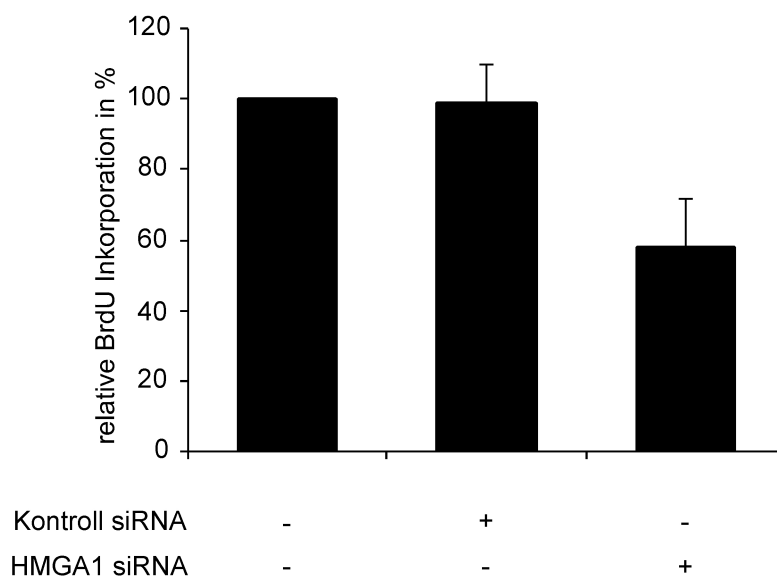


Abbildung 16: BrdU Inkorporation nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert. Die relative BrdU Inkorporation wurde 72h nach der Transfektion ermittelt.

2.2. Zellzahl

Trapasso et al. zeigten kürzlich, dass die Zellzahl von kultivierten Pankreaskarzinom-Zellen nach Transfektion mit einem Adenovirus, der ein HMGA1 Gen in Antisense-Orientierung trägt, rapide abnimmt (93). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, führt der Knock down der HMGA1 Proteine ebenfalls zu einer Abnahme der Zellzahl. Nach siRNA-Transfektion der PDAC-Zellen wurde über 72h lang alle 24h die Zellzahl der kultivierten Zellen ermittelt. Für die Zelllinie DanG ergab sich dabei nach 72h eine Reduktion der Zellzahl auf 31,2%, während sich die Zellzahl bei der Zelllinie MiaPaCa2 auf 36,8% verringerte. Im Gegensatz dazu war die Zellzahl bei untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen unbeeinträchtigt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

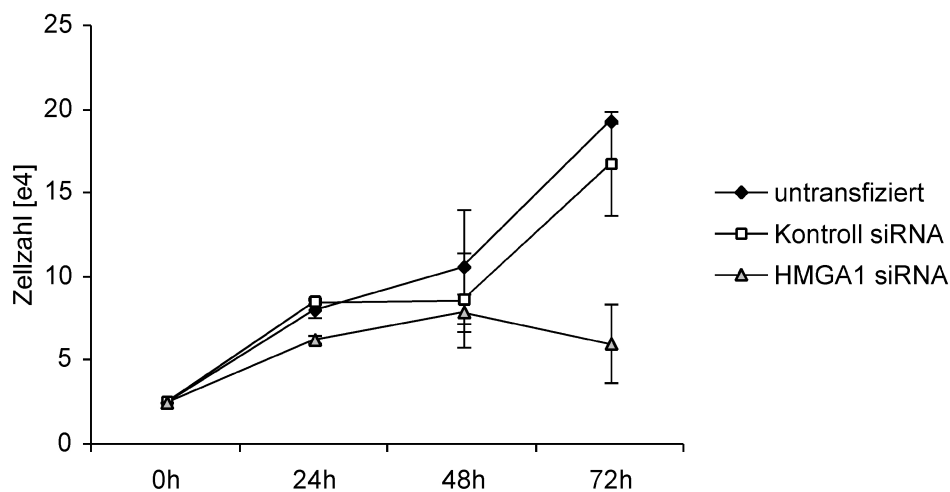


Abbildung 17: Wachstumskurve nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert. Die Zellzahl wurde 72h lang alle 24h bestimmt.

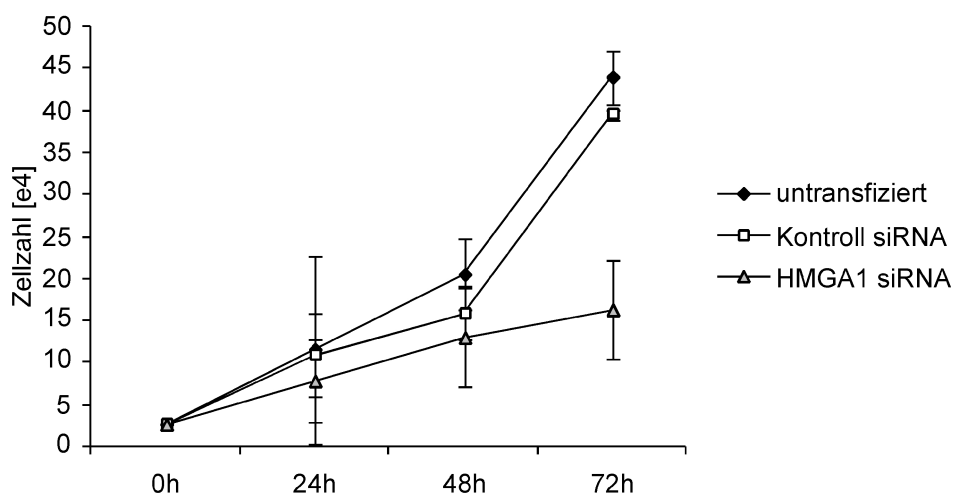


Abbildung 18: Wachstumskurve nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert. Die Zellzahl wurde 72h lang alle 24h bestimmt.

2.3. Zellzyklus

Fedele et al. haben gezeigt, dass die Überexpression der HMGA1 Proteine eine Zellzyklus-Deregulation in Rattenschilddrüsenzellen induziert (26). Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung auch für den Knock down der HMGA1 Proteine gilt, wurde der Zellzyklus von transfizierten Zellen untersucht. Dafür wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und mit Propidium-Iodid gefärbt. Die aktuelle Zellzyklusphase wurde in Flow Cytometry Analysen (FACS) bestimmt. Dabei ergab sich für die Zelllinie DanG ein moderater G1-Phasen- und ein leichter G2-Phasen-Arrest, während es in der MiaPaCa2-Zelllinie zu einem deutlichen G1-Phasen-Arrest kam. Untransfizierte und kontrolltransfizierte Zellen zeigten im Gegensatz dazu einen normalen Zellzyklusverlauf (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20).

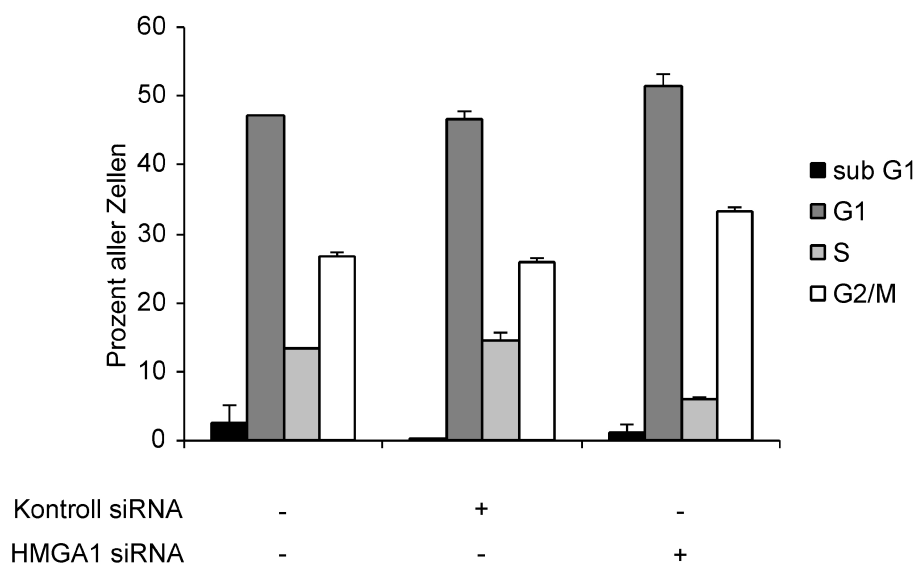


Abbildung 19: PI-Färbung nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und mit Propidium-Iodid gefärbt. Mit Hilfe von Flow Cytometry Analysen wurden die Zellen gemäss ihrem Chromatingehalts sortiert und somit die Zellzyklusphasen bestimmt.

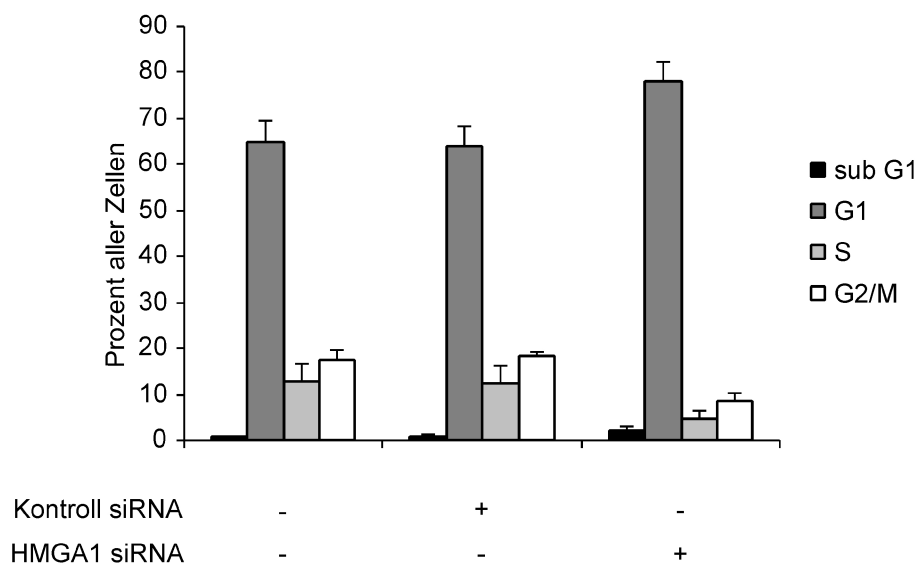


Abbildung 20: PI-Färbung nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und mit Propidium-Iodid gefärbt. Mit Hilfe von Flow Cytometry Analysen wurden die Zellen gemäss ihrem Chromatingehalts sortiert und somit die Zellzyklusphasen bestimmt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Knock down der HMGA1 Proteine zu einer reduzierten Proliferationsrate, einer signifikanten Abnahme der Zellzahl und einem G1-Phasen-Arrest in den examinierten PDAC-Zelllinien führt. Zusätzlich lässt sich in der Zelllinie DanG noch ein leichter Anstieg in der G2-Phasen-Fraktion beobachten.

3. Der Knock down der HMGA1 Proteine beeinflusst die Zellzyklus-Regulatoren

3.1. Cyclin D1, Cyclin A und das Retinoblastoma Protein (pRB)

Cycline sind eine der Hauptkomponenten der Zellzyklusregulation. Gemeinsam mit ihren korrespondierenden Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) kontrollieren sie die Zellzyklus abhängige Phosphorylierung vieler Substrate. Die D Cycline und ihre Partner CDKs 4 und 6 sind in die Regulation der G1-Phase involviert, während A Cycline und ihr katalytischer Partner CDK2 den Transit in die S-Phase kontrollieren (85, 86). Um herauszufinden, wie der Knock down der HMGA1 Proteine die molekularen Player der G1-Phase beeinflusst, wurde die Proteinmenge von Cyclin D1 und Cyclin A bestimmt. Aus diesem Anlass wurden PDAC Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Proteinmenge von Cyclin D1 und Cyclin A in den beiden Pankreaskarzinom Zelllinien DanG und MiaPaCa2 signifikant abnimmt. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinmenge in untransfizierten und kontrolltransfizierten PDAC Zellen konstant.

Die Reduzierung der Cyclin D1-Proteinexpression sollte theoretisch in einer Hypophosphorylierung von pRB resultieren. Um diese Veränderung im Phosphorylierungsniveau von pRB nachzuweisen, wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen zeigten Western Blot Analysen der transfizierten DanG- und MiaPaCa2-Zellen, dass pRB in seiner hypophosphorylierten Form erhalten bleibt, wohingegen untransfizierte und kontrolltransfizierte Zellen in die inaktive hyperphosphorylierte Form shifteten (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22).

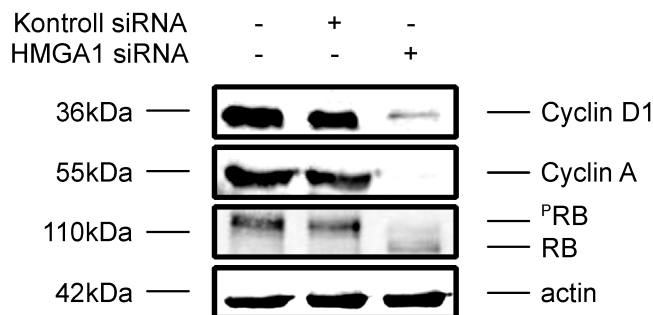


Abbildung 21: Zellzyklusregulatoren nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression von Cyclin D1, Cyclin A und der Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Proteins gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

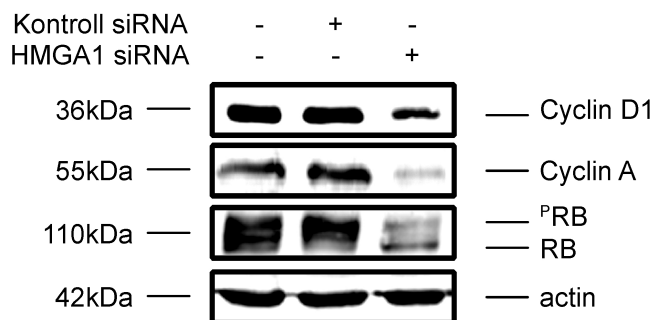


Abbildung 22: Zellzyklusregulatoren nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression von Cyclin D1, Cyclin A und der Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Proteins gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zusammengefasst zeigen diese Resultate, dass der Knock down der HMGA1 Proteine zu einer Reduktion des Proteingehalts von Cyclin D1 und A führt. Diese Reduktion geht mit einer Hypophosphorylierung des pRB einher, welche dieses in seiner inhibitorischen Form belässt und somit den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert.

4. HMGA1 reguliert indirekt die Translation von Cyclin D1

4.1. Transkription

Nachdem HMGA1 als architektonischer Transkriptionsfaktor dafür bekannt ist, an der Regulation der Transkription vieler Gene beteiligt zu sein, wurde als erstes das Level der *Cyclin D1* mRNA in den transfizierten Zellen untersucht. Aus diesem Grund wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre mRNA isoliert. Überraschenderweise hat sich bei Real Time PCR Versuchen gezeigt, dass das *Cyclin D1* mRNA-Level in der MiaPaCa2-Zelllinie von dem HMGA1 Knock down nicht beeinträchtigt

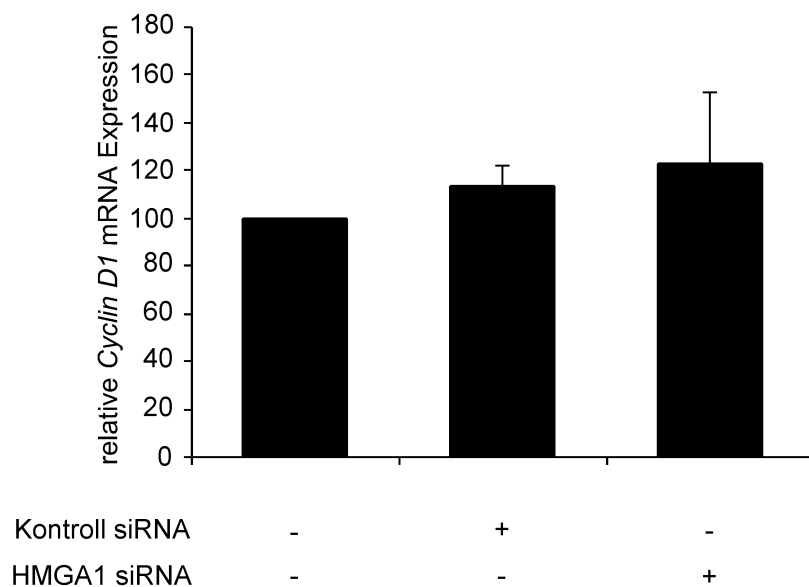


Abbildung 23: *Cyclin D1* mRNA nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *Cyclin D1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

wird. Zudem ergab sich für die Zelllinie DanG sogar ein leichter Anstieg in der gemessenen mRNA-Menge im Vergleich zu untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

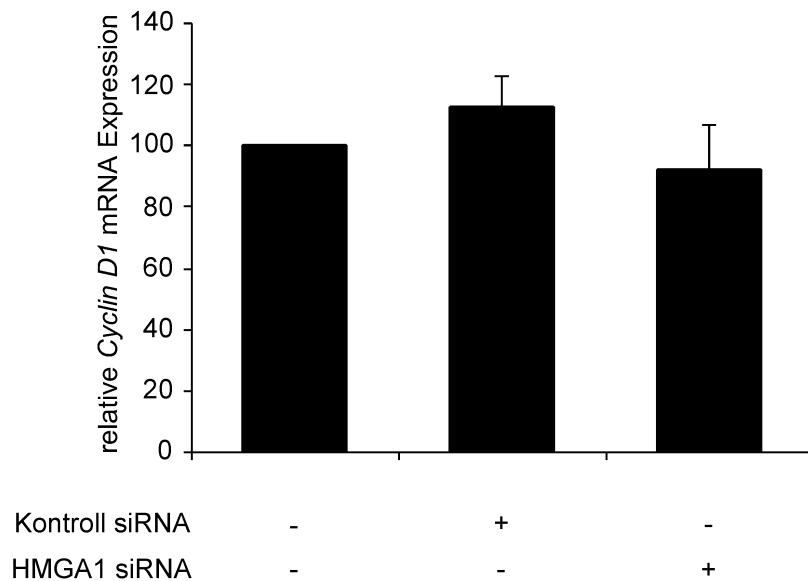


Abbildung 24: Cyclin D1 mRNA nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *Cyclin D1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

4.2. Degradierung

Um festzustellen, ob die Abnahme in der Cyclin D1-Proteinmenge durch eine erhöhte Degradierung hervorgerufen wird, wurde die proteasomale Aktivität mit Hilfe des Proteasomeninhibitors MG132 unterbunden. Zu diesem Zweck wurden PDAC-Zellen mit der HMGA-spezifischen siRNA transfiziert, nach 60h für weitere 12h mit 10 μ mol des Proteasomeninhibitors MG132 inkubiert und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. Anschließende Western Blot Analysen zeigten für die beiden verwendeten Zelllinien DanG und MiaPaCa2, dass der Proteasomeninhibitor MG132 nicht in der Lage war, den in untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen beobachteten Cyclin D1-Proteingehalt wieder herzustellen (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

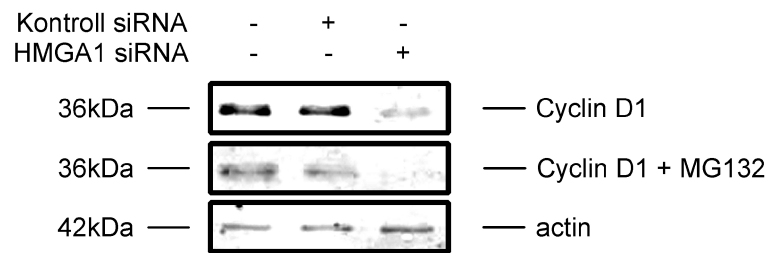


Abbildung 25: Cyclin D1-Degradierung nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression von Cyclin D1 mit und ohne Proteasomeninhibitor MG132 gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

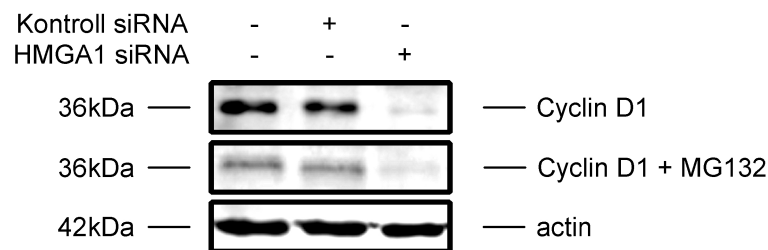


Abbildung 26: Cyclin D1-Degradierung nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression von Cyclin D1 mit und ohne Proteasomeninhibitor MG132 gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

4.3. Translation

Um herauszufinden, ob die Reduktion des Cyclin D1-Proteingehalts auf einer translationellen Regulation beruht, wurde der Phosphorylierungszustand von 4E-BP1 analysiert. Dafür wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. Western Blot Analysen ergaben für beide Zelllinien, dass 4E-BP1 nach dem Knock down der HMGA1 Proteine in seiner hypophosphorylierten Form verweilt, eIF4E inhibiert und somit konsequenterweise die Translation von Cyclin D1 verhindert. Dahingegen war in untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen ein Shift von der hypophosphorylierten zur hyperphosphorylierten Form zu beobachten (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

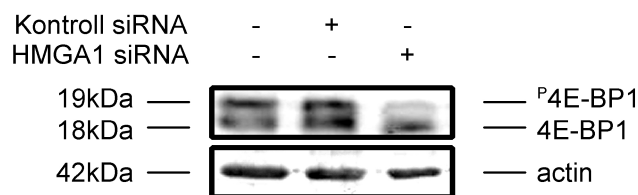


Abbildung 27: 4E-BP1 nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde der Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 bestimmt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Knock down der HMGA1 Proteine in einer beeinträchtigten Phosphorylierung von 4E-BP1 resultiert und somit die Translation der *Cyclin D1* mRNA hemmt. Des Weiteren bleiben die Transkription des *Cyclin D1* Gens und die Degradierung des Cyclin D1 Proteins von dem Knock down unberührt.

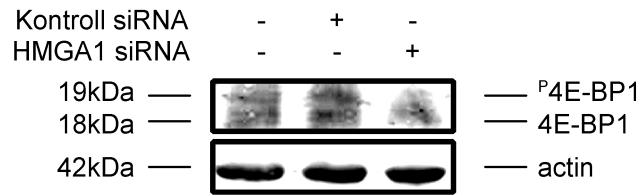


Abbildung 28: 4E-BP1 nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde der Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 bestimmt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

5. Die Expression des Insulinrezeptors ist in HMGA1-transfizierten Zellen reduziert

5.1. Insulinrezeptor mRNA Expression

Um zu beurteilen, ob der Insulinrezeptor auch in Pankreaskarzinom-Zellen von den HMGA1 Proteinen kontrolliert wird, wurde die *INSR* mRNA Expression nach siRNA-Transfektion untersucht. Zu diesem Zweck wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und die mRNA isoliert. Real Time PCR-Analysen ergaben für die Zelllinie DanG eine Reduktion in der *INSR* mRNA Expression auf 25,8%, während das *INSR* mRNA-Level bei der MiaPaCa2-Zelllinie auf 41,3% sank. Im Gegensatz dazu war das *INSR* mRNA-Niveau bei untransfizierten und kontrolltransfizierten PDAC Zellen unbeeinträchtigt (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30).

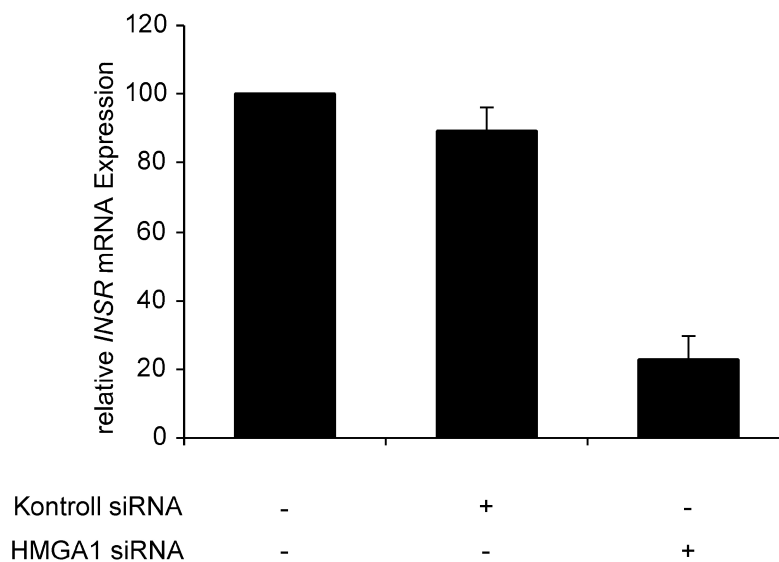


Abbildung 29: *INSR* mRNA nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *INSR* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

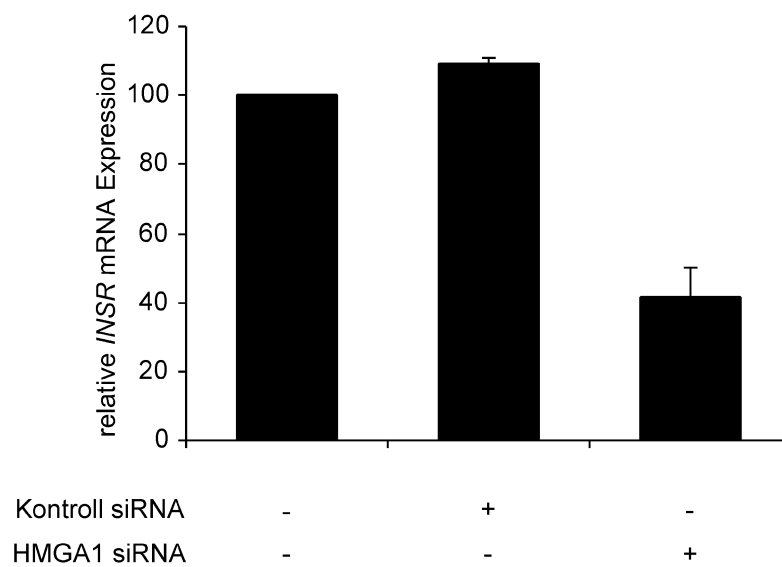


Abbildung 30: *INSR* mRNA nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *INSR* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

5.2. Insulinrezeptor Proteinexpression

Zusätzlich zur mRNA Expression wurde auch der INSR-Proteingehalt in den transfizierten Zellen untersucht. Aus diesem Anlass wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. Im Vergleich mit untransfizierten bzw. kontrolltransfizierten PDAC-Zellen zeigten Western Blot Analysen eine deutliche Abnahme des INSR-Proteingehalts in den beiden examinierten PDAC-Zelllinien (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

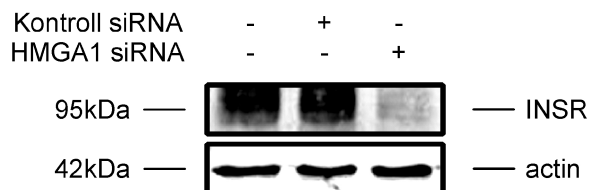


Abbildung 31: INSR-Proteinexpression nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression des Insulinrezeptors gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

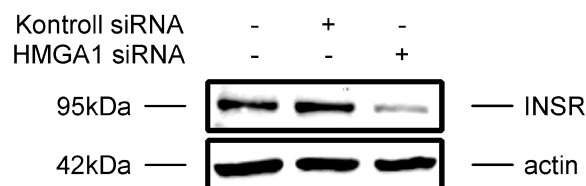


Abbildung 32: INSR-Proteinexpression nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression des Insulinrezeptors gezeigt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

5.3. Chromatin Immunopräzipitation

Um die Theorie, dass HMGA1 Proteine die Expression des *INSR* Gens kontrollieren, weiter zu untermauern wurden Chromatin Immunopräzipitations (ChIP) Experimente mit dem *INSR* Promotor gemacht. Dafür wurden PDAC-Zellen mit der HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihr Chromatin für die ChIP aufbereitet. ChIP-PCR-Analysen mit Primern gegen die E3-Promotorregion ergaben dabei für die beiden transfizierten Zelllinien,

dass die Bindung von HMGA1 an die Promotorsequenz im Vergleich mit kontrolltransfizierten PDAC-Zellen signifikant reduziert war. Parallel zur Reduzierung der HMGA1 Bindung, nahm auch die Bindung von C/EBP β an die Promotorregion des *INSR* Gens ab. Dies lässt vermuten, dass HMGA1 für die Rekrutierung von C/EBP β an den *INSR* Promotor benötigt wird (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34).

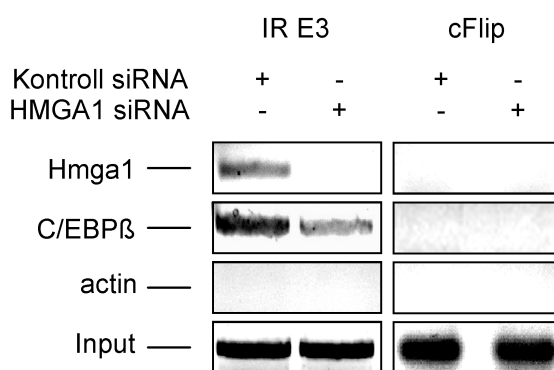


Abbildung 33: ChIP nach HMGA1 Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von ChIP-Experimenten wurde die Bindung von HMGA1 und C/EBP β an die E3-Promotorregion des Insulinrezeptors gezeigt. Die Actin-Antikörper-Kontrollen zeigten Antikörperspezifität, während die cFlip-Primer-Kontrollen die Spezifität der ChIP PCR demonstrierten. Der Input wurde als Ladekontrolle verwendet.

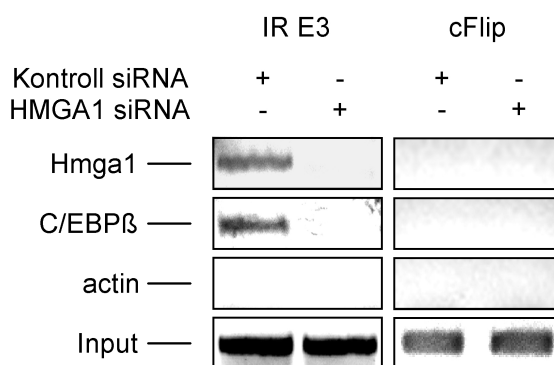


Abbildung 34: ChIP nach HMGA1 Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer HMGA1-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von ChIP-Experimenten wurde die Bindung von HMGA1 und C/EBP β an die E3-Promotorregion des Insulinrezeptors gezeigt. Die Actin-Antikörper-Kontrollen zeigten Antikörperspezifität, während die cFlip-Primer-Kontrollen die Spezifität der ChIP PCR demonstrierten. Der Input wurde als Ladekontrolle verwendet.

Somit werden HMGA1 Proteine auch im Pankreaskarzinom für eine akkurate Transkription des *INSR* mRNA benötigt. Des Weiteren waren nach Transfektion mit der HMGA1-spezifischen siRNA weder HMGA1 noch C/EBP β in der Lage an die E3-Promotorregion des *INSR* Gens zu binden, was vermuten lässt, dass HMGA1 ein notwendiger Faktor für die Rekrutierung von C/EBP β an den *INSR* Promotor sein könnte.

6. Der INSR Knock down zeigt den gleichen Phänotyp wie der HMGA1 Knock down

Um herauszufinden, ob die, durch den HMGA1 Knock down vermittelte Reduktion des INSR-Proteingehalts für die Abnahme der Cyclin D1-Proteinmenge verantwortlich ist, wurde mittels RNA-Interferenz INSR spezifisch herunter reguliert.

6.1. Insulinrezeptor mRNA Expression

Mit Hilfe dieses Werkzeugs konnte die *INSR* mRNA Expression 72h nach der siRNA-Transfektion in zwei von einander unabhängigen Pankreaskarzinom-Zelllinien stark reduziert werden. Wie mit Hilfe von Real Time PCR ermittelt, ergab sich für die Zelllinie DanG eine Reduktion der mRNA Expression auf 9,4% und im Fall der MiaPaCa2-Zelllinie eine Reduktion auf 33%, während untransfizierte und kontrolltransfizierte Zellen unbeeinträchtigt blieben (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36).

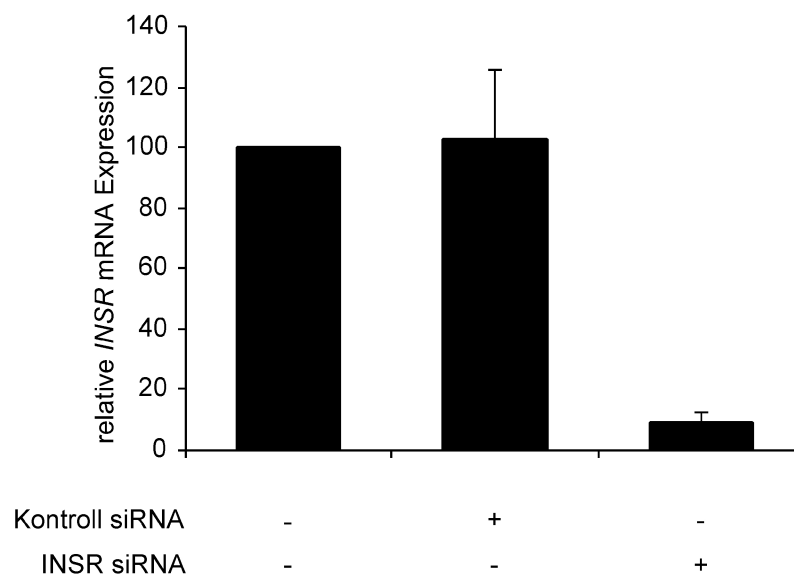


Abbildung 35: Knock down der *INSR* mRNA in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *INSR* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

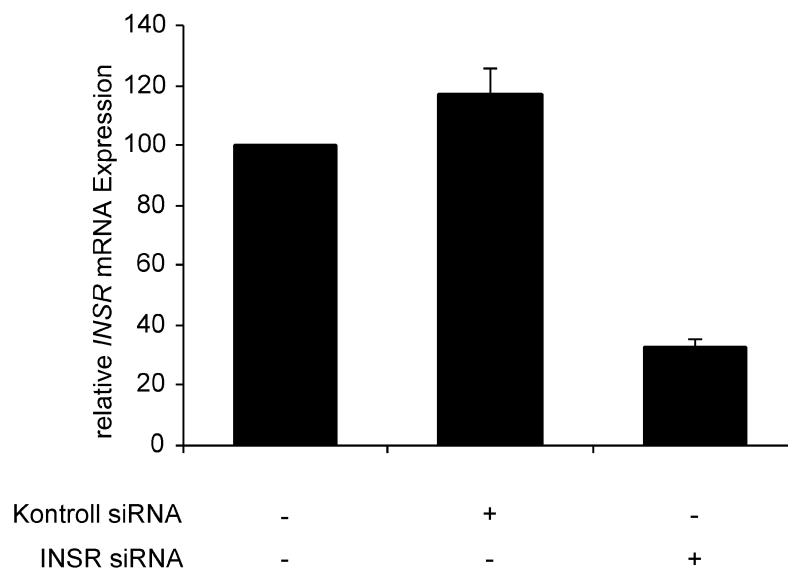


Abbildung 36: Knock down der *INSR* mRNA in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *INSR* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

6.2. Insulinrezeptor Proteinexpression

In einem weiteren Experiment wurde der INSR-Proteingehalt von transfizierten Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden PDAC-Zellen mit der INSR-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. In Übereinstimmung mit der beobachteten mRNA-Abnahme, zeigte sich in Western Blot Analysen für beide untersuchten Zelllinien eine deutliche Reduktion der Proteinmenge im Vergleich zu untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

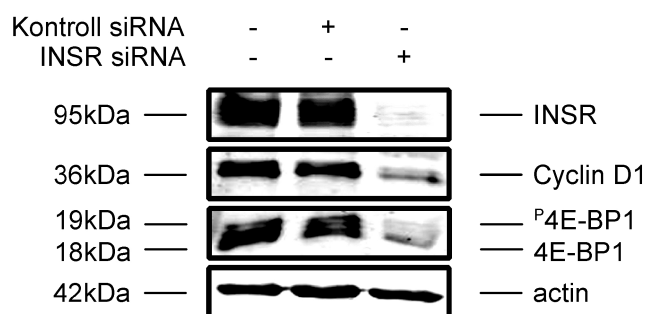


Abbildung 37: Proteinexpression nach INSR Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression des Insulinrezeptors, die von Cyclin D1 und der Phosphorylierungsstatus 4E-BP1 bestimmt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

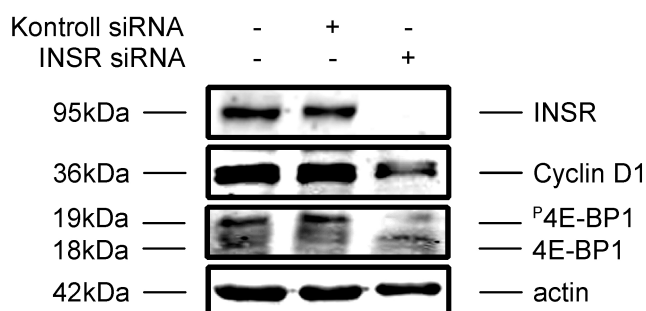


Abbildung 38: Proteinexpression nach INSR Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die Expression des Insulinrezeptors, die von Cyclin D1 und der Phosphorylierungsstatus 4E-BP1 bestimmt. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

6.3. Proliferationsrate

Nachdem der HMGA1 Knock down zu einer Beeinträchtigung der Proliferationsrate geführt hat, wurde in einem weiteren Versuch die Proliferationsrate von INSR siRNA-transfizierten Zellen ermittelt. Aus diesem Anlass wurden PDAC-Zellen mit der INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h mit BrdU gefärbt. Anhand der BrdU Inkorporation konnte gezeigt werden, dass für die Zelllinie DanG die Proliferationsrate auf 59,1% reduziert wurde, während bei der MiaPaCa2-Zelllinie die Proliferationsrate auf 52,9% sank. Untransfizierte und kontrolltransfizierte Zellen verhielten sich hingegen normal (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40).

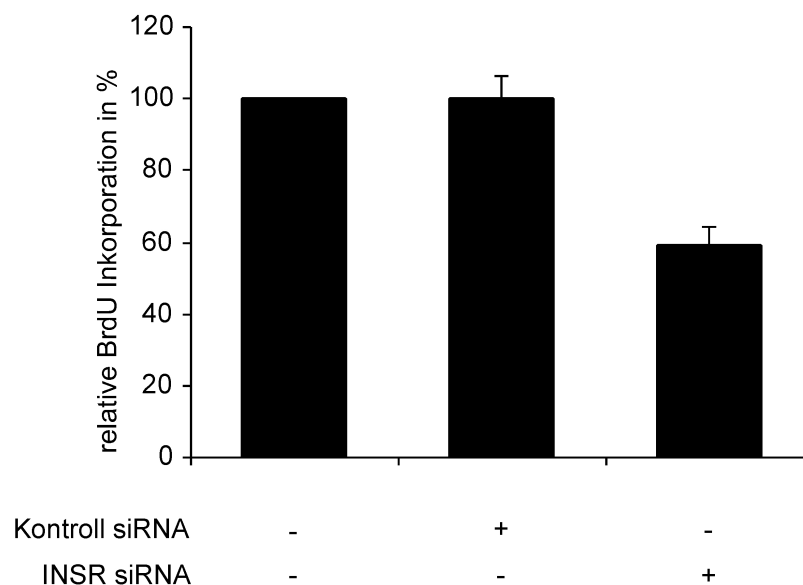


Abbildung 39: BrdU Inkorporation nach INSR Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert. Die relative BrdU Inkorporation wurde 72h nach der Transfektion ermittelt.

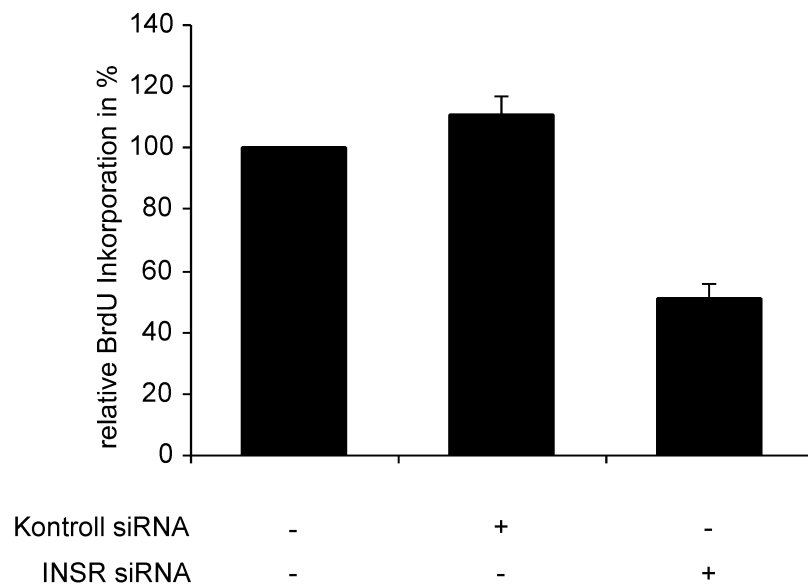


Abbildung 40: BrdU Inkorporation nach INSR Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert. Die relative BrdU Inkorporation wurde 72h nach der Transfektion ermittelt.

6.4. *Cyclin D1* mRNA Expression

Da der Knock down der HMGA1 Proteine die mRNA-Transkription des *Cyclin D1* Gens kaum beeinflusst, wurde getestet, ob dieses Ergebnis für den INSR Knock down ebenfalls gilt. Aus diesem Grund wurden PDAC-Zellen mit der INSR-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre mRNA isoliert. In der Tat zeigte sich bei Real Time PCR-Versuchen, dass das Expressionslevel der *Cyclin D1* mRNA nahezu unbeeinflusst von dem INSR Knock down war. Die mRNA-Transkription war in der Zelllinie DanG sogar auf 123,5% gegenüber untransfizierten PDAC-Zellen gesteigert (siehe Abbildung 41 und Abbildung 42).

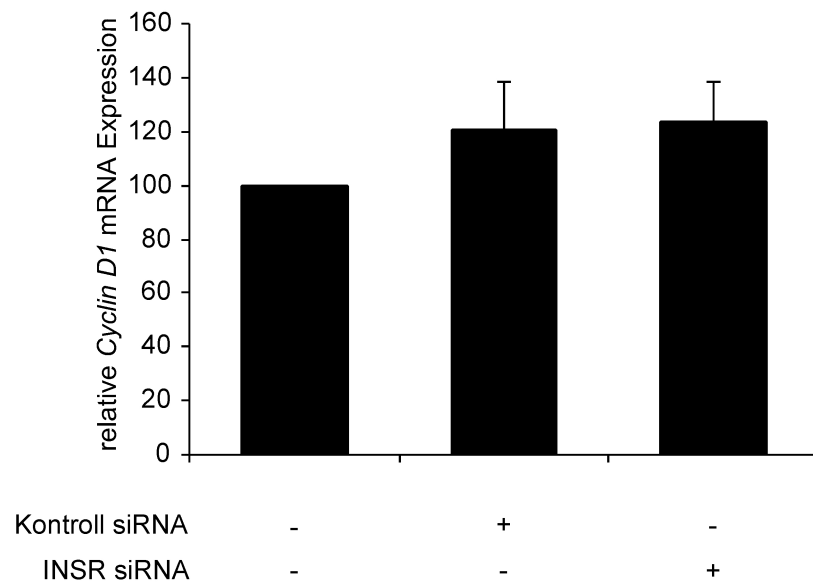


Abbildung 41: Cyclin D1 mRNA nach INSR Knock down in DanG-Zellen

DanG-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *Cyclin D1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

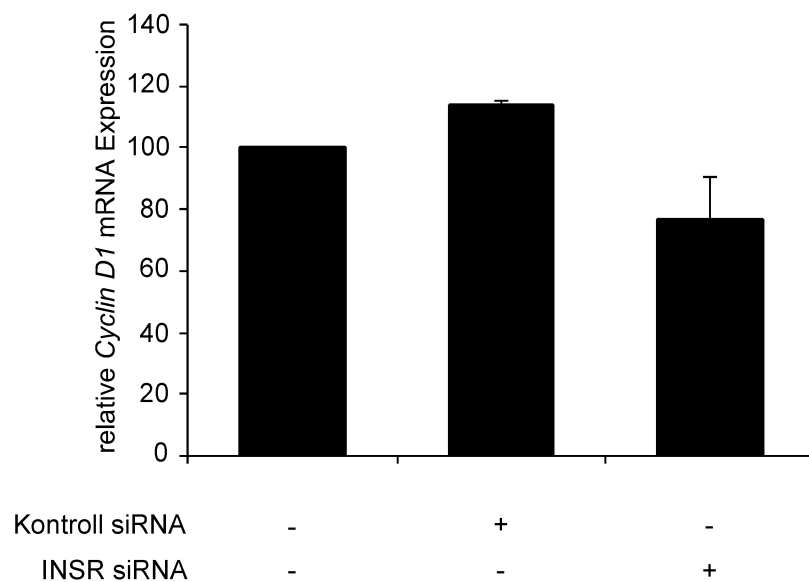


Abbildung 42: Cyclin D1 mRNA nach INSR Knock down in MiaPaCa2-Zellen

MiaPaCa2-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA und einer INSR-spezifischen siRNA transfiziert und nach 72h geerntet. Die relative *Cyclin D1* mRNA Expression wurde mit Hilfe von Real Time PCR bestimmt.

6.5. Cyclin D1-Proteinexpression

Im Gegensatz dazu beeinflusste der INSR Knock down deutlich die Cyclin D1-Proteinexpression. In den beiden untersuchten PDAC-Zelllinien war der Proteingehalt von Cyclin D1 72h nach der Transfektion mit der INSR-spezifischen siRNA eindeutig reduziert. Untransfizierte und kontrolltransfizierte PDAC-Zellen hingegen wiesen eine unveränderte Cyclin D1-Proteinexpression auf (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

6.6. Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1

In Kapitel 4.3. wurde gezeigt, dass 4E-BP1 in seiner hypophosphorylierten Form nach siRNA Transfektion gegen HMGA1 verweilt. Konsequenterweise wurde untersucht, ob der INSR Knock down ebenfalls Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 hat. Zu diesem Zweck wurden PDAC-Zellen mit der INSR-spezifischen siRNA transfiziert, nach 72h geerntet und ihre Proteine in einem Ganzzellaufschluss extrahiert. In Übereinstimmung mit den im Vorfeld beobachteten Ergebnissen beim HMGA1 Knock down inhibierte der INSR Knock down die Phosphorylierung von 4E-BP1 in den beiden verwendeten PDAC-Zelllinien. Demnach verweilt 4E-BP1 in seiner hypophosphorylierten Form und verhindert die Cyclin D1-Translation. Im Gegensatz dazu war bei untransfizierten und kontrolltransfizierten Zellen ein Shift zur hyperphosphorylierten Form von 4E-BP1 zu beobachten (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass der INSR Knock down zu einer reduzierten Proliferationsrate, einer nahezu konstanten *Cyclin D1* mRNA Expression, einer deutlichen Reduktion des Cyclin D1-Proteingehalts und einer Hypophosphorylierung von 4E-BP1 führt.

IV. Diskussion

HMGA1 Proteine sind in die transkriptionelle Regulation verschiedener, für die Karzinogenese wichtiger Gene involviert. Interessanterweise agieren sie dabei nicht als Transkriptionsfaktoren, sondern sind in der Lage, allosterische Veränderungen in den regulierten Promotorregionen zu induzieren. In diesem Zusammenhang vereinfachen sie die Aneinanderlagerung und die Bindung korrespondierender Transkriptionsfaktoren zu einem Multiproteinkomplex, dem Enhanceosome. Unter Verwendung ihrer drei unabhängig voneinander funktionierenden basischen AT-Hook-Motiven, können sie sowohl Protein-Protein- als Protein-DNA-Interaktionen stabilisieren (91). Die Überexpression der HMGA1 Proteine wurde zu einem diagnostischen Marker für neoplastische Transformationen und gesteigertes metastatisches Potential (66, 83). Abe et al. und Trapasso et al. haben gezeigt, dass HMGA1 Proteine auch im duktalem Pankreaskarzinom überexprimiert werden (1, 93). Obwohl Trapasso et al. beschrieben haben, dass die Behandlung des duktalem Pankreaskarzinoms mit HMGA1-spezifischen antisense Phosphorothioat Oligonukleotiden (ODN) die Proliferation reduziert, ist der exakte molekulare Mechanismus, über den HMGA1 Proteine die Proliferation von duktalem Pankreaskarzinomzellen kontrollieren, unbekannt (93). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der siRNA-vermittelte Knock down der HMGA1 Proteine zu einer, durch einen G1-Phasen-Arrest hervorgerufenen, signifikanten Reduktion der Zellproliferation von duktalem Pankreaskarzinomzellen führt. Des Weiteren wird demonstriert, dass HMGA1 indirekt die Translation von Cyclin D1 durch Regulation der Transkription des Insulinrezeptor-Gens kontrolliert.

Der Fortschritt durch die G1-Phase des Zellzyklus wird von verschiedenen Proteinen, darunter die Cycline, die Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), die CDK-Inhibitoren und die „Pocket Proteine“ vermittelt (85, 86). Für Cyclin D1 wurde gezeigt, dass es im Pankreaskarzinom häufig überexprimiert wird und diese Überexpression ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (16, 20, 32, 38). Microarray-Analysen von HMGA1-überexprimierenden humanen Brustepithelzellen haben ergeben, dass diese Überexpression einen 3,1-fachen Anstieg des *Cyclin D1* mRNA-Levels zur Folge hat, was eine transkriptionelle Regulation des *Cyclin D1* Gens vermuten lässt (66). Obwohl es im *Cyclin D1* Promotor eine HMGA1 Bindestelle gibt, die von HMGA1 Proteinen in EMSA-Experimenten mit hoher Affinität gebunden wird, war keine nennenswerte Erniedrigung im *Cyclin D1* mRNA-Level nach dem HMGA1 Knock down zu beobachten. Dies deutet daraufhin, dass HMGA1 in dem verwendeten Modellsystem kei-

nen Einfluss auf die Cyclin D1-Transkription hat. Zusätzlich zur Transkriptionellen Regulation, wird der Cyclin D1-Umsatz noch durch Ubiquitinierung und konsequente Degradierung durch das 26S-Proteasom geregelt (50, 57, 58, 63). Da der Knock down der HMGA1 Proteine den Cyclin D1-Proteingehalt in beiden Zelllinien auch trotz Verwendung des Proteasomeninhibitors MG132 weiterhin reduziert, scheinen die HMGA1 Proteine nicht am proteasomalen Cyclin D1-Umsatz beteiligt zu sein.

Die translationellen Kontrolle der meisten eukaryotischen mRNAs erfolgt in einer Cap-Struktur abhängigen Weise (37, 74). Die Bildung des eukaryotischen Initiationsfaktor 4F (eIF4F) Komplexes wird von der Verfügbarkeit des Cap-Struktur bindenden eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) limitiert (51, 73). Die Translation der *Cyclin D1* mRNA wird ebenfalls von eIF4E vermittelt (74, 75). Die Bindung von eIF4E-bindenden Proteinen (4E-BP1-3) an eIF4E verhindert die Cap-Struktur abhängige Translation (51). Diese Bindung wird durch eine PI3K/AKT/mTOR-abhängige inhibierende Phosphorylierung reguliert. Hypophosphorylierte 4E-BPs binden mit einer hohen Affinität an eIF4E, während hyperphosphorylierte 4E-BPs ihre Bindungsaffinität verlieren und eIF4E freisetzen (5, 37, 52, 76, 78). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der siRNA-vermittelte Knock down der HMGA1 Proteine zu einer reduzierten Phosphorylierung von 4E-BP1 führt. Dadurch wird eIF4E von 4E-BP1 gebunden und inaktiviert. Dies hat zur Folge, dass die Cap-Struktur abhängige Translation der *Cyclin D1* mRNA inhibiert wird.

In verschiedenen transformierten Zellen wurde gezeigt, dass der Insulinrezeptor eine proliferative Reaktion auslösen kann. Zudem wurde in epithelialen Tumoren, wie z. B. dem Brust-, Darm- und Eierstockkrebs eine Überexpression des Insulinrezeptors beobachtet (35, 53, 55, 87). Auch für das duktales Pankreaskarzinom wurde eine durch Insulin vermittelte gesteigerte Proliferationsrate nachgewiesen (27). Zusätzlich wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) in duktales Pankreaskarzinomzellen durch Insulin indirekt aktiviert (45). Interessanterweise wird das die PI3K-Aktivität auslösende Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS1) im duktales Pankreaskarzinom überexpressiert und trägt zum unkontrollierten Wachstum des Pankreaskarzinoms bei (4, 9). Während kürzlich gezeigt wurde, dass die regulatorische Untereinheit von PI3K auch im duktales Pankreaskarzinom von IRS1 gebunden wird, ist der für die Phosphorylierung von IRS1 verantwortliche Rezeptor noch unbekannt (4). In dieser Arbeit wurde für die beiden verwendeten Zelllinien gezeigt, dass der Insulinrezeptor in die Proliferationskontrolle des Pankreaskarzinoms involviert ist. Nachdem das IRS1 in den Versuchen von

Asano et al. nicht mit dem Insulin like Growth Factor 1 Rezeptor (IGF1R) immunopräzipitiert werden konnte (4), besteht die Möglichkeit, dass die PI3K-Aktivierung im duktalem Pankreaskarzinom durch den Insulinrezeptor induziert wird.

Es ist bekannt, dass Insulin die mRNA-Translation über die Phosphorylierung von 4E-BP1 (auch PHAS-I für phosphorylated heat and acid soluble protein stimulated by insulin) regulieren kann (46). Mehrere Studien konnten eine Involvierung der HMGA1 Proteine in die transkriptionelle Kontrolle des Insulinrezeptor-Gens nachweisen (11, 28, 29). Gemeinsam

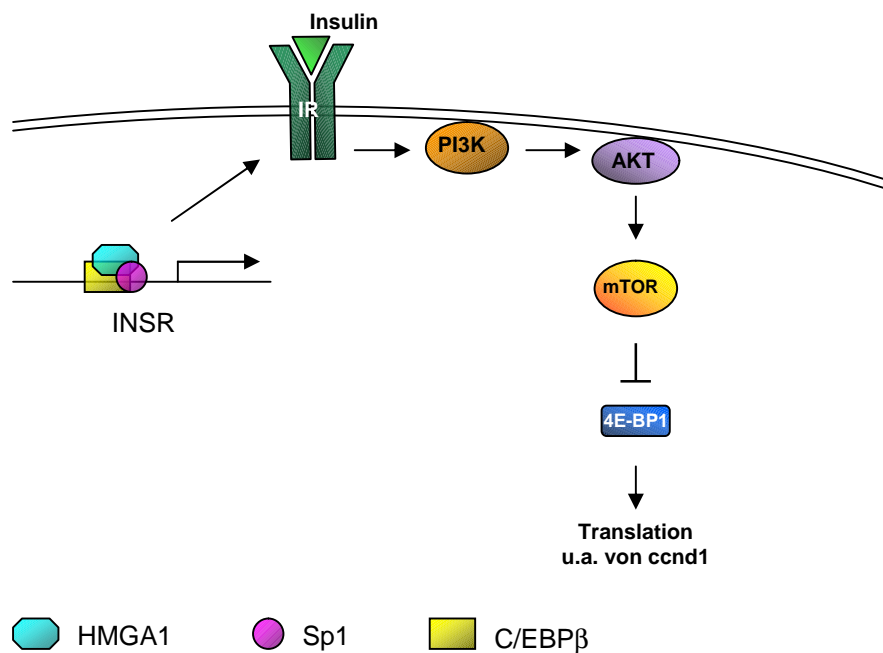


Abbildung 43: Modell der indirekten Cyclin D1-Regulation durch HMGA1

mit dem CCAAT-Enhancer bindenden Protein β (C/EBP β) bzw. dem Aktivator Protein 2 (AP2) und dem ubiquitär expremierten Transkriptionsfaktor Sp1 bildet HMGA1 einen Nukleoproteinkomplex aus. Dieser bindet im Fall von C/EBP β an zwei getrennte Promotorregionen (E3 und C2) des Insulinrezeptor-Gens in Leberzellen (29), und im Fall von AP2 an die C2-Promotorregion in Brustkrebszellen (62). Übereinstimmend mit diesen Resultaten wird in dieser Arbeit gezeigt, dass der siRNA-vermittelte Knock down der HMGA1-Proteinsynthese in einer deutlichen Reduktion des Insulinrezeptor mRNA-Levels als auch des Insulinrezeptor-Proteingehalts resultiert. Zudem konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitation erstmalig gezeigt werden, dass sowohl HMGA1 Proteine als auch C/EBP β an die E3-Promotorregion des Insulinrezeptors im duktalem Pankreaskarzinom binden. Da der

Knock down der HMGA1 Proteine die Bindung von C/EBP β an den Insulinrezeptor-Promotor beeinträchtigt, ist es wahrscheinlich, dass die HMGA1 Proteine an der Rekrutierung von C/EBP β an den Promotor des Insulinrezeptor-Gens beteiligt sind, und dadurch zur Transkription des Insulinrezeptor-Gens beitragen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die HMGA1 Proteine den Zellzyklusfortschritt von der G1- in die S-Phase in duktalem Pankreaskarzinomzellen auf eine indirekte Art und Weise unterstützen. Durch die Induzierung der Transkription des Insulinrezeptor-Gens kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade und einer Hemmung von 4E-BP1, was seinerseits in einer Erhöhung der Cyclin D1-Proteinexpression resultiert. Dies wiederum hat eine Inaktivierung des Retinoblastoma-Protein-abhängigen G1-Phasen-Checkpoints und eine unkontrollierte G1-Phasen-Progression zur Folge (siehe Abbildung 43).

In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl die Überexpression der HMGA1 Proteine als auch die von Cyclin D1 ein Hauptmerkmal des duktalem Pankreaskarzinoms sind, ist die Reduzierung der HMGA1 Proteine eine viel versprechende therapeutische Strategie.

V. Zusammenfassung

HMGA1 Proteine fungieren als architektonische Transkriptionsfaktoren und sind in die Regulation der Transkription, der Differenzierung und der neoplastischen Transformation involviert. Wie in fast allen Krebsarten, sind HMGA1 Proteine im duktalem Pankreas-Adenokarzinom überexprimiert. Obwohl gezeigt wurde, dass HMGA1 zur Proliferation von duktalem Pankreaskarzinomzellen beiträgt, sind die molekularen, von HMGA1 regulierten Mechanismen weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der Knock down von HMGA1 Proteinen mit einer HMGA1-spezifischen siRNA zu einer Reduktion der Proliferation aufgrund eines G1-Arrests in duktalem Pankreaskarzinomzellen führt. Auf molekularer Ebene wird die Translation von Cyclin D1 nach dem HMGA1 Knock down beeinträchtigt. Diese Arbeit belegt, dass der Inhibitor des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E (eIF4E) 4EB-P1 an der beobachteten Herunterregulierung von Cyclin D1 nach HMGA1 Knock down partizipiert. Des Weiteren liegt 4EB-P1 in der Signalkaskade unterhalb vom Insulin-Rezeptor (INSR) und HMGA1 reguliert die Transkription des INSR Gens in duktalem Pankreaskarzinom Zellen.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Abe,N., Watanabe,T., Masaki,T., Mori,T., Sugiyama,M., Uchimura,H., Fujioka,Y., Chiappetta,G., Fusco,A. and Atomi,Y. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins, *Cancer Res.*, *60*: 3117-3122, 2000.
- 2 Almoguera,C., Shibata,D., Forrester,K., Martin,J., Arnheim,N. and Perucho,M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes, *Cell*, *53*: 549-554, 1988.
- 3 Apple,S.K., Hecht,J.R., Lewin,D.N., Jahromi,S.A., Grody,W.W. and Nieberg,R.K. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis, *Hum.Pathol.*, *30*: 123-129, 1999.
- 4 Asano,T., Yao,Y., Shin,S., McCubrey,J., Abbruzzese,J.L. and Reddy,S.A. Insulin receptor substrate is a mediator of phosphoinositide 3-kinase activation in quiescent pancreatic cancer cells, *Cancer Res.*, *65*: 9164-9168, 2005.
- 5 Bader,A.G., Kang,S., Zhao,L. and Vogt,P.K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation, *Nat.Rev.Cancer*, *5*: 921-929, 2005.
- 6 Banks,G.C., Li,Y. and Reeves,R. Differential in vivo modifications of the HMGI(Y) nonhistone chromatin proteins modulate nucleosome and DNA interactions, *Biochemistry*, *39*: 8333-8346, 2000.
- 7 Barton,C.M., Staddon,S.L., Hughes,C.M., Hall,P.A., O'Sullivan,C., Kloppel,G., Theis,B., Russell,R.C., Neoptolemos,J., Williamson,R.C. and . Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer, *Br.J.Cancer*, *64*: 1076-1082, 1991.
- 8 Benzeno,S. and Diehl,J.A. C-terminal sequences direct cyclin D1-CRM1 binding, *J.Biol.Chem.*, *279*: 56061-56066, 2004.
- 9 Bergmann,U., Funatomi,H., Kornmann,M., Beger,H.G. and Korc,M. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *220*: 886-890, 1996.
- 10 Bonifer,C. Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation, *Gene*, *238*: 277-289, 1999.
- 11 Brunetti,A., Manfioletti,G., Chiefari,E., Goldfine,I.D. and Foti,D. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y), *FASEB J.*, *15*: 492-500, 2001.
- 12 Bustin,M. and Reeves,R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function, *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, *54*: 35-100, 1996.
- 13 Caldas,C. and Kern,S.E. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma, *Int.J.Pancreatol.*, *18*: 1-6, 1995.

- 14 Calle,C., Campion,J., Garcia-Arencibia,M., Maestro,B. and Davila,N. Transcriptional inhibition of the human insulin receptor gene by aldosterone, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 84: 543-553, 2003.
- 15 Chiappetta,G., Avantiaggiato,V., Visconti,R., Fedele,M., Battista,S., Trapasso,F., Merciai,B.M., Fidanza,V., Giancotti,V., Santoro,M., Simeone,A. and Fusco,A. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development, *Oncogene*, 13: 2439-2446, 1996.
- 16 Chung,D.C., Brown,S.B., Graeme-Cook,F., Seto,M., Warshaw,A.L., Jensen,R.T. and Arnold,A. Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors, *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 85: 4373-4378, 2000.
- 17 Cobrinik,D. Pocket proteins and cell cycle control, *Oncogene*, 24: 2796-2809, 2005.
- 18 D'Amico,M., Wu,K., Fu,M., Rao,M., Albanese,C., Russell,R.G., Lian,H., Bregman,D., White,M.A. and Pestell,R.G. The inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a/alternative reading frame (INK4a/ARF) locus encoded proteins p16INK4a and p19ARF repress cyclin D1 transcription through distinct cis elements, *Cancer Res.*, 64: 4122-4130, 2004.
- 19 Diana,F., Sgarra,R., Manfioletti,G., Rustighi,A., Poletto,D., Sciortino,M.T., Mastino,A. and Giancotti,V. A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group A1a protein in leukemic cells, *J.Biol.Chem.*, 276: 11354-11361, 2001.
- 20 Diehl,J.A. and Benzeno,S. Cyclin D1 and pancreatic carcinoma: a proliferative agonist and chemotherapeutic antagonist, *Clin.Cancer Res.*, 11: 5665-5667, 2005.
- 21 Diehl,J.A., Cheng,M., Roussel,M.F. and Sherr,C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization, *Genes Dev.*, 12: 3499-3511, 1998.
- 22 DiGiuseppe,J.A., Hruban,R.H., Goodman,S.N., Polak,M., van den Berg,F.M., Allison,D.C., Cameron,J.L. and Offerhaus,G.J. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas, *Am.J.Clin.Pathol.*, 101: 684-688, 1994.
- 23 DiGiuseppe,J.A., Hruban,R.H., Offerhaus,G.J., Clement,M.J., van den Berg,F.M., Cameron,J.L. and van Mansfeld,A.D. Detection of K-ras mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma, *Am.J.Pathol.*, 144: 889-895, 1994.
- 24 Disney,J.E., Johnson,K.R., Magnuson,N.S., Sylvester,S.R. and Reeves,R. High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes, *J.Cell Biol.*, 109: 1975-1982, 1989.
- 25 Falvo,J.V., Parekh,B.S., Lin,C.H., Fraenkel,E. and Maniatis,T. Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation, *Mol.Cell Biol.*, 20: 4814-4825, 2000.
- 26 Fedele,M., Pierantoni,G.M., Berlingieri,M.T., Battista,S., Baldassarre,G., Munshi,N., Dentice,M., Thanos,D., Santoro,M., Viglietto,G. and Fusco,A. Overexpression of proteins HMGA1 induces cell cycle deregulation and apoptosis in normal rat thyroid cells, *Cancer Res.*, 61: 4583-4590, 2001.

- 27 Fisher,W.E., Boros,L.G. and Schirmer,W.J. Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors, *J.Surg.Res.*, *63*: 310-313, 1996.
- 28 Foti,D., Chiefari,E., Fedele,M., Iuliano,R., Brunetti,L., Paonessa,F., Manfioletti,G., Barbetti,F., Brunetti,A., Croce,C.M., Fusco,A. and Brunetti,A. Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice, *Nat.Med.*, *11*: 765-773, 2005.
- 29 Foti,D., Iuliano,R., Chiefari,E. and Brunetti,A. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription, *Mol.Cell Biol.*, *23*: 2720-2732, 2003.
- 30 Friedmann,M., Holth,L.T., Zoghbi,H.Y. and Reeves,R. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene, *Nucleic Acids Res.*, *21*: 4259-4267, 1993.
- 31 Fu,M., Wang,C., Li,Z., Sakamaki,T. and Pestell,R.G. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions, *Endocrinology*, *145*: 5439-5447, 2004.
- 32 Gansauge,S., Gansauge,F., Ramadani,M., Stobbe,H., Rau,B., Harada,N. and Beger,H.G. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis, *Cancer Res.*, *57*: 1634-1637, 1997.
- 33 Giancotti,V., Bandiera,A., Buratti,E., Fusco,A., Marzari,R., Coles,B. and Goodwin,G.H. Comparison of multiple forms of the high mobility group I proteins in rodent and human cells. Identification of the human high mobility group I-C protein, *Eur.J.Biochem.*, *198*: 211-216, 1991.
- 34 Giancotti,V., Buratti,E., Perissin,L., Zorzet,S., Balmain,A., Portella,G., Fusco,A. and Goodwin,G.H. Analysis of the HMGI nuclear proteins in mouse neoplastic cells induced by different procedures, *Exp.Cell Res.*, *184*: 538-545, 1989.
- 35 Giorgino,F., Belfiore,A., Milazzo,G., Costantino,A., Maddux,B., Whittaker,J., Goldfine,I.D. and Vigneri,R. Overexpression of insulin receptors in fibroblast and ovary cells induces a ligand-mediated transformed phenotype, *Mol.Endocrinol.*, *5*: 452-459, 1991.
- 36 Goldfine,I.D., Maddux,B.A., Youngren,J.F., Frittitta,L., Trischitta,V. and Dohm,G.L. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance, *Mol.Cell Biochem.*, *182*: 177-184, 1998.
- 37 Grewe,M., Gansauge,F., Schmid,R.M., Adler,G. and Seufferlein,T. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells, *Cancer Res.*, *59*: 3581-3587, 1999.
- 38 Guo,S.S., Wu,X., Shimoide,A.T., Wong,J., Moatamed,F. and Sawicki,M.P. Frequent overexpression of cyclin D1 in sporadic pancreatic endocrine tumours, *J.Endocrinol.*, *179*: 73-79, 2003.
- 39 Hezel,A.F., Kimmelman,A.C., Stanger,B.Z., Bardeesy,N. and Depinho,R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes Dev.*, *20*: 1218-1249, 2006.

- 40 Hinz,M., Krappmann,D., Eichten,A., Heder,A., Scheidereit,C. and Strauss,M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition, *Mol.Cell Biol.*, 19: 2690-2698, 1999.
- 41 Hruban,R.H., Goggins,M., Parsons,J. and Kern,S.E. Progression model for pancreatic cancer, *Clin.Cancer Res.*, 6: 2969-2972, 2000.
- 42 Johnson,K.R., Disney,J.E., Wyatt,C.R. and Reeves,R. Expression of mRNAs encoding mammalian chromosomal proteins HMG-I and HMG-Y during cellular proliferation, *Exp.Cell Res.*, 187: 69-76, 1990.
- 43 Johnson,K.R., Lehn,D.A. and Reeves,R. Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y, *Mol.Cell Biol.*, 9: 2114-2123, 1989.
- 44 Kobayashi,S., Shirasawa,H., Sashiyama,H., Kawahira,H., Kaneko,K., Asano,T. and Ochiai,T. P16INK4a expression adenovirus vector to suppress pancreas cancer cell proliferation, *Clin.Cancer Res.*, 5: 4182-4185, 1999.
- 45 Kornmann,M., Maruyama,H., Bergmann,U., Tangvoranuntakul,P., Beger,H.G., White,M.F. and Korc,M. Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer, *Cancer Res.*, 58: 4250-4254, 1998.
- 46 Lawrence,J.C., Jr. and Abraham,R.T. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation, *Trends Biochem.Sci.*, 22: 345-349, 1997.
- 47 Li,D., Xie,K., Wolff,R. and Abbruzzese,J.L. Pancreatic cancer, *Lancet*, 363: 1049-1057, 2004.
- 48 Lowe,S.W., Cepero,E. and Evan,G. Intrinsic tumour suppression, *Nature*, 432: 307-315, 2004.
- 49 Lowe,S.W. and Sherr,C.J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 13: 77-83, 2003.
- 50 Maeda,I., Ohta,T., Koizumi,H. and Fukuda,M. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL1 and ROC1-CUL3, *FEBS Lett.*, 494: 181-185, 2001.
- 51 Mamane,Y., Petroulakis,E., Rong,L., Yoshida,K., Ler,L.W. and Sonenberg,N. eIF4E--from translation to transformation, *Oncogene*, 23: 3172-3179, 2004.
- 52 Martin,D.E. and Hall,M.N. The expanding TOR signaling network, *Curr.Opin.Cell Biol.*, 17: 158-166, 2005.
- 53 Massague,J., Blinderman,L.A. and Czech,M.P. The high affinity insulin receptor mediates growth stimulation in rat hepatoma cells, *J.Biol.Chem.*, 257: 13958-13963, 1982.
- 54 Merika,M. and Thanos,D. Enhanceosomes, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 11: 205-208, 2001.
- 55 Milazzo,G., Giorgino,F., Damante,G., Sung,C., Stampfer,M.R., Vigneri,R., Goldfine,I.D. and Belfiore,A. Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines, *Cancer Res.*, 52: 3924-3930, 1992.

- 56 Nakamaru,K., Matsumoto,K., Taguchi,T., Suefuji,M., Murata,Y., Igata,M., Kawashima,J., Kondo,T., Motoshima,H., Tsuruzoe,K., Miyamura,N., Toyonaga,T. and Araki,E. AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase, down-regulates the insulin receptor expression in HepG2 cells, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 328: 449-454, 2005.
- 57 Nakayama,K.I., Hatakeyama,S. and Nakayama,K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 282: 853-860, 2001.
- 58 Nakayama,K.I. and Nakayama,K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases, *Semin.Cell Dev.Biol.*, 16: 323-333, 2005.
- 59 Newman,R.M., Mobascher,A., Mangold,U., Koike,C., Diah,S., Schmidt,M., Finley,D. and Zetter,B.R. Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression, *J.Biol.Chem.*, 279: 41504-41511, 2004.
- 60 Ogram,S.A. and Reeves,R. Differential regulation of a multipromoter gene. Selective 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of a single transcription start site in the HMG-I/Y gene, *J.Biol.Chem.*, 270: 14235-14242, 1995.
- 61 Osaki,M., Oshimura,M. and Ito,H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer, *Apoptosis.*, 9: 667-676, 2004.
- 62 Paonessa,F., Foti,D., Costa,V., Chiefari,E., Brunetti,G., Leone,F., Luciano,F., Wu,F., Lee,A.S., Gulletta,E., Fusco,A. and Brunetti,A. Activator protein-2 overexpression accounts for increased insulin receptor expression in human breast cancer, *Cancer Res.*, 66: 5085-5093, 2006.
- 63 Pickart,C.M. and Cohen,R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 5: 177-187, 2004.
- 64 Reeves,R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function, *Gene*, 277: 63-81, 2001.
- 65 Reeves,R. and Beckerbauer,L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure, *Biochim.Biophys.Acta*, 1519: 13-29, 2001.
- 66 Reeves,R., Edberg,D.D. and Li,Y. Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells, *Mol.Cell Biol.*, 21: 575-594, 2001.
- 67 Reeves,R., Langan,T.A. and Nissen,M.S. Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88: 1671-1675, 1991.
- 68 Reeves,R., Leonard,W.J. and Nissen,M.S. Binding of HMG-I(Y) imparts architectural specificity to a positioned nucleosome on the promoter of the human interleukin-2 receptor alpha gene, *Mol.Cell Biol.*, 20: 4666-4679, 2000.
- 69 Reeves,R. and Nissen,M.S. Interaction of high mobility group-I (Y) nonhistone proteins with nucleosome core particles, *J.Biol.Chem.*, 268: 21137-21146, 1993.

- 70 Reeves,R. and Nissen,M.S. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure, *J.Biol.Chem.*, *265*: 8573-8582, 1990.
- 71 Reeves,R. and Nissen,M.S. Purification and assays for high mobility group HMG-I(Y) protein function, *Methods Enzymol.*, *304*: 155-188, 1999.
- 72 Reeves,R. and Wolffe,A.P. Substrate structure influences binding of the non-histone protein HMG-I(Y) to free nucleosomal DNA, *Biochemistry*, *35*: 5063-5074, 1996.
- 73 Richter,J.D. and Sonenberg,N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins, *Nature*, *433*: 477-480, 2005.
- 74 Rosenwald,I.B., Kaspar,R., Rousseau,D., Gehrke,L., Leboulch,P., Chen,J.J., Schmidt,E.V., Sonenberg,N. and London,I.M. Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels, *J.Biol.Chem.*, *270*: 21176-21180, 1995.
- 75 Rousseau,D., Kaspar,R., Rosenwald,I., Gehrke,L. and Sonenberg,N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *93*: 1065-1070, 1996.
- 76 Ruggero,D. and Sonenberg,N. The Akt of translational control, *Oncogene*, *24*: 7426-7434, 2005.
- 77 Saitoh,Y. and Laemmli,U.K. Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold, *Cell*, *76*: 609-622, 1994.
- 78 Sarbassov,D.D., Ali,S.M. and Sabatini,D.M. Growing roles for the mTOR pathway, *Curr.Opin.Cell Biol.*, *17*: 596-603, 2005.
- 79 Schneider,G., Oswald,F., Wahl,C., Greten,F.R., Adler,G. and Schmid,R.M. Cyclosporine inhibits growth through the activating transcription factor/cAMP-responsive element-binding protein binding site in the cyclin D1 promoter, *J.Biol.Chem.*, *277*: 43599-43607, 2002.
- 80 Schneider,G. and Schmid,R.M. Genetic alterations in pancreatic carcinoma, *Mol.Cancer*, *2*: 15, 2003.
- 81 Schneider,G. and Schmid,R.M. [Pathogenesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma: implications for future therapies?], *Internist (Berl)*, *46*: 157-165, 2005.
- 82 Schneider,G., Siveke,J.T., Eckel,F. and Schmid,R.M. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects, *Gastroenterology*, *128*: 1606-1625, 2005.
- 83 Sgarra,R., Rustighi,A., Tessari,M.A., Di,B.J., Altamura,S., Fusco,A., Manfioletti,G. and Giancotti,V. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer, *FEBS Lett.*, *574*: 1-8, 2004.
- 84 Sherr,C.J. Principles of tumor suppression, *Cell*, *116*: 235-246, 2004.

- 85 Sherr,C.J. and Roberts,J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.*, *13*: 1501-1512, 1999.
- 86 Sherr,C.J. and Roberts,J.M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases, *Genes Dev.*, *18*: 2699-2711, 2004.
- 87 Straus,D.S. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo, *Endocr.Rev.*, *5*: 356-369, 1984.
- 88 Strick,R. and Laemmli,U.K. SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein, *Cell*, *83*: 1137-1148, 1995.
- 89 Tallini,G. and Dal,C.P. HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors, *Adv.Anat.Pathol.*, *6*: 237-246, 1999.
- 90 Terhune,P.G., Phifer,D.M., Tosteson,T.D. and Longnecker,D.S. K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, *7*: 515-521, 1998.
- 91 Thanos,D., Du,W. and Maniatis,T. The high mobility group protein HMG I(Y) is an essential structural component of a virus-inducible enhancer complex, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, *58*: 73-81, 1993.
- 92 Thanos,D. and Maniatis,T. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome, *Cell*, *83*: 1091-1100, 1995.
- 93 Trapasso,F., Sarti,M., Cesari,R., Yendamuri,S., Dumon,K.R., Aqeilan,R.I., Pentimalli,F., Infante,L., Alder,H., Abe,N., Watanabe,T., Viglietto,G., Croce,C.M. and Fusco,A. Therapy of human pancreatic carcinoma based on suppression of HMGA1 protein synthesis in preclinical models, *Cancer Gene Ther.*, *11*: 633-641, 2004.
- 94 Vogelstein,B., Lane,D. and Levine,A.J. Surfing the p53 network, *Nature*, *408*: 307-310, 2000.
- 95 Wang,D., Zamorano,J., Keegan,A.D. and Boothby,M. HMG-I(Y) phosphorylation status as a nuclear target regulated through insulin receptor substrate-1 and the I4R motif of the interleukin-4 receptor, *J.Biol.Chem.*, *272*: 25083-25090, 1997.
- 96 Wang,D.Z., Ray,P. and Boothby,M. Interleukin 4-inducible phosphorylation of HMG-I(Y) is inhibited by rapamycin, *J.Biol.Chem.*, *270*: 22924-22932, 1995.
- 97 Warshaw,A.L. and Fernandez-del,C.C. Pancreatic carcinoma, *N.Engl.J.Med.*, *326*: 455-465, 1992.
- 98 White,M.F. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins, *Can.J.Physiol Pharmacol.*, *84*: 725-737, 2006.
- 99 Yu,J. and Zhang,L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *331*: 851-858, 2005.