

**Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. G. Adler**

**Untersuchungen zur Expression, Regulation und
Funktion des Calcineurin/ NFAT2 Signalweges im
Pankreaskarzinom**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Thomas Linhart
aus Brünn/ Tschechische Republik**

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Volker Ellenrieder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marko Kornmann

Tag der Promotion: 25.10.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<u>1. Einleitung.....</u>	1
<u>1.1 Einführung in die klinische Problematik des Pankreaskarzinoms</u>	1
<u>1.2 Molekulare Ursachen der Krebserkrankung</u>	2
<u>1.3 Das Tumorprogressionsmodell</u>	3
<u>1.4 Transkriptionsfaktoren.....</u>	6
<u>1.5 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren</u>	7
<u>1.6 NFAT-Proteine in der Karzinogenese</u>	11
<u>1.7 Ziele dieser Arbeit</u>	12
<u>2. Material und Methoden</u>	13
<u>2.1 Zellkultur.....</u>	13
<u>2.2 Transfektion der Zellen.....</u>	15
<u>2.3 RNA-Analysen</u>	16
<u>2.4 Proteinanalysen</u>	21
<u>2.5 DNA Pulldown Assay.....</u>	26
<u>2.6 Reporterassays.....</u>	27
<u>2.7 Funktionelle Assays.....</u>	28
<u>2.8 Statistische Methoden.....</u>	30
<u>3. Ergebnisse.....</u>	31
<u>3.1 Untersuchungen zur in vitro Expression von NFAT2 in</u> <u>Pankreaskarzinomzelllinien.....</u>	31
<u>3.2 Funktionelle Untersuchungen zur Aktivität des Calcineurin/ NFAT 2 Signalweges</u> <u>in Pankreaskarzinomzellen</u>	33
<u>3.3 Einflüsse des Calcineurin/ NFAT 2 Signalweges auf Tumorprogression und</u> <u>Zellzyklus</u>	37
<u>3.4 Die Auswirkungen der Hemmung des Ca²⁺/ Calcineurin Signalweges auf den</u> <u>Zellzyklus werden über NFAT2 Aktivierung reguliert.....</u>	41

<u>3.5 Der aktivierte Ca²⁺/ Calcineurin/ NFAT2 Signalweg reguliert die endogene c-Myc Expression</u>	44
<u>3.6 NFAT2 reguliert die c-Myc Aktivität über direkte Interaktion mit dem c-Myc Promoter</u>	48
<u>4. Diskussion</u>	51
<u>4.1 Interpretation der Ergebnisse zur Expression, Regulation und Funktion von NFAT2 im Pankreaskarzinom</u>	51
<u>4.2 Interpretation der Untersuchungen zur Rolle von c-Myc als Mediator der NFAT vermittelten Zellzyklus-Progression</u>	54
<u>4.3 Bedeutung und Ausblick</u>	58
<u>5. Zusammenfassung</u>	60
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	62
<u>Danksagung</u>	69

Abkürzungsverzeichnis

µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Adenomatous polyposis coli Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
c.a.	konstitutiv aktiv
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
CK	Casein Kinase
CREB	cyclic-AMP response element-binding Protein
CsA	Cyclosporin A
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
d.n.	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor)
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
Fa.	Firma
for	vorwärts
FCS	Fötales Rinderserum
g	Gramm

GSK3	Glycogen synthase kinase 3
h	Stunde
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
JNK	c-Jun N-terminalen Kinasen
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KLF	Kruppel-like transcription factors
l	Liter
Luc	Luciferase
M	Mol/Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Matrix-CGH	matrix comparative genomic hybridization
MEK	MAP/ ERK Kinase
MEKK	MAP/ ERK Kinase Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mut	mutiert
NaCl	Natriumchlorid
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaPO ₄	Natriumphosphat
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C

PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RB	Retinablastoma Protein
rev	revers
RHR	Rel-Homology-Region
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute - Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	silencer Ribonukleinsäure
SSC	Sodiumcitrat
TAK	TGF β -aktivierte Kinase
TBS	Dreifach gesättigte Salzlösung
TBST	Dreifach gesättigte Salzlösung mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF β	Transforming growth factor β
TIE	TGF β inhibitory element
Tween	Polyoxyetylenesorbitan
Tris	Trishydroxymethanmethan
U	Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht

1. Einleitung

1.1 Einführung in die klinische Problematik des Pankreaskarzinoms

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den aggressivsten soliden Tumoren des Menschen, mit einer steigenden Inzidenz in den westlichen Industrieländern und einer 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 4% nach Diagnosestellung. Damit liegt das Pankreaskarzinom an der 4. Stelle der tumorbedingten Todesursachen in Deutschland und anderen westlichen Ländern (Neoptolemos et al., 2001). Es ist nach dem kolorektalen Karzinom und dem Magenkarzinom das dritthäufigste Malignom des Magendarmtraktes. In Deutschland liegt die Inzidenz derzeit bei 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, bei einem mittleren Erkrankungsalter von 68 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004, S. 32-35). Als sicherer Risikofaktor gilt das Rauchen (Howe et al., 1991) und das Vorliegen einer chronischen Pankreatitis. Weiterhin werden eine Adipositas und eine fett- und/ oder fleischreiche Ernährung, sowie ein Diabetes mellitus als prädisponierende Faktoren angesehen (Bowles und Benjamin, 2001; Fisher, 2001; Silverman 2001; Talamini et al., 1999).

Die Kombination aus schnellem Tumorwachstum, früh einsetzender Metastasierung und bisher nur unzureichenden Diagnose- und Therapiemöglichkeiten sind die Hauptursachen für die extrem ungünstige Prognose. Da sowohl charakteristische Frühsymptome, als auch geeignete Screeninguntersuchungen fehlen, sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei bis zu 50% der Patienten bereits Lymphknoten und periphere Nerven von Tumorzellen befallen, so dass entsprechend den heutigen Möglichkeiten ein nicht mehr heilbares Tumorstadium vorliegt (Takahashi et al., 1997; Marczell und Stierer, 1992). Letztlich kommen weniger als 10-20% aller Patienten für eine radikale Resektion des Primärtumors unter kurativen Gesichtspunkten in Frage (Zamboni et al., 2000). Auch eine systemische Chemotherapie, Strahlentherapie oder deren Kombination bieten bisher keine befriedigende therapeutische Alternative, da der Tumor über eine ausgeprägte Chemoresistenz verfügt und ausreichend hochdosierte Therapien oft auf Grund des reduzierten Allgemeinzustandes des Patienten nicht möglich sind (Cascinu et al., 2006).

Ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte zukünftig in neuen molekularen Therapieansätzen zu sehen sein, welche in der Behandlung hämatologischer

Krebserkrankungen, aber auch bei einigen soliden Tumoren zunehmend Bedeutung erlangen (Easton und Houghton, 2006). Beispiele hierfür sind Thyrosin-Kinase-Inhibitoren in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie, sowie EGFR-Antikörper in der Therapie des fortgeschrittenen Kolon- oder Brustdrüsenkarzinoms. Grundlage für derartige moderne Therapieansätze ist natürlich eine umfassende Kenntnis der zugrundeliegenden molekulargenetischen und zellbiologischen Veränderungen einer Tumorerkrankung, wie z.B. der pathogenetischen Bedeutung aktivierender oder inaktivierender Mutationen, der konstitutiven Aktivierung onkogener Signalwege oder die veränderte Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren.

1.2 Molekulare Ursachen der Krebserkrankung

Krebs ist die Konsequenz der Akkumulation von genetischen Veränderungen und führt zu einem Ungleichgewicht jener Prozesse, die den Zell-Zyklus, den programmierten Zelltod, die Zelldifferenzierung und letztlich das Zellwachstum und die Gewebemöostase regulieren (Fearon und Vogelstein, 1990). Diese genetischen Veränderungen haben einen Wachstumsvorteil der Krebszellen aufgrund klonaler Selektion zur Folge (Nowell, 1976). Der überwiegende Teil dieser Veränderungen ist somatischer Natur, nur ein geringer Teil beruht auf einer genetischen Prädisposition. Die Entwicklung eines Tumors stellt letztlich ein Ungleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod dar. Gene, welche die Dysfunktion der Tumorzellen bedingen und damit ursächlich für ein verändertes Wachstumsverhalten verantwortlich sind, werden in zwei Klassen unterteilt: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene entstehen durch die Mutation eines in der Zelle vorkommenden Proto-Onkogens, wobei es zur konstitutiven Aktivierung des entsprechenden Proteins und somit zu einem Funktionsgewinn kommt. Onkogene üben eine dominante Wirkung auf die Tumorentwicklung aus. Innerhalb der Onkogene unterscheidet man zwei Gruppen (Garraway und Seller, 2006): Onkogene mit immortalisierender Wirkung verursachen den Schutz vor Apoptose und Seneszenz (z.B. *bcl2*); Onkogene mit transformierender Wirkung ermöglichen der Zelle ein von Wachstumsfaktoren unabhängiges Wachstum und fördern so die Proliferation der Zelle (z.B. *ras*, *src*) (De Nigris et al., 2006; Vogelstein und Kinzler, 2004). Für die Tumorgenese sind mehrere onkogene Mutationen notwendig, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen gegenseitig unterstützen können. Die Klasse der Tumorsuppressorgene

zeichnet sich in Tumoren durch den Funktionsverlust des Genproduktes aus. Tumorsuppressorgene sind in der Normalzelle negative Wachstumsregulatoren. Allgemein können sie auch als „Wachstumsbremsen“ bezeichnet werden. Damit die Funktion eines Tumorsuppressorgens verloren geht, müssen in der Regel beide Allele des Gens betroffen sein (Knudson, 1971). In den meisten Fällen liegt eine Kombination aus deaktivierender Punktmutation des einen Allels und einer Deletion des anderen Allels vor. Wichtige Tumorsuppressoren sind p53, Smad4, Retinoblastoma Protein (RB) und APC (Adenomatous polyposis coli protein). Nach neuesten Erkenntnissen müssen in Abhängigkeit des Tumortyps im zeitlichen Verlauf der Tumorentwicklung mindestens vier bis sieben Veränderungen im Genom stattfinden (Vogelstein und Kinzler, 2004). Dies erklärt auch, warum die Tumorentwicklung viele Jahre benötigt und daher Tumore typischerweise Erkrankungen des älteren Menschen sind (Vogelstein und Kinzler, 1993).

1.3 Das Tumorprogressionsmodell

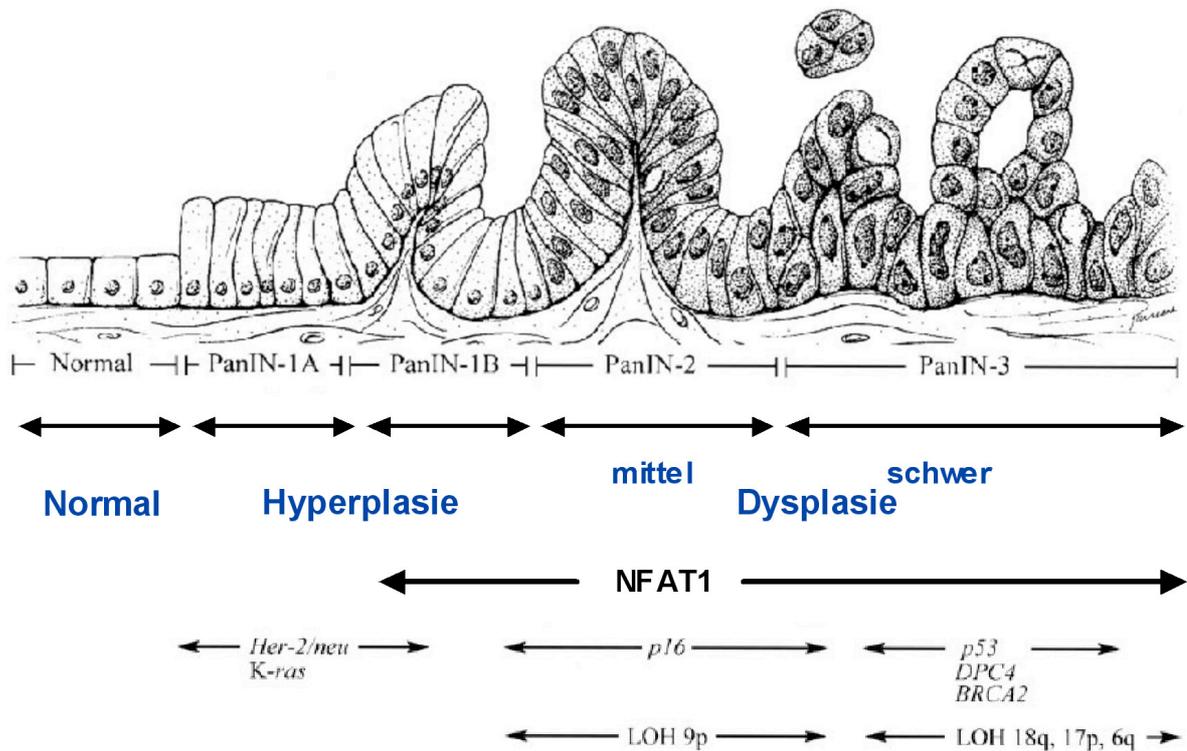
In Übereinstimmung mit der Feststellung, dass die Entstehung von Tumoren eine Anhäufung von genetischen Veränderungen darstellt, lässt sich ein Progressionsmodell für Tumore entwerfen. Hierbei wird versucht, die Genveränderungen in eine zeitliche Abfolge zu bringen (Vogelstein und Kinzler, 1993). Betrachtet man am Beispiel der Pankreaskarzinome das postulierte Tumorprogressionsmodell der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN), stellt man fest, dass in den Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms Mutationen von Genen zu finden sind, die auch in Karzinomen vorhanden sind (Klöppel und Kosmahl, 2001). Ferner steigt die Anzahl der übereinstimmenden Mutationen mit der Progression des Tumors. So ist in den Hyperplasien des Gangepithels eine Punktmutation im Proto-Onkogen K-ras feststellbar, die bei annähernd allen untersuchten Pankreaskarzinomen eines späteren Stadiums nachgewiesen werden kann (Almoguerra et al., 1988). Nachfolgende genetische Veränderungen führen zur schrittweisen klonalen Expansion des Tumors (Nowell, 1976), die zur Ausbildung des invasiven Karzinoms führen.

Der Übergang von einer mittelgradigen Dysplasie zur hochgradigen Dysplasie, bzw. zum Carcinoma in situ in der Pankreastumorprogression, also die Progression von PanIN-2 zu PanIN-3 (**Abbildung 1**), geht einher mit folgenden bekannten genetischen Veränderungen:

- **p53:** 76% der Pankreaskarzinome zeigen eine biallelische Inaktivierung dieses Transkriptionsfaktors, dessen Genprodukt ein nukleäres Phosphoprotein darstellt und in der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Pellegata et al., 1994; Redston et al., 1994)
- **p16:** stellt ein Zellzyklus-Kontrollgen dar, welches in nahezu 100% aller Pankreaskarzinome inaktiviert ist (Caldas et al., 1994; Schutte et al., 1997)
- **Smad4 (DPC4):** ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle im TGF β -Signalweg und in der TGF β induzierten Wachstumshemmung spielt und in 50% der Pankreaskarzinome inaktiviert ist (Hahn et al., 1996).

Zu den bekannten Onkogenen, die in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms von Bedeutung sind, gehören allen voran der Transkriptionsfaktor c-Myc, der EGF-Rezeptor und der Zellzyklusregulator Cyclin D1 (Baumgart et al., 2005; Schneider und Schmid, 2003). Darüber hinaus gibt es aber noch eine Reihe weiterer wichtiger Regulationsproteine, die aufgrund epigenetischer Veränderungen (z.B. gesteigerte Methylierung von Tumorsuppressoren), aufgrund eines veränderten Protein-Metabolismus (z.B. gesteigerte oder gehemmte Degradation und Inaktivierung), oder als Folge eines veränderten zellulären Signallings wachstumsstimulierende Funktionen annehmen bzw. inhibierende Funktionen verlieren, und somit ebenfalls von großer Bedeutung für das Wachstumsverhalten entarteter Zellen sind.

Die Folge von genetischen oder epigenetischen Veränderungen einer Zelle sind zumeist inadäquat hohe oder erniedrigte Expressionslevel von Proteinen, die in wichtige zelluläre Prozesse wie z.B. Wachstum oder Differenzierung eingreifen. Damit wird auch klar, warum Transkriptionsfaktoren, die letztlich über Promotorregulation eine zentrale Rolle in der Expressionkontrolle übernehmen, von großer Bedeutung in der Tumorgenese sind.



Progression model for pancreatic cancer. Normal duct epithelium progresses to infiltrating cancer (left to right) through a series of histologically defined precursors (PanINs). The overexpression of HER-2/neu and point mutations in the K-ras gene occur early, inactivation of the p16 gene at an intermediate stage, and the inactivation of p53, DPC4, and BRCA2 occur relatively late.

Abbildung 1: Pankreastumorprogressionsmodell: dargestellt sind die morphologischen Veränderungen des Epithels (obere Zeichnung) und bekannten genetischen Veränderungen, den jeweiligen Stadien der Karzinogenese des Pankreas zugeordnet (Hruban et al., 2000, S. 2970), ergänzt um NFAT1 (siehe 1.5 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren; 1.6 NFAT Proteine in der Karzinogenese).

1.4 Transkriptionsfaktoren

Ein Transkriptionsfaktor ist ein Protein, das für die Initiation der RNA-Polymerase bei der Transkription von Bedeutung ist. Außerdem sind Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Elongation und Termination beteiligt. Transkriptionsfaktoren können an die DNA binden und den Promotor aktivieren oder reprimieren. Es gibt auch Transkriptionsfaktoren, die nicht direkt an die DNA, sondern zum Beispiel an andere DNA-bindende Proteine binden. Es werden allgemeine (basale) und Gewebe- bzw. Zellspezifische Transkriptionsfaktoren unterschieden.

Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind für jede Transkription notwendig. Sie übernehmen verschiedene Aufgaben und binden dabei entweder direkt an die DNA, zum Beispiel an allgemeine Motive wie Promotorelemente (zum Beispiel die TATA-Box), an die RNA-Polymerase, oder an andere Proteine des Initiationskomplexes. Diese „basalen“ Transkriptionsfaktoren treten stets als Komplexe mit anderen Proteinen auf (Greenblatt, 1991; Ptaschne und Gnann, 1990; Pugh, 2000; Hochheimer und Tijan, 2003). Durch das Binden an die DNA stellen sie eine Art "Plattform" für die RNA-Polymerase her, die Polymerase bindet an diese "Plattform" und die Transkription wird initiiert. Transkriptionsfaktoren sind in ihrer Struktur divers und haben unterschiedliche Aufgaben. Einige besitzen Bindestellen für wichtige Regulatoren (z.B. für Antiterminatoren), andere haben Protein-Kinase Funktionen oder zeigen Helicase-Aktivität (z.B. TAF250-TFIID) (Greenblatt, 1991). Sie sind ubiquitär in allen Zellen eines Organismus gleichmäßig vorhanden und haben an der spezifischen Genregulation meist keinen Anteil.

Spezifische Transkriptionsfaktoren vermitteln der Polymerase, welches Gen aktiviert werden soll. Sie sind daher nur in den Zellen vorhanden, in denen das Gen, das sie regulieren, aktiviert (oder je nach dem auch reprimiert) werden soll. Die DNA-Bereiche, an welche sie binden, haben eine spezifische Sequenz (cis-Element oder Enhancer), die von dem Transkriptionsfaktor erkannt wird. Spezifische Transkriptionsfaktoren werden meistens durch Proteinkinasen aktiviert. Die Aktivierung ist das Ende einer langen Signalübermittlungskette, die durch einen Rezeptor ausgelöst wurde (Erlanson et al., 1996; Jungert et al., 2006).

Aktivatoren funktionieren nach zwei Prinzipien:

1. Sie binden den RNA-Polymerasekomplex. Dies verleiht der Polymerase eine höhere Bindungs-Affinität zu dem aktivierten Promotor. Dieser wird also nun verstärkt gebunden, bzw. werden die Promotorstärke (maximal 1 Initiation pro Sekunde) und die nachfolgende proteinkodierende Sequenz verstärkt expremiert.
2. Sie haben Histon-Acetyl-Transferase Funktion oder rekrutieren solche. Durch die Acetylierung von Histonen wird das Chromatin aufgelockert, die RNA-Polymerase bekommt besser Zugang zur DNA, kann besser binden und damit auch besser transkribieren.

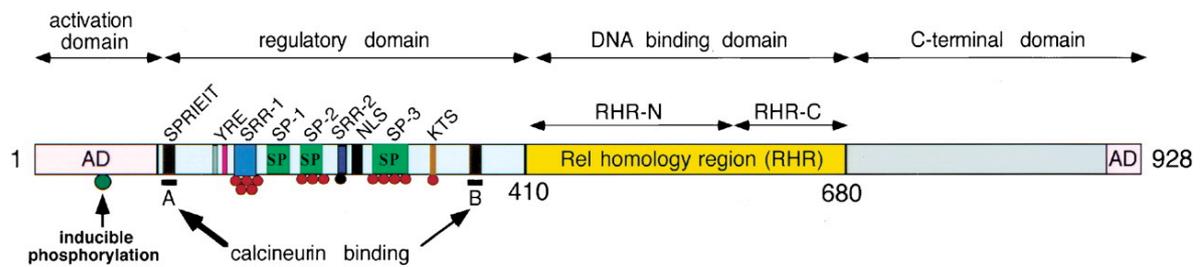
Repressoren funktionieren nach einem umgekehrten Prinzip, z.B. führen Histon-Deacetylasen zu einer dichteren Verpackung der DNA und durch die damit verbundene Blockade von Polymerasebindungsstellen folgt somit ein Absenken der Bindungs-Affinität. Eine komplexe Regulation kommt durch das netzwerkartige Zusammenspiel der vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren zustande. Die Expression und/ oder Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren wird durch Signalkaskaden reguliert, wodurch Transkriptionsfaktoren häufig Ziele onkogener oder tumorsupprimierender Signalwege darstellen. Zu den Signal-regulierten Transkriptionsfaktoren gehören beispielsweise Proteine der Helix-Loop-Helix Familie (z.B E2A, Hairy und Id1), Leucine-Zipper Faktoren (z.B. Jun, Fos oder CREB) oder auch Zinkfinger-Proteine (Sp1-artige Proteine, Steroidhormonrezeptoren oder PPAR). Für einige dieser Transkriptionsfaktoren konnte bereits eine Rolle in der Karzinogenese nachgewiesen werden. So ist der TGF β -regulierte Transkriptionsfaktor Smad4 beispielsweise als wichtiger Tumorsuppressor beschrieben, während für Sp1 eine Rolle in der Progression epithelialer Tumoren vermutet wird (Safe und Abdelrahim, 2005).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Familie der Ca²⁺-regulierten NFAT-Proteine.

1.5 Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren umfasst gegenwärtig fünf Mitglieder: NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3) und TonEBP. NFAT-Proteine sind durch eine hochkonservierte RHR-(Rel-Homology-Region)

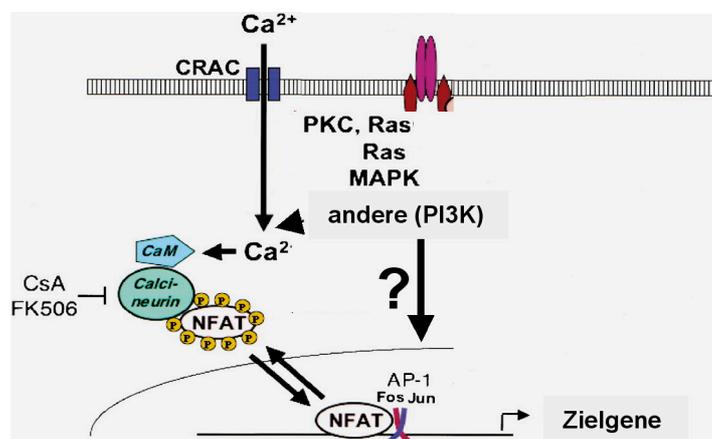
DNA-Bindungsdomäne charakterisiert, über die sie mit geringer Affinität an GGAAA-Promotorsequenzen binden (**Abbildung 2**). NFAT-Proteine sind primär zytoplasmatisch lokalisiert und translozieren erst nach Aktivierung in den Zellkern, um dort gemeinsam mit anderen Bindungspartnern die Regulation ihrer Zielgene zu modulieren (Hogan et al., 2003).



The NFAT regulatory domain: sites of phosphorylation and interaction with calcineurin. (Top) Overall structure of NFAT proteins. The diagram is based on murine NFAT1 (Okamura et al. 2000). Regulatory-domain phosphorylations in conserved sequence motifs are shown as circles below the motif. Red circles indicate phosphate groups that are removed by calcineurin, whereas the black circle in the SRR-2 region is not susceptible to dephosphorylation by calcineurin. The two regions involved in contacting calcineurin are indicated. Region A is the PxIxIT sequence found in all NFAT proteins, and region B has been defined in NFAT2 and in NFAT4. (AD) Activation domains; (NLS) nuclear localization signal in the regulatory domain. A subsidiary NLS is located in the RHR-C domain (Beals et al. 1997a). (Middle) Sequences of phosphorylated motifs in murine NFAT1, with phosphorylated residues indicated in blue boxes, other conserved residues shaded in yellow, and the core of the nuclear localization signal (KRR) shown in bold. The phosphorylated residues in the SPxx, SRR-2/NLS, and KTS motifs were identified by mass spectrometry; those shown as phosphorylated in the SRR-1 region indicate one possible arrangement of the five residues known to be phosphorylated, among the seven serines present in the motif (Okamura et al. 2000). (Bottom) Sequences of the calcineurin-binding region B of NFAT2 and NFAT4 aligned with the corresponding sequences of other NFAT proteins and the similar sequence in DSCR1. All sequences are from the human proteins.

Abbildung 2: Domänen von NFAT2, einschließlich Serin-Phosphorylierungsstellen (SRR-1, SP-1, SP-2, SRR-2 und KTS), DNA-Bindungsdomäne (RHR), Calcineurin-Bindungsdomänen (A und B) und transkriptionelle Regulationsdomänen (AD) (Hogan et al., 2003, S. 2008).

Untersuchungen an T-Lymphozyten zufolge wird die Aktivierung von NFAT1, NFAT2, NFAT3 und NFAT4 v.a. durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert und erfolgt durch Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung einer 300-Aminosäuren umfassenden N-terminalen Regulationsdomäne. Diese Regulationsdomäne beherbergt vier konservierte serinreiche Sequenzmotive (SRR-1, SPxx, SRR-2 und KTS), die in ruhenden T-Lymphozyten phosphoryliert sind und von denen drei als Folge eines erhöhten Ca^{2+} -Einstroms durch die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert werden (Hogan et al., 2003). Dem heutigen Wissensstand zufolge spielt die Ca^{2+} -induzierte Phosphatase Calcineurin in der Aktivierung von NFAT eine essentielle Rolle, da Inaktivierung von Calcineurin mit einer Inhibition der nukleären Translokation und konsekutiv mit einem Verlust der Transkriptionsaktivität einhergeht. Die Terminierung der NFAT-vermittelten Transkription erfolgt durch Kinasen-induzierte Rephosphorylierung von NFAT und anschließendem nukleärem Export. An diesen Deaktivierungsprozessen sind in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus einer Zelle verschiedene konstitutiv aktive und Signalling-regulierte Kinasen beteiligt, die durch gesteigerte Phosphorylierung der NFAT-Proteine lymphozytären Zellen in der Ruhephase halten (Crabtree und Olson, 2002).



Schematic view of the NFAT activation cycle. NFAT is activated by cell-surface receptors coupled to Ca^{2+} mobilization:

Immunoreceptors and receptor tyrosine kinases (RTKs) activate phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PLC), while Gprotein-coupled receptors (GPCR) activate PLC. PLC activation raises intracellular free Ca^{2+} levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in several sequential steps: Hydrolysis of phosphatidylinositol (PI)-4,5-bisphosphate (PIP₂) by PLC results in generation of inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃); IP₃ binds to IP₃ receptors (IP₃R) in the endoplasmic reticulum (blue compartment) and promotes a brief spike of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase by depleting ER Ca^{2+} stores; and store depletion is sensed by an as-yet-uncharacterized signaling mechanism that triggers

a sustained process of “store-operated” Ca^{2+} entry through CRAC channels in the plasma membrane. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases result in activation of many calmodulin (CaM)-dependent enzymes, including the phosphatase calcineurin and the CaM-dependent kinases CaMKII and CaMKIV. Calcineurin dephosphorylates multiple phosphoserines on NFAT, leading to its nuclear translocation and activation. Calcineurin activity is inhibited by the immunosuppressive drugs cyclosporin A (CsA) and FK506, which act as complexes with their intracellular immunophilin receptors cyclophilin and FKBP12, respectively. In parallel, hydrolysis of PIP2 by PLC results in production of diacylglycerols (DAG), which activate RasGRP and protein kinase C (PKC). Receptor activation is coupled to activation of protein tyrosine kinases (PTKs), Ras, MAP kinases (MAPK), and PI-3 kinase (PI3K). MAP kinase activation leads to synthesis and activation of Fos and Jun, the components of the heterodimeric transcription factor AP-1, which then binds cooperatively with NFAT to composite NFAT:AP-1 sites found in the regulatory regions of many NFAT target genes. Ca^{2+} mobilization is terminated by Ca^{2+} -binding proteins and by Ca^{2+} ATPases in the ER and plasma membranes, which pump Ca^{2+} back into ER stores and out of the cell, respectively. The ER enzyme is inhibited by thapsigargin, which depletes ER Ca^{2+} stores and activates CRAC channels in the absence of receptor stimulation. In neurons and vascular smooth muscle cells, NFAT is selectively activated by Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels (LTCC; Graef et al. 1999; Stevenson et al. 2001). The underlying mechanism is not understood. Potentially, calcineurin and NFAT could be localized to the vicinity of plasma membrane signaling complexes containing LTCC, NMDA receptors, and scaffold/adaptor proteins such as PSD95 and AKAP-79. Alternatively, as suggested for CREB activation, the mechanism could involve selective activation of MAPK pathways via calmodulin bound to LTCC (Dolmetsch et al. 2001).

Abbildung 3: *Intrazelluläre Regulation der Aktivierung und Deaktivierung von NFAT in Lymphozyten (modifiziert nach Hogan et al., 2003, S. 2007). Durch intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung erfolgt die Aktivierung von Calcineurin, einer Calmodulin (CaM) abhängigen Phosphatase. Calcineurin wiederum dephosphoryliert mehrere Phosphoserinreiche Sequenzmotive von NFAT (nuclear factor of activated T-cells) und bewirkt damit seine nukleäre Translokation und Aktivierung. Die Aktivität von Calcineurin kann durch die immunsuppressiven Pharmaka CsA (Cyclosporin A) und FK 506 gehemmt werden. Zugleich erfolgt eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und von Protein Tyrosin Kinasen, Ras, MAP Kinasen (MAPK) und PI-3 Kinase (PI3K). Aktivierung der MAP Kinase führt zur Synthese und Aktivierung von Fos und Jun, der beiden Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1.*

Ogleich für verschiedene Kinasen eine Rolle in der NFAT-Deaktivierung gezeigt werden konnte, gibt es derzeit noch kein einheitliches Konzept über die zeitlichen und zelltyp-

spezifischen Mechanismen der NFAT-Deaktivierung. Casein Kinase 1 und GSK3 sind konstitutive NFAT-Kinasen, die in Deaktivierungsvorgängen bei ruhenden T-Lymphozyten und in Herzmuskelzellen von Bedeutung sind und den nukleären Export von NFAT2 begünstigen (Neal und Clipstone, 2001; Murphy und Hughes, 2002). Andere Kinasen, wie z.B. die MAP-Kinasen p38 und JNK, hemmen die Aktivierung von NFAT1 und NFAT4 in Skelettmuskelzellen und Lymphozyten (Wu et al., 2003; Gomez et al., 2003). Damit wird klar, dass NFAT-Deaktivierungsprozesse komplexer und nicht-redundanter Natur sind und abhängig vom zellulären Kontext erfolgen. Über Mechanismen der NFAT-Aktivierung und Deaktivierung in Tumorzellen liegen derzeit keinerlei Daten vor.

Weiterhin scheinen Crosstalks der NFAT-Proteine auf nukleärer Ebene entscheidende Auswirkungen auf die NFAT-regulierte Transkription auszuüben. So konnte in verschiedenen Untersuchungen eine physikalische und funktionelle Interaktion zwischen NFAT-Proteinen und anderen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise c-Jun, c-Fos und GATA, in der Kontrolle NFAT-regulierter Targetgene dargestellt werden (Macian et al., 2001). Die Signalling-regulierte Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren bestimmt in der Tat maßgeblich die Zielgen-Selektion und damit die Substratspezifität von NFAT und erklärt die funktionelle Vielseitigkeit dieser Transkriptionsfaktoren.

1.6 NFAT-Proteine in der Karzinogenese

Erste Untersuchungen zur Bedeutung der NFAT- Proteine in der Tumorbiologie lassen eine wichtige Rolle der NFAT-Proteine in der Karzinogenese erkennen. Basierend auf den Daten von Jauliac und Mitarbeitern wird eine gesteigerte Expression von NFAT1 und TonEBP in Kolonkarzinomzellen mit einer erhöhten Invasivität assoziiert (Jauliac et al., 2002).

Entsprechend einigen Vorarbeiten zu dieser Arbeit liegt eine gesteigerte Expression von NFAT1 und NFAT2 in der Mehrzahl der Pankreaskarzinome vor. In nur weniger als 10% aller untersuchten Tumore (ca. 40 Tumorgewebe) ließ sich weder NFAT1 noch NFAT2 nachweisen. Mehr noch, in Färbungen in PanIN Geweben ließ sich NFAT1 bereits in der frühen Karzinogenese (Stadium 1b und Stadium 2) nachweisen. Eine Expression von NFAT2 konnte ebenfalls bereits in Vorstadien des Pankreaskarzinoms, beginnend im

Stadium 2 und Stadium 3, gezeigt werden (Ellenrieder V., 2005, unveröffentlichte Befunde).

Genetische Untersuchungen konnten eine chromosomale Amplifikation von NFAT1 in mehr als 80% der untersuchten Pankreaskarzinomgewebe als Ursache der Überexpression nachweisen (Holzmann et al., 2004). Die Bestimmung der Häufigkeit einer chromosomalen Amplifikation von NFAT2 ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Wenngleich diese Vorarbeiten eine Rolle von NFAT-Proteinen in der Karzinogenese der Pankreas vermuten lassen, so liegen bislang keinerlei Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von NFAT1 oder NFAT2 im Pankreaskarzinom vor.

1.7 Ziele dieser Arbeit

1. Wie wird NFAT2 im Pankreaskarzinom reguliert und ist dieser Signalweg aktiv?
2. Welche funktionelle Bedeutung auf den Zellzyklus übt NFAT2 im Pankreaskarzinom aus?
3. Durch Regulation welcher Zielgene übt NFAT2 Einfluss auf den Tumorprogress im Pankreaskarzinom aus?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Tabelle 1: Pankreaskarzinomzelllinien mit Bezugsquellen und jew. Kultivierungsmedien.

NAME	BESCHREIBUNG	NÄHRMEDIUM	QUELLE
Panc-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie	DMEM	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien
Suit2-028	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	DMEM	T. Iwamura Department of Surgery I, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan
IMIM PC-1	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	DMEM	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien
IMIM PC-2	Humanes Adenokarzinom (Lebermetastase)	DMEM	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien
ASPC-1	Humanes Adenokarzinom	RPMI 1640	F.X. Real, Institute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien
TD-1	Murin	RPMI 1640	R.M. Schmid, Medizinische Klinik II, TU München
TD-2	Murin	RPMI 1640	R.M. Schmid, Medizinische Klinik II, TU München

Die Kultivierung der beschriebenen Zelllinien erfolgte in serumfreiem Medium (jeweiliges Medium: siehe **Tabelle 1**), das mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 5% Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt inkubiert und einer Konfluenz von etwa 90% passagiert.

Dazu wurden sie nach einem Waschgang mit 1x PBS mit 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert und dadurch vom Schalenboden gelöst, bei 1000 rpm pelletiert und dann abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis 1:3 bis 1:10 neu ausgesät.

Reagenzien:

-RPMI 1640-Medium	Invitrogen Lifetechnologies, Carlsbad, USA
-DMEM-Medium	Invitrogen Lifetechnologies, Carlsbad, USA
-Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Lifetechnologies, Carlsbad, USA
-FCS	Invitrogen Lifetechnologies, Carlsbad, USA
-Trypsin-EDTA (1x)	Biochrom AG, Berlin
-1x PBS :	
140 mM	NaCl
3 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	H ₂ PO ₄
pH 7 mit HCl einstellen	

Reagenzien zur Stimulation/ Inhibition:

-CsA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
-FK 506	Calbiochem, Darmstadt
-Ionomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Materialien:

-Gewebekulturflaschen 650 ml, mit Filter	Greiner, Frickenhausen
-Gewebekulturflaschen 250 ml mit Filter	Greiner, Frickenhausen
-Petrischalen 100 mm	Greiner, Frickenhausen
-24-well Kulturplatten	Becton & Dickinson, Heidelberg
-12-well Kulturplatten	Becton & Dickinson, Heidelberg
-Membraneinsätze, Porengröße 8 µm	Becton & Dickinson, Heidelberg
-Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
-Zellschaber	Costar, Bodenheim
-Bench, Lamin Air HBB 2448	Heraeus Instruments, Langenselbold
-Brutschrank, WTB	Binder, Tuttlingen

2.2 Transfektion der Zellen

Bei der Transfektion wird DNA/RNA in eukaryote Zellen eingeführt. Bei der transienten Transfektion kommt es zur vorübergehenden Expression des fremden Gens. Abhängig von der Zelllinie erreicht man mit verschiedenen Transfektionsmethoden die besten Transfektionseffizienzen.

Am Vortag wurden 60.000 Zellen pro well (Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer) in einer 24-well-Platte und 1.000.000 Zellen pro 100 mm Schale ausgesät und für 24 h in 1ml bzw. 10 ml serumhaltigem Medium inkubiert. Mindestens 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Bei Transfektion von siRNA wurde die Transfektion zweimalig innerhalb von 24 h durchgeführt, um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erzielen.

Transfektionsmedien:

-Transfast (DNA)	Promega, Mannheim
-Transmessenger (siRNA)	Qiagen, Hilden

Transfizierte DNA:

-c-Myc-Expressionsvektor	AG Ellenrieder, Innere Medizin I, Universität Ulm
-NFAT2-Expressionsvektor	A. Rao, Harvard Medical School, Boston, USA
-c.a.Calcineurin	Chi-Wing Chow, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA
-pNFAT2-d.n.	J. Northrop, Affymax Research Institute, Palo Alto, USA
-RSV	R. Urrutia, GI-Research Unit, Mayo Clinic, MI, USA
-c-Myc-wt (-2446 - + 334)-Luc	J. Massague, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA
-cisNFAT-Luc	Stratagene, Garden Grove, USA

Transfizierte RNA:

-Silencer negative Control	
-siRNA NFAT#1:	5`-GGUCAUUUUCGUGGAGAAATT-3`
-siRNA NFAT#2:	5`-GAAACUCCGACAUUGAACUTT-3`
-siRNA NFAT#3:	5`-GGACUCCAAGGUCAUUUUCTT-3`

-siRNA c-Myc: 5`-CGAGCUAAAACGGAGCUUUTT-3`

Alle siRNA-Konstrukte wurden von der Fa. Ambion, Austin, USA, bezogen.

2.3 RNA-Analysen

2.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen wurden die Zellüberstände vollständig entfernt und der verbleibende Zellrasen zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden pro 100 mm Schale 2 ml RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy Midi-Kit), versetzt mit 20 µl β-Mercaptoethanol, zugegeben und die Zellen mittels Zellschaber aus der Kulturflasche entfernt. Die Extraktion erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Materialien:

-RNeasy Midi-Kit Qiagen, Hilden

2.3.2 Reverse Transkriptase-PCR

Die Herstellung des Ansatzes erfolgt wie unten beschrieben. Dieser Ansatz wurde nun in den Thermalcycler gegeben und in folgenden Schritten behandelt:

1. 50°C für 30 min
2. 94°C für 15 min
3. 93°C für 1 min
4. Anneallingtemp. °C 30 s
5. 72°C für 1 min
6. 72°C für 10 min

Ansatz:

0,5 µg RNA
5 µl Q-Solution Qiagen, Hilden

5	µl	5x Puffer	Qiagen, Hilden
1	µl	dNTP`5	Qiagen, Hilden
1	µl	Primer I	MWG biotech, Ebersberg
1	µl	Primer II	MWG biotech, Ebersberg
1	µl	PCR-Mix	Qiagen, Hilden
0,5	µl	RNAsin	Promega, Mannheim
add 25 µl H ₂ O			

Primer:

-NFAT2-RT-for:

5'-GTCCCACCACCGAGCCCACTACG-3'

-NFAT2-RT-rev:

5'-GACCATCTTCTTCCCGCCCACGAC-3'

Annealing 66°C, 31 Zyklen

-XS13-RT-for:

5'-GCAGCTGATCAATGGA-3

-XS-13-RT-rev:

5'-CTGGCTAAGTTGGTTGCTTT-3`

Annealing 50°C, 28 Zyklen

Calcineurin B-for:

5'-TGCCTGCCATCGCTGTTTCCTTCAA-3`

-Calcineurin B-rev:

5'-CCCCTCCCTTACCCACCCCCACAC-3`

Annealing 50°C, 29 Zyklen

Alle Primer wurden von der Fa. MWG biotech, Ebersberg bezogen.

Materialien:

PTC-200, Peltier thermal cyler

MJ Research, Boston, USA

2.3.4 Northern Blot Analyse

Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

20-30 µg RNA wurden mit Ethanol gefällt und in 16 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Zu den Proben wurden 5 µl Ladepuffer/Ethidiumbromid zugegeben und in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Agarosegel für 20 min in Denaturierungslösung und 45 min in 20× SSC inkubiert. Die Übertragung der RNA („blotten“) auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; Fa. Amersham Biosciences, München) erfolgte über Nacht durch einen Kapillartransfer in 20× SSC. Nach dem Transfer erfolgte eine Fixierung der RNA auf die Membran durch UV-Licht im „UV-Stratalinker™ 2400“ (Fa. Stratagene, Garden Grove, USA).

Materialien:

- Nylonmembran Hybond-N+ Amersham Biosciences, München
- UV-Stratalinker™ 2400 Stratagene, Garden Grove, USA

Reagenzien:

-Formaldehyd-Agarosegel (150 ml):

- | | | |
|--------|-------------------------------|------------------------------|
| 1,5 g | Agarose | Biozym Diagnostik, Oldendorf |
| 111 ml | H ₂ O (RNase frei) | |
| 15 ml | MOPS-Puffer | |
| 24 ml | Formaldehyd (37%, v/v) | |

-Laufpuffer für das Formaldehyd-Agarosegel:

- | | |
|----|-------------|
| 1× | MOPS-Puffer |
|----|-------------|

-Probenpuffer (1 ml):

- | | | |
|--------|------------------------|---------------------------------|
| 500 µl | Formamid (deionisiert) | Inno-Train Diagnostik, Kronberg |
| 167 µl | Formaldehyd (37%; v/v) | |
| 100 µl | MOPS-Puffer | |
| 233 µl | H ₂ O | |

-Ladepuffer/Ethidiumbromid:

- | | |
|--------|----------------|
| 100 µl | Ladepuffer |
| 10 µl | Ethidiumbromid |

-Ladepuffer:

- 1□ TAE-Puffer
- 50% Glycerin (v/v)
- 0,25% Bromphenolblau (w/v)

-50 □ TAE-Puffer:

- 2 M Tris/Acetat pH 7,8
- 50 mM EDTA pH 8

-10 □ MOPS-Puffer:

- 200 mM MOPS
 - 80 mM Natriumacetat
 - 10 mM EDTA
- pH 7 mit NaOH einstellen

-Denaturierungspuffer:

- 50 mM NaOH
- 10 mM NaCl

-20 □ SSC:

- 3 M NaCl
 - 300 mM Natriumcitrat
- pH 7 mit HCl einstellen

Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden für die Detektion der mRNA spezifischen Gene wurde das „MegaprimeTM DNA Labelling System“ (Fa. Amersham Biosciences, München) verwendet. Dabei wird ein genspezifisches DNA-Fragment mit Hilfe des Klenow-Enzyms mit [α -³²P] dCTP radioaktiv markiert. Nach der Markierung wurde die Sonde durch eine „NICKTM Column“ (Fa. Amersham Biosciences, München) von den nicht eingebauten Nukleotiden getrennt.

Materialien:

- MegaprimeTM DNA Labelling System Amersham Biosciences, München
- NICKTM Column Amersham Biosciences, München

Hybridisierung

Die Membran wurde über Nacht in Prähybridisierungspuffer bei 42°C vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und zum Prähybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 10 min mit 2× SSC/ 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit 0,2× SSC/ 0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht bei -80°C. Dazu wurden die Röntgenfilme „Cronex“ der Fa. AGFA, München verwendet.

Materialien:

- Röntgenfilme Cronex AGFA, München

Reagenzien:

-Prähybridisierungspuffer:

50%	Formamid deionisiert (v/v)	Inno-Train Diagnostik, Kronberg
6×	SSC	
5×	Denhardt's	
0,5%	SDS (w/v)	
50 mM	NaPO ₄	
100 µg/ml	tRNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
75 µg/ml	ssDNA (Lachs-Sperma-DNA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

-50× Denhardt's:

1%	Ficoll (w/v)
1%	Polyvinylpyrrolidon (w/v)
1%	BSA (w/v)

-20× SSC

3 M	NaCl
300 mM	Natriumcitrat

pH 7 mit HCl einstellen

2.4 Proteinanalysen

2.4.1 Proteinextraktion

Die Präparation erfolgte im Kühlraum, die Zentrifugation bei 4°C. Die Zellen wurden zunächst in kaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml kaltem 1x PBS in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 1600 rpm wurde das Zellpellet in 200 µl Puffer A aufgenommen, resuspendiert und 15 min im Kühlraum auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Zellen durch Nadelaspiration vollständig lysiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 6800 rpm wurde der Überstand (=cytoplasmatische Proteine) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Das Pellet (=Zellkerne) wurde in 50 µl Puffer B aufgenommen und die Proteine wurden 60 min auf einem Schüttler eluiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 14000 rpm wurde der Überstand (=nukleäre Proteine) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Reagenzien:

-Puffer A:

10 mM	Hepes pH 7,9
10 mM	KCl
0,1 mM	EDTA
0,1 mM	EGTA
0,1 mM	DTT

-Puffer B:

20 mM	Hepes pH 7,9
0,4 M	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 mM	DTT

-Proteinaseinhibitor:

Complete-Tabletten	Roche, Mannheim
--------------------	-----------------

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine gleiche Beladung bei der Größenfraktionierung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurde mittels der Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford (Bradford, 1976) der einzelnen Proben sichergestellt.

Dazu wurde ein kommerzieller Kit (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Die Extinktionsmessung fand mit einem automatischen UV-Spektrometer statt (LKB Biochrom 4060, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Materialien:

- | | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| - Bio-Rad protein assay | Bio-Rad, Hercules, USA |
| - LKB Biochrom 4060 | Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden |

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zum Auftrennen von Proteinen wurde die SDS-PAGE-Methode nach Lämmli (1970) angewendet. Dabei werden die Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses, der ihre Eigenladung annähernd kompensiert, nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. In einem niederprozentigen Sammelgel werden die Probenproteine zunächst konzentriert und gehen dann gemeinsam in das eigentliche Trenngel über. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird dabei der Proteingröße des nachzuweisenden Proteins angepasst: für 16-68 kDa 10% Acrylamid, für 36-94 kDa 7,5% Acrylamid, für 57-212 kDa 5% Acrylamid. Auf ein Gel (8x 6x 0,1cm) werden 10–20 µl Protein mit 5% 5x Lämmli aufgetragen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der BenchMark prestained Protein ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt. Die Laufzeit beträgt 1 h bei 30 mA.

Materialien:

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| -Gelelektrophoresekammern | Bio-Rad, Hercules, USA |
|---------------------------|------------------------|

Tabelle 2: Herstellungsschema für 7.5%ige SDS-Gele.

	Trenngel 7,5%	Sammelgel 7,5%
dest. Wasser	5,4 ml	0,8 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	325 μ l
40 % Acrylamid	2,0 ml	140 μ l
10 %ige SDS- Lsg.	100 μ l	12,5 μ l
10% APS	50 μ l	6,25 μ l
TEMED	5 μ l	1,25 μ l

-Trenngel (5 ml):

2,0 ml Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid; 29:1)
 1,3 ml Trenngelpuffer
 50 μ l 10% SDS (w/v)
 25 μ l 10% APS (w/v)
 2,5 μ l TEMED
 5,4 ml H₂O

-Sammelgel (1,25 ml):

140 μ l Acrylamid (Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid; 29:1)
 325 μ l Sammelgelpuffer
 12,5 μ l 10% SDS (w/v)
 6,25 μ l 10% APS (w/v)
 1,25 μ l TEMED
 0,8 ml H₂O

-Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

-Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

-5 μ l Lämmli-Puffer

225 mM Tris/HCl pH 6,8

50%	Glycerin (v/v)
5%	SDS (w/v)
0,02%	Bromphenolblau (w/v)
100 mM	DTT
-1 \square SDS-Laufpuffer:	
0,1%	SDS (w/v)
25 mM	Tris
200 mM	Glycin

2.4.4 Western Blot

Der Elektrotransfer von Proteinen auf proteinbindenden Oberflächen erfolgte mit dem "tank-blot"-System. Als proteinbindende Materialien wurden Nitrocellulosemembranen verwendet.

Tank-blotting

In einer Nass-Blotkammer „Criterion“ (BioRad, Hercules, USA) werden in Towbin's buffer getränkte Blottingpapiere, das Gel und die Membran wie folgt angeordnet und die Kammer mit Towbin's buffer aufgefüllt:

Kathode/ Blottingpapier in Towbin's buffer/ Gel/ Membran/ Blottingpapier in Towbin's buffer/ Anode

Der Transfer erfolgt bei 400 mA über Nacht bei 4°C.

Materialien:

-Tank Blotter	Bio-Rad, Hercules, USA
-Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel-Relliehausen

Reagenzien:

-Towbin's-Puffer (1l):	
200 ml	5 \square Salt
200 ml	Methanol

500 μ l 20% SDS (w/v)
 add 1 l H₂O
 -5 \square Salt:
 250 mM Tris
 2 M Glycin

Immunodetektion durch Chemolumineszenz

Nachdem die Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden, erfolgte eine Inkubation in Blockingpuffer für 1 h, um freie Bindungen der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Milchpulver/ TBST 1:500 verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Nachweis des Proteins erfolgt so durch Detektion der Peroxidasefunktion des Zweitantikörpers mit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Fa. Roche, Mannheim) über Chemolumineszenz durch die Röntgenfilme „Cronex“ der Fa. AGFA, München.

Primärantikörper (Verdünnung):

- anti-NFAT 2-AK (1:500)	Abcam, Cambridge, UK
- anti-c-Myc –AK (1:250)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
-anti-Calcineurin- AK (1:500)	Abcam, Cambridge, UK
-anti-Aktin-AK (1:1000)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
-anti-Lamin-AK (1.1000)	Cell Signaling, Danvers, USA

Reagenzien:

-Blockingpuffer:

5%	Milchpulver/TBST (v/v)
1x	TBST

-1 \square TBST-Puffer:

1x	TBS
0,1%	Tween \square (v/v) Serva Electrophoresis, Heidelberg

-10 \square TBS-Puffer:

1,4 M	NaCl
25 mM	KCl

250 mM Tris
pH 7,4 mit HCl einstellen

Sekundärantikörper:

-Anti-mouse-Antikörper IgG Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-Anti-rabbit-Antikörper IgG Amersham Biosciences, Aylesbury, Großbritannien

Materialien:

-Lumi-Light Western Blotting Substrate Roche, Mannheim
-Röntgenfilme „Cronex“ AGFA, München

2.5 DNA Pulldown Assay

Die Panc-1-Zellen wurden für eine Stunde mit 1 μ M CsA bzw. Ionomycin behandelt, bevor sie geerntet wurden. Für einen DNA-Pulldown-Assay wurden 100 μ g nukleäre Proteine für 3 h mit 1 μ g biotinyliertem doppelsträngigen Oligonukleotid, welches die NFAT-consensus Bindungssequenz (GGAAA) enthält, inkubiert. Den DNA-Proteinkomplexen wurden für 1h Streptavidin gekoppelte Agarose-beads hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Lysis-Puffer gewaschen und mittels Western Blot (siehe **2.4.4 Western Blot**) die DNA-gebunden Proteine detektiert.

Oligonukleotide:

-hum. Interleukin-2-Promoter: 5`-AGGAGGAAA~~AA~~ACTGTTTC-3`

Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. Biomers, Ulm bezogen.

Material:

-Streptavidin-Agarose-beads Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.6 Reporterassays

Für den Luciferase Reporter Assay wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 24-well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden 50-100 ng der entsprechenden Konstrukte in einem dreifach-Ansatz in die Zellen transfiziert. Dabei diente die Luciferase aus *Photinus pyralis* („Firefly“) als Reporter. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden 15 ng des „renilla“ Reporterkonstrukts, welches die Luciferase der *Renilla reniformis* exprimiert, kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 100 μ l 1x Passive-Lysis-Buffer (Fa. Promega, Mannheim) 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler lysiert. Das Zellgemisch wurde homogenisiert und bei 10000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und für den Luciferase-Assay weiterverwendet. 20 μ l des Lysats wurden für die Messung mit dem „Dual-Luciferase[®]-Reporter Assay“ (Fa. Promega, Mannheim) eingesetzt. Dabei wurden die unterschiedlichen Substrate der zwei Luciferase-Enzyme nacheinander zugegeben und die Luciferase-Aktivität im Luminometer „Luminat LB 9501“ (Fa. Berthold Laboratories, Mannheim) gemessen. Die „Firefly“-Aktivität entspricht der Induktion des Promotorkonstrukts. Durch die Quotientenbildung mit dem „Renilla“-Wert wird die Transfektionseffizienz normalisiert. Die Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Mittelwerte der Dreifachansätze wurden mit Berechnung der Standardabweichung dargestellt.

Um siRNA transient zu transfizieren, wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6-well Platten ausgesetzt, diese zunächst mit den siRNA Oligonukleotiden transfiziert. Erst beim anschließenden Mediumwechsel wurde die Reportertransfektion mit 100-200 ng Konstrukt und 15 ng Renillareporterkonstrukt durchgeführt. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der siRNA Oligonukleotide wiederholt.

Reagenzien:

-Renilla:

1,1 M	NaCl
2,2 mM	(Na ₂)EDTA
0,22 M	K ₃ PO ₄ (pH 5,1)
0,44 mg/ml	BSA
1,3 mM	NaN ₃
1,43 μ M	Coelenterazin (Isopropanol)
auf pH 5,0 einstellen	

-Luciferase:

20 mM	Tricine
1,07 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ 5H ₂ O
2,67 mM	MgSO ₄
0,1 mM	EDTA
33,3 mM	DTT
270 μM	Coenzym A
470 μM	D-Luciferin
530 μM	ATP

auf pH 7,8 mit NaOH einstellen

Lagerung unter Lichtabschluss bei -70°C.

Materialien:

-Messgerät Centro LB 960	Berthold Technologies, Mannheim
-24-well Kulturplatten	Becton & Dickinson, Heidelberg
-6-well Kulturplatten	Becton & Dickinson, Heidelberg

2.7 Funktionelle Assays

2.7.1 Proliferationsassays

Die Zellen wurden in einer 24-Well Platte in Medium (10 % Serum) ausgesetzt. Nach 24 h Stunden wurden sie, je nach Ansatz transfiziert bzw. pharmakologisch stimuliert. Nach weiteren 24 h wurden 0,5 μ Ci/ml Thymidin hinzugefügt. Nach 5 h wurde nun das Medium abgesaugt und die Wells dreimal mit 5%-igem TCA (w/v) gewaschen. Anschließend wurde für 30 min in 500 μ l 1 M NaOH inkubiert.

Schließlich wurde die Zellsuspension mit 5 ml Szintillationscocktail (Fa. Packard, Dreieich) in Szintillationsröhrchen überführt und im β -Counter (pharmacia wallac 1410, Fa. Wallac, Freiburg) gemessen.

Materialien:

-24-well-Platte	Greiner, Frickenhausen
- β -Counter, pharmacia. wallac 1410	Wallac , Freiburg

Reagenzien:

-Elutionslösung:

1 M NaOH

-Szintillationsflüssigkeit:

Packard 299 mit 8ml 50% TCA/l Lösung Packard, Dreieich

2.7.2 Durchflusszytometrien

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert und zur Fixierung mit 70% EtOH mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Aufbereitung wurden die Proben einmal mit 1x PBS gewaschen und bei 1500 rpm 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 μ l Puffer B gelöst, 10 min unter 100 rpm bei Raumtemperatur inkubiert, 350 μ l Puffer C hinzugegeben und wiederum 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden an „FACSCalibur“ Durchflusszytometer mittels CellQuest Software gemessen und mittels der „ModFit LT for MC V2.0 Software“ ausgewertet.

Material:

-FACSCalibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
-CellQuest	Becton & Dickinson, Heidelberg
-ModFit LT for MC V2.0	Verity Software House, Topsham, USA

Reagenzien:

-Puffer B:

175 mg/ml Trypsininhibitor Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

35 mg/ml Ribonuklease A Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

pH 7,6

-Puffer C:

208 mg/ml Propidiumiodid Sigma-Aldrich, , St. Louis, USA

580 mg/ml Spermintetrahydrochlorid Sigma-Aldrich, , St. Louis, USA

auf pH 7,6 einstellen

2.8 Statistische Methoden

Häufigkeiten wurden in dieser Arbeit deskriptiv-statistisch als Balkendiagramme wiedergegeben. Die durchgeführten Reporter- und Proliferationsassays wurden jeweils dreimal in dreifach Ansätzen durchgeführt und von diesen Ansätzen wurden jeweils die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur *in vitro* Expression von NFAT2 in Pankreaskarzinomzelllinien

Zunächst wurden Untersuchungen zur Expression von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen durchgeführt. Dabei wurde die Expression von NFAT2 in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzellen sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene untersucht. Zu diesen Untersuchungen standen folgende Zelllinien zu Verfügung:

Panc-1, ASPC-1, S-028, IMIM PC-1, IMIM PC-2, TD-1 und TD-2.

3.1.1 Erhöhte NFAT2 mRNA-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Die Expression von NFAT2 auf mRNA-Ebene wurde mittels RT-PCR unter Verwendung der in **2.3.2 Reverse Transkriptase-PCR** angegebenen Primer verifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 4** dargestellt und belegen den Nachweis einer NFAT2 Expression in allen untersuchten Zelllinien. Dabei unterliegt die mRNA Expression von NFAT2 allerdings starken Schwankungen, eine besonders starke Expression ließ sich in den Zelllinien Panc-1 und TD-2 nachweisen.

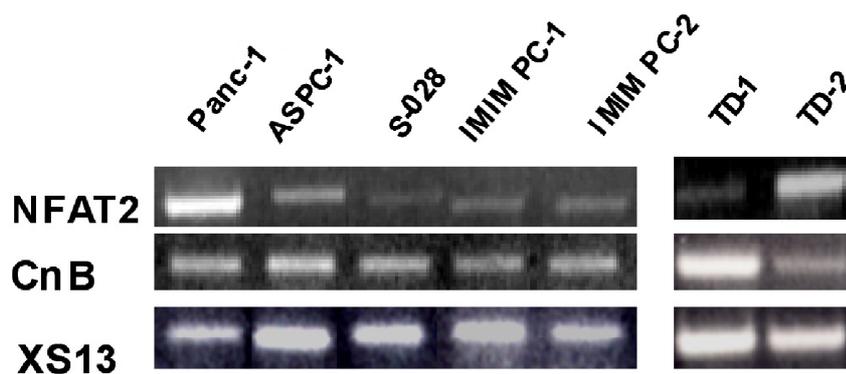


Abbildung 4: RT-PCR zum Nachweis von NFAT2 bzw. Calcineurin (CnB) mRNA in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. Es zeigt sich in allen Zelllinien eine deutliche Expression für NFAT 2 und dessen Aktivator Calcineurin. XS 13 als Housekeepinggen.

3.1.2 Erhöhte NFAT2-Protein Expression in Pankreaskarzinomzellen

Die Proteinexpression von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf mRNA Ebene konnte NFAT2 in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Die stärkste Expression von NFAT2 wurde in den Zelllinien Panc-1, ASPC-1, IMIM PC-2 und TD-2 gefunden. Diese Zelllinien wurden deshalb auch für weitere Versuchsansätze herangezogen. Interessanterweise konnten mit dem verwendeten Antikörper jeweils drei Bande für NFAT2 detektiert werden, diese entsprechen den unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien des Proteins. Der untere Blot zeigt die endogene Expression der Phosphatase Calcineurin (CnB) an, die einen zentralen Aktivator von NFAT darstellt.

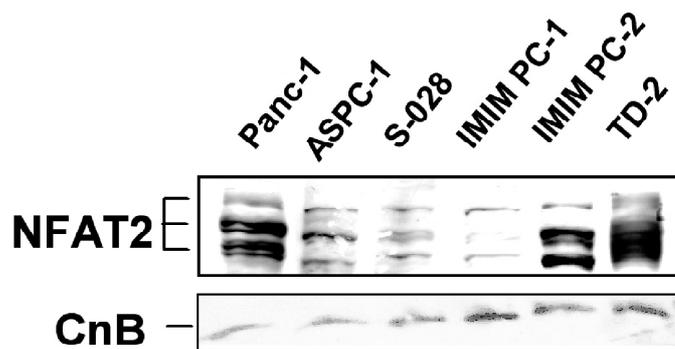


Abbildung 5: Western Blot Analysen zum Nachweis von NFAT2 und Calcineurin (CnB) in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. Die stärkste Expression von NFAT2 wurde in den Zelllinien Panc-1, ASPC-1, IMIM PC-2 und TD-2 detektiert.

3.2 Funktionelle Untersuchungen zur Aktivität des Calcineurin/ NFAT 2 Signalweges in Pankreaskarzinomzellen

3.2.1 Pharmakologische Hemmung von Calcineurin resultiert in einer Re-phosphorylierung und einem nukleären Export von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen

Die Aktivität von NFAT2 wird primär über seine zelluläre Lokalisation reguliert. Diese ist wiederum direkt vom NFAT2-Phosphorylierungsstatus und damit von der Interaktion mit Phosphatasen oder Kinasen abhängig. Calcineurin ist der stärkste bislang beschriebene Aktivator von NFAT2, der durch Dephosphorylierung von 13 Serinresten eine nukleäre Translokation von NFAT2 gestattet. Diese wichtige Interaktion zwischen NFAT2 und Calcineurin kann durch das Pharmakon Cyclosporin A (CsA) gehemmt werden. Tatsächlich bindet zytoplasmatisches CsA an Calcineurin und verhindert hierüber die physikalische Interaktion mit NFAT2. Die Folge dieser in Lymphozyten beschriebenen Interaktion ist Hemmung des nukleären Imports von NFAT2. Bereits nukleäres NFAT2 wird hingegen entsprechend der in einer Zelle vorhandenen NFAT-Kinasenaktivität re-phosphoryliert und anschließend aus dem Zellkern exportiert. Dieser Regelmechanismus wurde in Lymphozyten beschrieben und dauert hier ca. 20 min.

Es wurde also zunächst untersucht, ob NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen primär zytoplasmatisch oder nukleär lokalisiert ist und ob die zelluläre Lokalisation von NFAT2 durch Calcineurin reguliert wird. Hierzu wurden Panc-1 Zellen in serumhaltigem Medium kultiviert und dann entweder in diesem Medium belassen oder zusätzlich mit 1 μ M CsA behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und zytoplasmatische und nukleäre Extrakte der Proben angefertigt. Diese Proben wurden dann im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Gehalt von NFAT2 im Western Blot überprüft. **Abbildung 6** zeigt, dass NFAT2 im Zellkern kultivierter Pankreaskarzinomzellen in aktiver (dephosphorylierter) Form vorliegt und dass Hemmung von Calcineurin mit einer Re-Phosphorylierung und Translokation ins Zytoplasma assoziiert ist. Dieser „shift“ ins Zytoplasma erfolgt sehr rasch (30 min) und reflektiert den durch Kinasen induzierten nukleären Export von NFAT2.

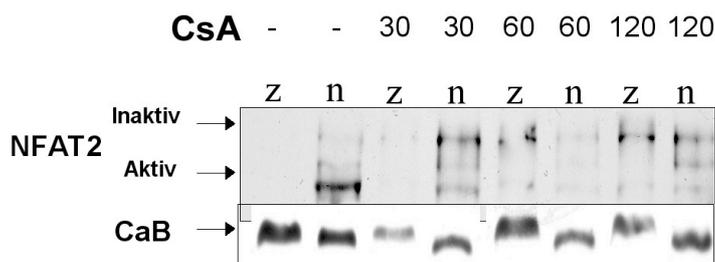


Abbildung 6: *Western Blot aus zytoplasmatischen (z) und nukleären (n) Zellextrakten (Panc-1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach CsA-Behandlung (1 μ M). Gemessen wurde nach jeweils 30, 60 und 120 min. Man erkennt innerhalb von 30 min einen „shift“ von primär aktiviertem, nukleär lokalisiertem NFAT2 in den unbehandelten Proben (Spuren 1 und 2), zu seiner deaktivierten Form (Spuren 3 und 4). Danach erfolgt im Zeitverlauf eine Translokation des inaktivierten NFAT2 ins Zytoplasma (Spuren 5, 6 und 7).*

3.2.2 Gesteigerte NFAT2 DNA-Bindung in Pankreaskarzinomzellen

Um die Aktivität von NFAT2 zu überprüfen, wurde als nächstes die DNA-Bindung von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen untersucht. Hierfür wurde der proximale Promotorabschnitt des humanen Interleukin-2-Gens herangezogen, der ein bekanntes „Target“ von NFAT2 darstellt und eine perfekte Konsensusbindungssequenz (GGAAA) beinhaltet. Die DNA-Bindung von NFAT an dieser Zielsequenz wurde mittels DNA-Pulldown untersucht. Zunächst wurden Panc-1 Zellen mit 1 μ M CsA über 30 min, mit 1 μ M Ionomycin über 15 min bzw. mit einer Kombination aus einer CsA Behandlung, gefolgt von einer Ionomycin Behandlung versetzt. Die DNA-Protein-Komplexe aus nukleären Extrakten aus diesen Proben wurden mit Streptavidin-Agarose-beads präzipitiert und einer Western Blot-Analyse zum Nachweis von gebundenem NFAT2 zugeführt. **Abbildung 7** zeigt, dass in Analogie zu den Lokalisationsstudien die Calcineurin-induzierte Aktivierung von NFAT2 in einer gesteigerten Promotorbindung mündet. Die NFAT2-DNA-Bindung konnte andererseits durch Hemmung der Calcineurin/ NFAT2 Achse unterbunden werden.

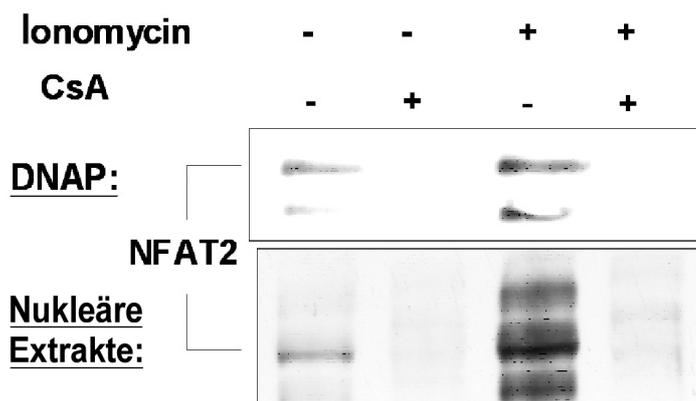


Abbildung 7: Sowohl die nukleäre Translokation von NFAT2 (unten), als auch die DNA-Bindungsaktivität (oben), werden durch Ionomycin gesteigert (Spur 3) und durch CsA komplett geblockt (Spuren 2 und Spur 4). Der Vergleich zwischen Spur 4 und Spur 1 zeigt, dass auch die basale Expression von NFAT2 durch CsA gehemmt wird. Obere Reihe: DNAP=DNA pull-down. Untere Reihe: Western Blot für NFAT2 aus nukleären Extrakten.

3.2.3 Pharmakologische Hemmung bzw. Aktivierung reguliert die transkriptionelle Aktivität von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen

Desweiteren wurde untersucht, ob NFAT2 Expression durch Calcineurin Überexpression induzierbar ist.

Hierzu wurden Reporterassays (Luciferaseassays) unter Verwendung eines artifiziellen NFAT-responsiven Reporter-Promotorkonstruktes durchgeführt. Panc-1 Zellen wurden mit diesem Reporterplasmid (NFAT-Luc) transient transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität in Abhängigkeit der Calcineurinaktivität gemessen. Dabei wurde in der Auswertung die basale Aktivität von NFAT2 in der unbehandelten Kontrollgruppe als „1“ gesetzt und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle angegeben.

Die Versuche wurden jeweils in dreifach- Ansätzen und mehrmals durchgeführt.

In verschiedenen Ansätzen wurde ein konstitutiv aktives (c.a.) Calcineurin-Expressionskonstrukt oder ein dominant negatives (d.n.) pNFAT2-Konstrukt co-

transfiziert bzw. pharmakologisch mit 0,5 M bzw. 1 μ M CsA oder/ und 1 μ M Ionomycin behandelt.

Es zeigt sich eine deutliche Aktivitätszunahme von NFAT2, sowohl nach co-Transfektion von Calcineurin (3-fach), als auch nach pharmakologischer Behandlung mit Ionomycin (mehr als 4-fach), einem bekannten pharmakologischen Aktivator von Ca^{2+} und Calcineurin. Diese Aktivität lässt sich dann durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von CsA bis auf 50% mindern. Durch die alleinige Zugabe von dominant negativem, also inaktivem NFAT2, lässt sich eine Aktivitätsabnahme auf bis zu 50% im Vergleich zur Kontrolle erzielen, was impliziert, dass aktives NFAT2 für mindestens die Hälfte der gesamten NFAT Signalaktivität verantwortlich ist.

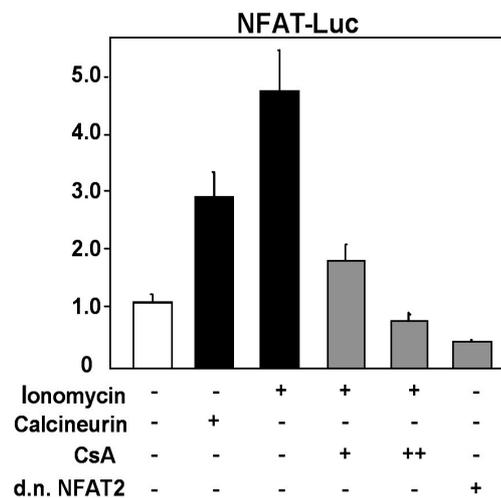


Abbildung 8: Reporterassay unter Verwendung eines cis-NFAT-Luciferasekonstruktes. Panc-1 Zellen wurden mit einem cis-NFAT-Luciferasekonstrukt transient transfiziert. Die verschiedenen Ansätze wurden mit c.a. Calcineurin bzw. d.n. pNFAT2 co-transfiziert. Die Aktivität von endogenem NFAT2 wurde mittels CsA oder Ionomycin reguliert. Man erkennt sowohl nach co-Transfektion von c.a. Calcineurin (2. Säule), als auch nach pharmakologischer Behandlung mit dem Aktivator Ionomycin (3. Säule) eine deutliche Aktivitätszunahme von NFAT2. Analog erkennt man nach co-Transfektion mit d.n. pNFAT2 (6. Säule) bzw. nach pharmakologischer Hemmung mit CsA (4. und 5. Säule) eine Aktivitätsminderung von NFAT2. Die basale Aktivität der Kontrollgruppe wurde gleich „1“ gesetzt (1. Säule). Ionomycin: + = 0,5 M; CsA: + = 0,5 M; ++ = 1 M;

3.3 Einflüsse des Calcineurin/ NFAT 2 Signalweges auf Tumorprogression und Zellzyklus

3.3.1 Pharmakologische Hemmung des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges durch CsA und FK 506 resultiert in Proliferationshemmung

Die Veränderungen im Proliferationsverhalten der verschiedenen Kulturen wurden mittels Thymidin-Proliferationsassays quantifiziert. Panc-1 Zellen wurden mit verschiedenen pharmakologischen Gegenspielern von Calcineurin, nämlich 1 μM CsA oder 0,1 μM FK 506, über 24 h behandelt. Die vorbehandelten Proben wurden mit 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ Thymidin versetzt, nach weiteren 24 h geerntet und die radioaktive Aktivität im β -Counter gemessen. Hierbei wurde die Aktivität der unbehandelten Kontrolle gleich 100% gesetzt und die pharmakologisch behandelten Ansätze in prozentueller Abweichung hiervon dargestellt. In beiden mit den Calcineurin-Inhibitoren behandelten Ansätzen konnte eine Reduktion der Aktivität und damit der Zellproliferation auf unter 50% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (**Abbildung 9**).

In der **Abbildung 10** sieht man die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von CsA (0,5M bzw. 1M) auf die Proliferation der Tumorzellen im Pankreaskarzinom. Man erkennt mit steigender CsA-Konzentration eine größere Reduktion der absoluten Zellzahl in den verschiedenen Ansätzen, nach 48 h bis zur Hälfte des entsprechenden Wertes in der Kontrolle.

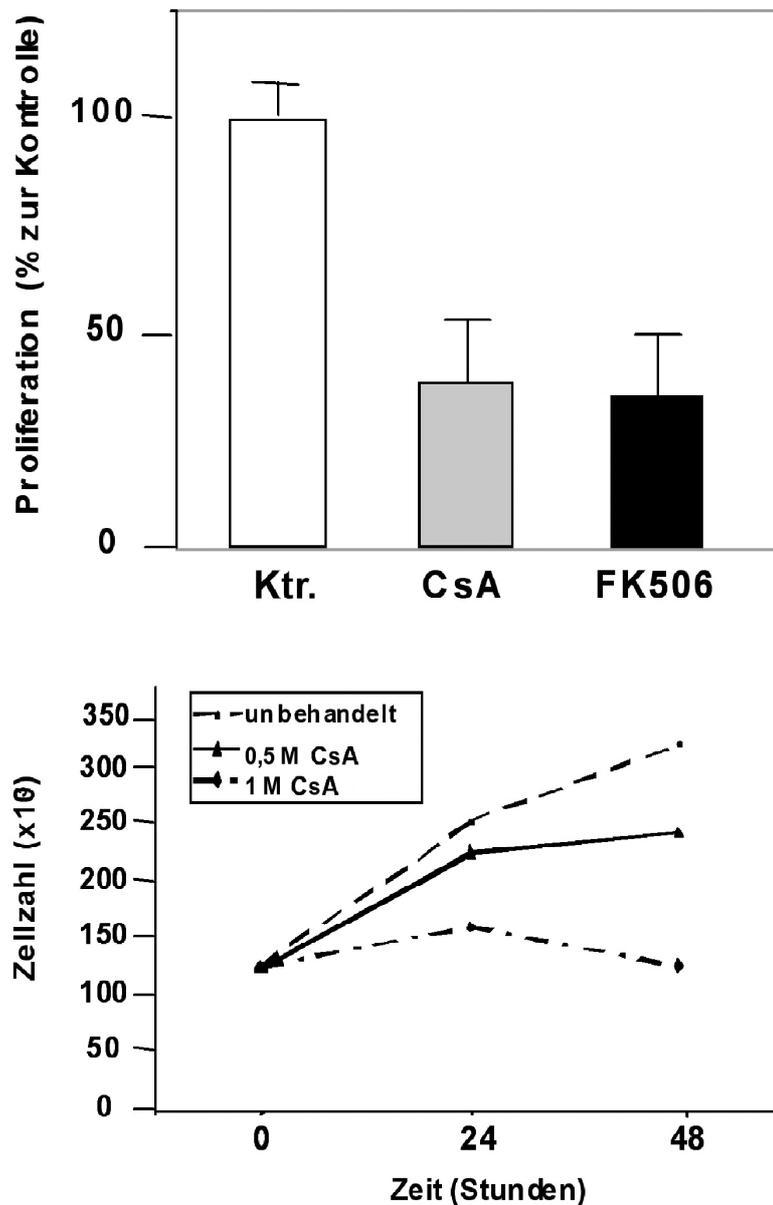


Abbildung 9 und 10: Thymidinproliferationsassay mit unbehandelter Kontrolle (1. Säule) und jeweils mit 1 μM CsA (2. Säule) oder 0,1 μM FK 506 (3. Säule) behandelten Proben (obere **Abbildung 9**). Man erkennt eine Reduktion der proliferierenden Zellen der behandelten Proben auf unter 50%.

In der unteren **Abbildung 10** erkennt man sowohl eine Zeit- (24 h bzw. 48 h), als auch eine Dosisabhängigkeit (0,5 M bzw. 1 M) der Reduktion der absoluten Zellzahl für CsA-Behandlung.

3.3.2 Pharmakologische Hemmung von Calcineurin resultiert in Zellzyklusarrest

Hierbei wurde mittels Durchflusszytometrien die Verteilung der Zellen verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus untersucht. Die hier verwendeten Zelllinien waren Panc-1, ASPC-1, TD-2 und Imim PC-2. Die Zellen wurden 24 h nach pharmakologischer Behandlung mit CsA mit Propidiumiodid markiert, im „FACSCalibur“ Durchflusszytometer gemessen und die zelluläre Distribution im Zellzyklus mittels „CellQuest“ und „ModFit LT for MC V2.0“ Software ausgewertet.

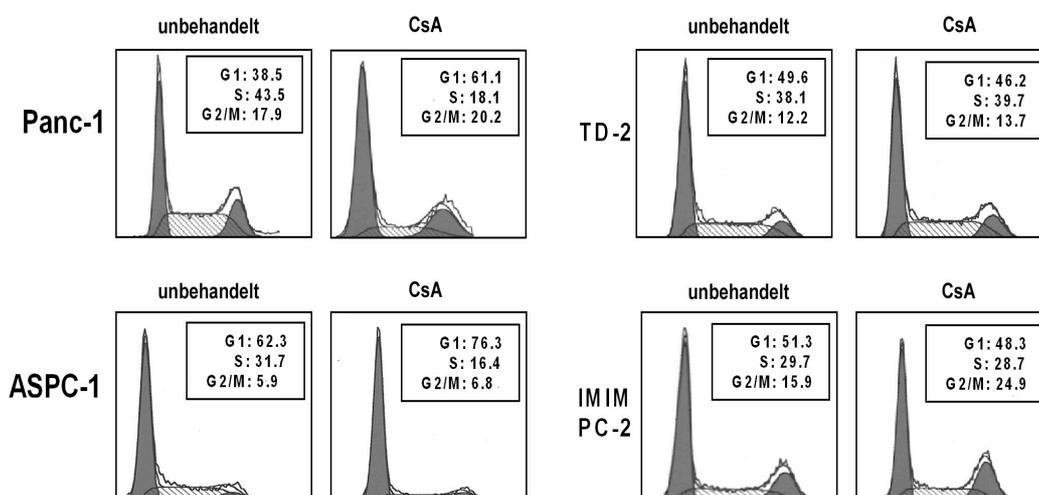


Abbildung 11: Durchflusszytometrien verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien. Die linken Diagramme zeigen jeweils die unbehandelte Kontrolle, die rechten Diagramme das Verhalten nach pharmakologischer Inhibition des Calcineurin/ NFAT2 Signalweges mit 1 μ M CsA. Man erkennt nach Hemmung von Calcineurin durch CsA ein signifikant gesteigertes Verharren der Panc-1 und ASPC-1 Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. In IMIM PC-2 und TD-2 Zellen kann man diesen Effekt nicht beobachten. Die Zahlenwerte spiegeln die prozentuelle Verteilung der Zellen in die jeweiligen Phasen des Zellzyklus wieder.

In diesen Untersuchungen zeigte sich (analog zu den Proliferationsassays) in den Zelllinien Panc-1 (plus 20 Prozentpunkte im Vergleich zur Kontrolle) und ASPC-1 (plus 13

Prozentpunkte im Vergleich zur Kontrolle), unter Inhibition von Calcineurin durch 1 μ M CsA, ein signifikant gesteigertes Verharren der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

In zwei der untersuchten Zelllinien (IMIM PC-2, TD-2) blieb die Rate der sich in der G1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen durch die Behandlung mit Calcineurin allerdings unbeeinflusst.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TD-2 und IMIM PC-2 Zellen eine chromosomale Amplifikation des c-Myc Gens, welches ein bekanntes Onkogen der Pankreas darstellt, besitzen. Da diese Amplifikation hingegen nicht in Panc-1 und ASPC-1 Zellen vorhanden ist, ergab sich die Hypothese, dass die Resistenz der nicht-responsiven Zelllinien Folge dieser c-Myc Amplifikation ist und das c-Myc folglich ein mögliches „downstream-Target“ von NFAT2 darstellen könnte.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde zunächst die Regulierbarkeit der endogenen c-Myc Expression in obigen Zelllinien unter CsA-Behandlung überprüft.

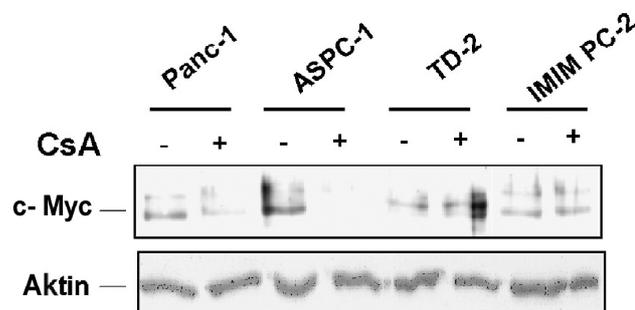


Abbildung 12: Western Blot Analyse für c-Myc. Man erkennt in Panc-1 (Spur 1 und 2) und ASPC-1 (Spur 3 und 4) Zellen nach Behandlung mit 1 μ M CsA jeweils eine deutliche Abnahme der Bande für c-Myc im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In IMIM PC-2 (Spur 7 und 8) und TD-2 Zellen (Spur 5 und 6) ändert sich die Stärke der Bande nach CsA Behandlung allerdings nicht, die endogene c-Myc Expression bleibt von der Hemmung des Calcineurin/ NFAT2 Signalweges unbeeinflusst. Untere Reihe: Aktin als Ladekontrolle.

In allen vier untersuchten Zelllinien ergab sich ein vergleichbarer Level basaler c-Myc Expression. Durch pharmakologische Behandlung mit CsA nahm die Expression in Panc-1 und ASPC-1-Zellen signifikant ab. In IMIM PC-1 und TD-2-Zelllinien konnte man hingegen keine Reduktion der endogenen Expression von c-Myc beobachten (siehe **Abbildung 12**).

3.4 Die Auswirkungen der Hemmung des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges auf den Zellzyklus werden über NFAT2 Aktivierung reguliert

Um zu zeigen, ob diese durch pharmakologische Hemmung des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges resultierende Hemmung der Proliferation und der Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus über eine Hemmung der NFAT2 Expression reguliert wird, oder ob dieser Effekt auf Interaktion von Calcineurin mit z.B. anderen Mitgliedern der NFAT-Transkriptionsfamilie oder anderen Transkriptionsfaktoren basiert, wurden siRNA Knockdown Experimente (RNA Interferenz-Methode) zum Nachweis einer NFAT2-Spezifität dieses Phänomens durchgeführt. Die siRNAs sind kurze, 21-23 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs. Wenn eine Hälfte von ihnen komplementär zu einer aktiven mRNA ist, dann verbindet sie sich mit ihr (RISC-Komplex). Das wiederum führt dazu, dass diese mRNA durch Ribonuklease H abgebaut wird, oder doch zumindest an der Translation gehindert wird. Man nennt diese Hemmung antisense-mediated inhibition (antisense, weil ein kurzes Stück der auszuschaltenden mRNA zu ihr komplementär ist).

Als Vorversuch wurden Panc-1 Zellen zunächst mit unterschiedlichen si-RNA Sequenzen für NFAT2 (siehe **1.2 Transfektion der Zellen**) transient transfiziert und die Zelllysate nach 48 h im Western Blot auf NFAT2 Expression untersucht. Als Kontrolle diente eine „silencer negative control“.

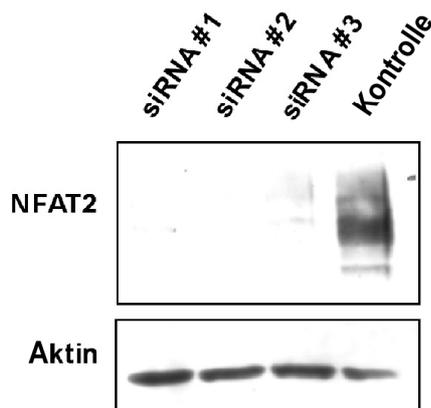


Abbildung 13: *Western Blot: 48h nach Transfektion mit unterschiedlichen siRNA (silencerRNA)-Sequenzen Spur (1,2 und 3) zeigte sich in allen Proben eine deutlich geringere Expression für NFAT2 (nuclear factor of activated T-cells) im Vergleich zur Kontrolle (Spur 4).*

3.4.1 Repression der NFAT2 Expression mittels RNA Interferenz-Methode bewirkt Proliferationshemmung im Pankreaskarzinom

Analog zu den Versuchen mit pharmakologischer Hemmung der Calcineurin/NFAT2 Achse (siehe **3.3.1 Pharmakologische Hemmung des Ca^{2+} /Calcineurin Signalweges durch CsA und FK 506 resultiert in Proliferationshemmung**) wurde das Proliferationsverhalten von Panc-1 Zellen unter Repression der endogenen NFAT2 Expression mittels der RNA Interferenz-Methode (siRNA) in Thymidinassays untersucht. Die mit siRNA transient transfizierten Zellen wurden mit 0,5 μ Ci/ml Thymidin inkubiert, nach 24 h geerntet und die radioaktive Aktivität im β -Counter gemessen.

Die Proliferationsraten der Kontrollen wurden gemittelt und gleich 100% gesetzt, die Abweichungen der Versuchsansätze mit reprimiertem NFAT2 in prozentueller Abweichung davon dargestellt.

Es ergab sich dabei in allen mit unterschiedlichen siRNA Sequenzen transient transfizierten Ansätzen eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf bis zu unter 20% der Kontrolle.

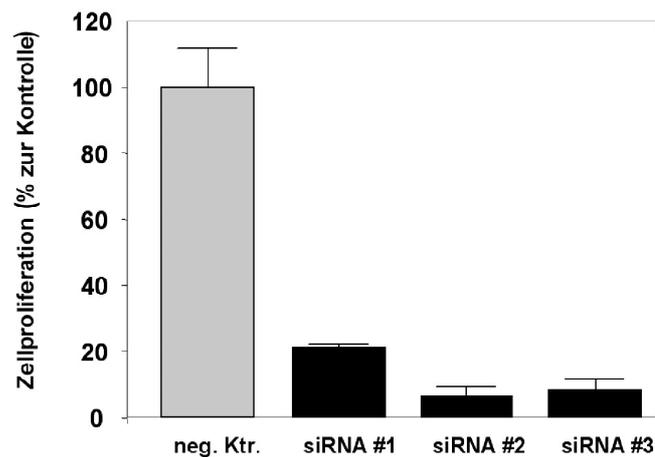


Abbildung 14: Untersuchung des Proliferationsverhaltens siRNA (silencerRNA) transfizierter Panc-1 Zellen im Thymidinassay, in Relation zur Kontrolle (Säule 1) gesetzt. Als Kontrolle wurde eine „silencer negative control“ transfiziert. Man sieht in den Ansätzen der mit den unterschiedlichen siRNA Sequenzen transfizierten Zellen jeweils eine deutlich reduzierte Proliferationsrate der Zellen (Säulen 2, 3 und 4). Kontrolle gleich 100%. Neg. Ktr. = negativ Kontrolle.

3.4.2 Repression der NFAT2 Expression mittels RNA Interferenz-Methode bewirkt Zellzyklusarrest

Im nächsten Schritt wurde die zelluläre Verteilung in die Zellzyklusphasen unter Ausschaltung von NFAT2 in Durchflusszytometrien überprüft. Hier konnte, in Analogie zur CsA-Hemmung (siehe **3.3.2 Pharmakologische Hemmung von Calcineurin resultiert in Zellzyklusarrest**), ein gesteigertes Verharren der Zellen mit reprimierter endogener NFAT2-Expression in der G1-Phase des Zellzyklus, beobachtet werden. Dabei konnte eine Steigerung der Rate der sich im Zellzyklusarrest befindlichen Zellen um fast 20 Prozentpunkte im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden.

Panc-1 Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit siRNA mit Propidiumiodid markiert, im „FACSCalibur“ Durchflusszytometer gemessen und die zelluläre Distribution im Zellzyklus mittels „CellQuest“ und „ModFit LT for MC V2.0“ Software ausgewertet.

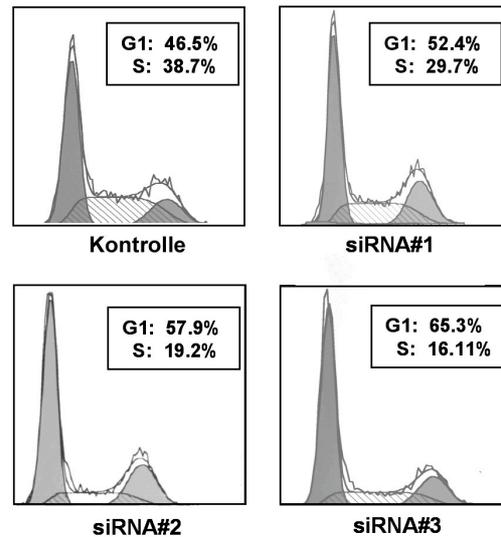


Abbildung 15: Durchflusszytometrien von Panc-1 Zellen, 24 h nach transientscher Transfektion mit KontrollsiRNA (links oben) oder verschiedenen siRNA Klonen für NFAT2. In Analogie zur pharmakologischen Hemmung des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges erkennt man im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant gesteigertes Verharren der Zellen mit ausgeschaltetem NFAT2 in der G1-Phase des Zellzyklus. Kontrolle: „silencer negative control“.

3.5 Der aktivierte Ca^{2+} / Calcineurin/ NFAT2 Signalweg reguliert die endogene c-Myc Expression

3.5.1 Die endogene Expression von c-Myc ist in Zellen mit reprimiertem NFAT2 durch pharmakologische Stimulation mit Ionomycin geringer induzierbar

Um zu überprüfen, ob die Induktion der c-Myc Expression spezifisch durch einen aktiven Ca^{2+} / Calcineurin/ NFAT2 Signalweg reguliert wird, wurde in Panc-1 Zellen mittels RNA Interferenz-Methode die endogene NFAT2 Expression reprimiert, nach 24 h mit 1 μ M Ionomycin stimuliert und eine Western Blot Analyse der Zelllysate zu verschiedenen Zeitpunkten (2 h bzw. 6 h) durchgeführt.

Man beobachtete in den Kontrollen einen „shift“ von phosphoryliertem, inaktivem NFAT2 zu dephosphoryliertem, aktiviertem NFAT2, mit einem Maximum nach 6 h. Gleichzeitig bildete sich eine stärkere Bande für c-Myc aus.

In den Ansätzen mit Zellen, deren NFAT2 Expression reprimiert wurde, nimmt die c-Myc Expression nach Ionomycinbehandlung im Zeitverlauf ebenfalls zu, jedoch in deutlich schwächerer Ausprägung als in der Kontrolle.



Abbildung 16: *Western Blot Analyse des NFAT2 Knock-down Effektes auf die c-Myc Expression in Panc-1 Zellen 2 h (Spur 3 und 4) und 6 h (Spur 5 und 6) nach Ionomycinbehandlung (1 μ M). Im unteren Feld erkennt man in den Kontrollen einen „shift“ von phosphoryliertem, inaktiven NFAT2 zu dephosphoryliertem, aktivem NFAT2, mit einem Maximum nach 6 h (Spur 5). Im oberen Feld erkennt man in der Kontrolle eine sich synchron zur NFAT2 Aktivierung ausbildende Bande für c-Myc. In den mit siRNA transient transfizierten Ansätzen (Spuren 2, 4 und 6) bildet sich im Zeitverlauf nach Ionomycinstimulation ebenfalls eine stärkere Bande für c-Myc aus, jedoch in weniger ausgeprägter Form als in der Kontrolle. Aktin als Ladekontrolle.*

3.5.2 Verlust der regulatorischen Wirkung des Ca^{2+} / Calcineurin/ NFAT2 Signalweges bei vorbestehender c-Myc Überexpression

Um die Hypothese, dass die Resistenz auf CsA-Behandlung der nicht-responsiven Zelllinien auf einer c-Myc Amplifikation beruht, wurden in weiteren Versuchen die endogene Expression von c-Myc und NFAT2 nach pharmakologischer Inhibition des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges durch CsA und die Auswirkungen dieser Inhibition auf den Zellzyklus untersucht.

So konnte man im Western Blot aus zellulären Extrakten eine gleichzeitige Abnahme der endogenen Expression von NFAT2 und c-Myc unter pharmakologischer Behandlung mit CsA, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, beobachten.

Durch Transfektion eines c-Myc Expressionskonstruktes wurde eine artifizielle Überexpression von c-Myc erzeugt, welche sich durch gleichzeitige Behandlung mit CsA kaum hemmen ließ. Durch diese artifizielle Überexpression von c-Myc wurden ähnliche Verhältnisse wie in den Zelllinien mit bekannter c-Myc Amplifikation (IMIM PC-2 und TD-2) (siehe **3.3.2 Pharmakologische Hemmung von Calcineurin resultiert in Zellzyklusarrest**) erzeugt.

In Durchflusszytometrien mit den gleichen Versuchsansätzen konnte man in Zellen mit normaler, basaler c-Myc Expression eine Induktion von Zellzyklusarrest beobachten. In Zellen mit vorbestehender c-Myc Überexpression ging diese Induzierbarkeit des Zellzyklusarrestes praktisch verloren.

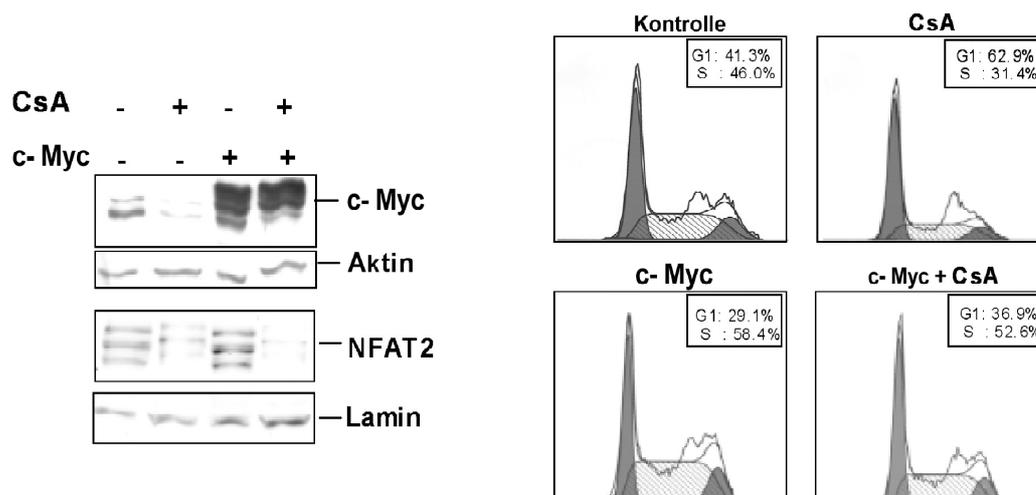


Abbildung 17 und 18: Western Blot aus zellulären Extrakten (linke **Abbildung 17**). Man erkennt nach CsA-Behandlung (Spur 2) eine synchrone Abnahme der Aktivität für NFAT2 (unteres Feld) und für c-Myc (oberes Feld). Nach Transfektion eines c-myc Expressionskonstruktes (Spuren 3 und 4) entsteht eine deutliche, CsA-resistente Überexpression von c-Myc (Spur 4), bei gleichzeitiger Abnahme der NFAT2 Expression. Aktin und Lamin als Ladekontrollen. Analog dazu erkennt man in der Durchflusszytometrie (rechte **Abbildung 18**) einen durch CsA induzierten Zellzyklusarrest (rechtes oberes Feld), welcher bei vorbestehender artifizieller c-Myc Überexpression kaum noch induzierbar ist (rechts unteres Feld).

3.5.3 Aktivierung des Ca²⁺/ Calcineurin/ NFAT2 Signalweges im Pankreaskarzinom steigert die Proliferation über c-Myc Induktion

Um die spezifische Regulation der c-Myc Expression und die Auswirkungen auf den Zellzyklus durch einen aktivierten Ca²⁺/ Calcineurin/ NFAT2 Signalweg zu überprüfen, wurden Experimente, unter Repression der endogenen c-Myc Expression mittels der RNA Interferenz-Methode (siRNA), an Panc-1 Zellen durchgeführt.

Im Western Blot aus zellulären Extrakten konnte, unter pharmakologischer Stimulation des Ca²⁺/ Calcineurin/ NFAT2 Signalweges mittels Ionomycin, eine gleichzeitige Induktion der endogenen Expression von NFAT2 und c-Myc beobachtet werden. Im gleichen Versuch an Zellen mit mittels transient transfizierter siRNA reprimierter c-Myc Expression war zwar eine gesteigerte NFAT2 Expression zu beobachten, eine Expressionszunahme von c-Myc ließ sich im Gegensatz zu den Ansätzen mit unbehandelten Panc-1 Zellen jedoch nicht erzeugen.

Analog dazu und zu den Ergebnissen zum Einfluss von NFAT2 auf den Zellzyklus (siehe **3.4.2 Repression der NFAT2-Expression mittels RNA Interferenz-Methode bewirkt Zellzyklusarrest**) konnte in der Durchflusszytometrie in unbehandelten Zellen eine Induktion des Zellzyklus beobachtet werden.

Unter Repression von c-Myc mittels der RNA Interferenz-Methode zeigte eine pharmakologische Stimulation durch Ionomycin jedoch praktisch keine Veränderung in der Zellzyklusinduktion zur Kontrolle.

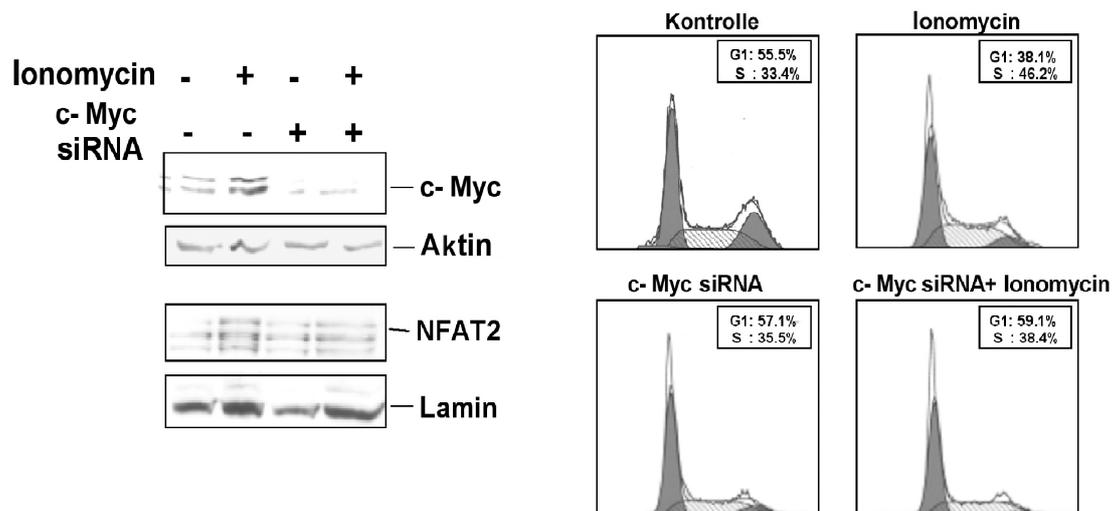


Abbildung 19 und 20: Western Blot aus zellulären Extrakten (linke **Abbildung 19**). Man erkennt nach Behandlung mit 1 μ M Ionomycin (Spur 2) eine synchron gesteigerte basale Expression von NFAT2 (unteres Feld) und c-Myc (oberes Feld). Unter Repression von c-Myc (Spuren 3 und 4) durch siRNA ist die NFAT2 Expression durch Ionomycin (Spur 4) weiter induzierbar, die endogene c-Myc Expression verbleibt allerdings auf dem Level der Kontrolle. Analog dazu erkennt man in der Durchflusszytometrie (rechte **Abbildung 20**) durch Stimulation der Ca^{2+} / Calcineurin/ NFAT2 Achse eine Induktion des Zellzyklus in Panc-1 Zellen mit funktionierendem c-Myc (obere Felder). Unter Ausschaltung von c-Myc (untere Felder) lässt sich durch Ionomycin keine Induktion des Zellzyklus erzeugen.

3.6 NFAT2 reguliert die c-Myc Aktivität über direkte Interaktion mit dem c-Myc Promoter

3.6.1 NFAT2 steigert die Expression von c-Myc auf RNA Ebene

Um zu überprüfen, ob NFAT2 die c-Myc Expression über direkte Interaktion mit dem c-Myc Promoter reguliert, wurde zunächst die regulatorische Wirkung von NFAT2 auf die c-Myc Aktivität im Northern Blot untersucht.

Hierzu wurden Panc-1 Zellen mit einem NFAT2-Expressionskonstrukt transient transfiziert. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Panc-1 Zellen.

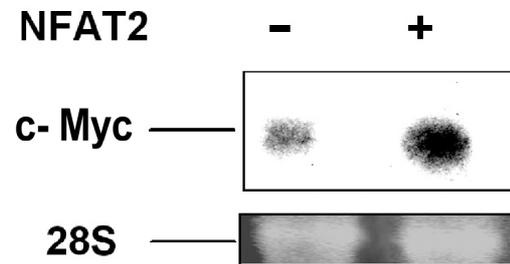


Abbildung 21: Northern Blot von mit einem NFAT2-Expressionskonstrukt transient transfizierten Panc-1 Zellen. Man erkennt eine deutliche Zunahme der c-Myc Aktivität (rechts), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (links). 28S als Ladekontrolle.

3.6.2 Ausschaltung von NFAT2 hemmt die transkriptionelle Aktivität am c-Myc Promoter

Desweiteren wurden Reporterassays (Luciferaseassays) unter Verwendung eines artifiziellen c-Myc-responsiven Reporter-Promotorkonstruktes durchgeführt. Panc-1 Zellen wurden mit diesem Reporterplasmid (c-Myc-Luc) transient transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität in Abhängigkeit der NFAT2 Aktivität gemessen. Dabei wurde in der Auswertung die basale Aktivität von c-Myc in der unbehandelten Kontrollgruppe als „1“ gesetzt und die Einflüsse der regulatorischen Veränderungen in x-facher Steigerung bzw. Minderung dieser Kontrolle angegeben.

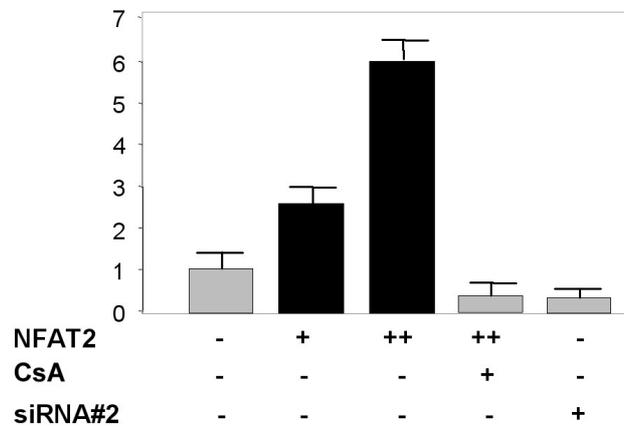


Abbildung 22: Reporterassay mit einem c-Myc Luciferasekonstrukt. Man erkennt eine zunehmende Aktivität von cMyc auf das bis zu sechsfache der basalen Aktivität nach Transfektion eines NFAT2 Expressionskonstruktes (Säulen 2 und 3). Durch gleichzeitige Behandlung mit 1 μ M CsA (Säule 4), bzw. Co-Transfektion von silencer RNA für NFAT2 (Säule 5), lässt sich die Aktivität von c-Myc auf Werte bis unter der endogenen Aktivität in den Kontrollen reduzieren. Die basale Aktivität der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt (Säule 1), die Werte der behandelten Proben in x-facher Abweichung davon dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse zur Expression, Regulation und Funktion von NFAT2 im Pankreaskarzinom

Im Gegensatz zur Bedeutung der NFAT-Transkriptionsfaktoren in der Regulation wichtiger Prozesse der Immunantwort, ist bislang nur wenig bekannt über die Expression, Regulation und Funktion dieser Proteine außerhalb des Immunsystems. Erste *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen der letzten Jahre konnten allerdings zeigen, dass einzelne NFAT-Proteine auch in der Entwicklung des Nervensystems, der Herzklappen und des Skelettsystems von großer Bedeutung sind und über transkriptionelle Kontrolle der Genexpression in diesen Organsystemen spezifische Beiträge leisten (Pavlath und Horsley, 2003; Horsley und Pavlath, 2003; Musaro et al., 1999; de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998; Graef et al., 2001b; Hernandez et al., 2001; Zaichuk et al., 2004)

Weitaus weniger bekannt ist die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in Krankheitsprozessen des Menschen und insbesondere in der Entwicklung oder dem phänotypischen Verhalten epithelialer Tumore. Untersuchungen von Jauliac und Mitarbeitern aus dem Jahr 2002 ließen erstmalig eine onkogene Funktion der NFAT-Proteine in der Karzinogenese des Kolons vermuten. Dabei konnte eine gesteigerte Expression von NFAT1 und TonEBP (NFAT5) in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden, welche mit einer massiv erhöhten Invasivität der Tumorzellen vergesellschaftet war (Jauliac et al., 2002).

Erste Hinweise auf eine differenzielle Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie im Pankreaskarzinom kamen von Expressionsprofilanalysen, welche eine massiv gesteigerte Expression von NFAT1 und NFAT2 im Pankreaskarzinom, im Vergleich zu gesundem und chronisch entzündlichem Pankreasgewebe, aufzeigten (Buchholz M., 2003, unveröffentlichte Befunde). Immunhistochemische Untersuchungen, die im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Studie durchgeführt wurden, konnten eine kombinierte, oder individuelle Überexpression von NFAT1 und NFAT2 im Pankreaskarzinom in mindestens 80% der untersuchten Gewebe (ca. 40 Pankreaskarzinomgewebe) bestätigen und darüber hinaus die Tumorzellen selbst als primären Ort der Expression im Tumorgewebe lokalisieren (Ellenrieder V., unveröffentlichte Befunde). Interessanterweise konnten beide NFAT-Proteine dabei v.a. im Zellkern von Tumorzellen und hier in Co-lokalisation mit seinem bekannten Aktivator Calcineurin (Hogan et al., 2003) nachgewiesen werden. In

weiterführenden Untersuchungen wurde die Expression beider Proteine in Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms untersucht, um erste Einblicke über den Zeitpunkt der NFAT-Aktivierung in der Tumorgenese des Pankreas zu erhalten. Beide Transkriptionsfaktoren ließen sich bereits in Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms, den PanIN–Stadien 2 und 3, nachweisen, was auf eine Funktion dieser Proteine bereits zu frühen Zeitpunkten der Pankreaskarzinomenstehung hinweist (Ellenrieder V., 2005, unveröffentlichte Befunde). Die gesteigerte Expression von NFAT1 beruht dabei auf einer chromosomalen Amplifikation auf Chromosom 20q13 (Holzmann et al., 2004), die in mehr als 80% der untersuchten Pankreaskarzinomgewebe aufzeigt werden konnte. Unklar bleibt bislang, ob die NFAT2-Überexpression ebenfalls auf genetischen Veränderungen oder auf anderen Ursachen, wie z.B. Signalling-Crosstalk oder Aktivierung mitogener Signalwege beruht. Basierend auf diesen Vorarbeiten, die eine onkogene Funktion der NFAT-Proteine im Pankreaskarzinom vermuten ließen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation und Funktion von NFAT2, insbesondere im Kontext der Zellzyklus-Regulation, untersucht. Zunächst wurde die Expression von NFAT2 in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien (Panc 1, ASPC-1, S-028, IMIM PC-1, IMIM PC-2 und TD-2), sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene bestätigt. Untersuchungen zur Regulation von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen zeigten, dass die zelluläre Lokalisation, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von NFAT2 durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin reguliert wird. Calcineurin ist eine Phosphatase, die durch Dephosphorylierung zur Konfigurationsänderung von NFAT2 führt, welches anschließend über bislang wenig verstandene Mechanismen in den Zellkern transloziert und über Promotorbindung die Expression spezifischer Targetgene regulieren kann (Hogan et al., 2003). Damit stellt die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung einen essentiellen Schritt in der Aktivierung von NFAT2 dar. Die Calcineurin-induzierte Aktivierung von NFAT2 kann durch Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A, einem Pharmakon welches irreversibel an die katalytische Domäne von Calcineurin bindet und somit konsekutiv die Dephosphorylierung von NFAT2 hemmt, inhibiert werden (Puri S. et al., 2004; Venkatesh et al., 2004; Arora-Gupta et al., 2004). Identifiziert wurde dieser Wirkmechanismus in T-Lymphozyten, in denen die Hemmung der Calcineurin/ NFAT Achse durch CsA, zu einer suffizienten Inaktivierung von T-Lymphozyten und damit zu einer Hemmung der überschießenden Immunreaktion führt. Die immunsupprimierenden Eigenschaften von CsA werden therapeutisch v.a. in der Behandlung von Patienten nach Nierentransplantation genutzt. Tatsächlich ist CsA in der Behandlung dieser Patientengruppe das Medikament der ersten

Wahl zur Behandlung/ Verhinderung einer Abstoßungsreaktion (Ponticelli, 2005). Es sei an dieser Stelle noch daraufhin gewiesen, dass die Vorteile der CsA-Behandlung nun auch in der Behandlungen anderer Erkrankungen mit überschüssender Immunantwort, wie z.B. zur Therapie schwerster Schübe einer Colitis ulcerosa, erprobt werden. Die Funktionalität des Calcineurin-NFAT Signalweges in Pankreaskarzinomzellen wurde untersucht durch pharmakologische Aktivierung mit Ionomycin oder Hemmung durch CsA und anschließender Bestimmung der zellulären Lokalisation, DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität von NFAT2. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch in Pankreaskarzinomzellen die Aktivierung von NFAT2 der Regulation durch Calcineurin unterliegt. Western Blot Analysen zellulärer Fraktionen belegten zunächst, dass die zelluläre Verteilung von NFAT2 direkt von der Calcineurinaktivität abhängt und dass Behandlung mit CsA einen „shift“ von der dephosphorylierten aktiven, in die hyperphosphorylierte inaktive Form induziert. Im Anschluss kommt es dann zur Umverteilung von NFAT2 mit Reduktion der nukleären und Ansammlung zytoplasmatischer Anteile. Dieser „shift“ aus dem Zellkern ins Zytoplasma ist letztlich als Netto-Effekt einer reduzierten Aktivierung und folglich eines reduzierten nukleären Imports (nach CsA-Gabe) bei funktioneller Inaktivierung und Ausschleusung von bereits vorhandenem NFAT2 zu sehen. Da die Behandlung mit CsA ausschließlich den nukleären Import hemmt (Venkatesh et al., 2004), lässt sich der beobachtete „shift“ von hyperphosphoryliertem NFAT2 ins Zytoplasma also primär durch Kinasen bedingte Re-Phosphorylierung erklären. Verschiedene konstitutiv-aktive und Signalling-regulierte Kinasen, wie z.B. Casein Kinase 2 (CK-2) oder GSK3, sind bekannt dafür, durch nukleäre Rephosphorylierung zur Inaktivierung von NFAT2 beizutragen (Crabtree, 2002). Im Gegensatz hierzu, führt eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, wie beispielsweise durch Ionomycingabe erzielt (Tomita M. et al., 2002), zu einem gesteigerten nukleären Import von NFAT2 und einer konsekutiv erhöhten DNA-Bindung und Transkription. Diese wurden mittels DNA-Bindungsstudien und Reportergen-Assays verifiziert, wobei eine Aktivierung von Calcineurin (durch Ionomycin oder Transfektion eines konstitutiv aktiven Konstruktes) mit einer gesteigerten DNA-Bindung von NFAT2 und einer erhöhten Transaktivierung eines NFAT-responsiven Promotorkonstruktes einherging. Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass NFAT2 im Pankreaskarzinom exprimiert wird und funktionell aktiv ist. Dabei unterliegen sowohl die zelluläre Lokalisation, als auch die DNA-Bindungseigenschaften und die Transkriptionsaktivität der Regulation durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin. Untersuchungen zur

Regulation des nukleären Exports in Pankreaskarzinomzellen ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur Funktion von NFAT2 im Pankreaskarzinom, standen Experimente zur Beurteilung des zellulären Wachstums von Pankreaskarzinomzellen. Hierzu wurde in Zelllinien mit intaktem Calcineurin/ NFAT Signalweg dessen Aktivität durch CsA-Gabe inhibiert und die Effekte im Thymidin-Proliferationsassay analysiert. Es zeigte sich, dass in Analogie zu Ergebnissen in T-Lymphozyten und anderen Zellsystemen (Marquez et al., 2004, Lipskaia und Compre, 2004; Tomono et al., 1998; Terada et al., 1991; Mosienak et al., 1998), die Hemmung von Calcineurin in einem G1-Arrest mündet und damit in einer ca. 50 %igen Reduktion des Zellwachstums resultiert. Interessanterweise ließen sich diese Effekte aber nicht in allen untersuchten Tumorzellen bestätigen und dies, obgleich alle analysierten Zellen einen intakten Calcineurin/ NFAT2 Signalweg besitzen. Tatsächlich blieb die Zellzyklustransition der Pankreaskarzinomzellen TD-2 und IMIM PC-2 von einer pharmakologischen Calcineurin-Hemmung unbeeinflusst.

4.2 Interpretation der Untersuchungen zur Rolle von c-Myc als Mediator der NFAT vermittelten Zellzyklus-Progression

c-Myc ist ein mitogener Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Transition des Zellzyklus spielt und in soliden Tumoren häufig überexprimiert wird (Nesbit et al., 1999). Im Pankreaskarzinom wird eine Überexpression von c-Myc in ca. 60 bis 70% der Tumore beschrieben, die allerdings nur in ca. 30% auf eine genetische Alteration zurückzuführen ist. Folge der Aktivierung von c-Myc ist die Induktion wichtiger Zellzyklusinduktoren (z.B. Cyclin D1, Cyclin D2, CDK's) und die transkriptionelle Repression von Zellzyklusinhibitoren wie p15 und p21. Damit ist c-Myc ein zentraler Regulator der G1-S-Phasen-Transition (Amati et al., 1998).

Matrix-CGH Untersuchungen zur Detektion chromosomaler Alterationen in Pankreaskarzinomzellen (Schreiner et al. 2003, Holzmann et al., 2004) führten zur Identifikation einer Amplifikation des c-Myc Onkogens auf Chromosom 8q24, zu welchen auch die Pankreaskarzinomzelllinien TD-2 und IMIM PC-2 zählen, die sich in den Untersuchungen als refraktär für eine CsA-induzierte Wachstumshemmung erwiesen. In

allen anderen Pankreaskarzinomzelllinien, die in dem Ansatz gewählt wurden und deren Proliferation durch CsA-Gabe hemmbar war, konnte eine solche Amplifikation auf Chromosom 8q24 nicht nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Befunden wurde folglich die Hypothese, dass das Calcineurin/ NFAT Signalling eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Progression des Pankreaskarzinoms spielt und dass Tumorzellen mit chromosomaler c-Myc Amplifikation sich dieser Funktion entziehen, erstellt. Im Folgenden wurde die Interaktion des Calcineurin/ NFAT Signalweges mit c-Myc näher untersucht und Western Blot-Analysen zur Bestimmung der endogenen c-Myc Expression, in Abhängigkeit der Aktivität des Calcineurin/ NFAT Signalweges, durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass vergleichbar hohe Expressionslevel von c-Myc in allen untersuchten Pankreaskarzinomzellen vorlagen, also sowohl in Zellen mit Amplifikation von c-Myc, als auch in Zellen ohne Nachweis einer chromosomalen Alteration. Tatsächlich ließ sich die c-Myc Expression aber in den Wachstums-responsiven Zellen Panc-1 und ASPC-1 durch CsA-Gabe hemmen, während in IMIM-PC2 und TD-2 Zellen - also jenen Zelllinien mit Nachweis einer genetischen c-Myc Alteration - die endogene Expression von c-Myc unbeeinflusst blieb. Diese Untersuchungen ließen erstmalig eine regulatorische Funktion des Calcineurin/ NFAT Signalweges in der Expression des zentralen Zellzyklusregulators und Onkogens c-Myc vermuten. Um die spezifische Rolle von NFAT2 in der c-Myc Expression und Zellzyklusregulation zu verifizieren, wurde die endogene NFAT2 Expression in Pankreaskarzinomzellen durch Anwendung der RNA-Interferenztechnologie reprimiert. Die RNA Interferenz-Methode (siRNA) beruht auf der Transfektion kurzer (21-23bp), synthetisch hergestellter doppelsträngiger RNA-Sequenzen, die sich mit der endogenen komplementären mRNA verbinden, damit deren Translation verhindern und letztlich zum enzymatischen Abbau der endogenen mRNA beitragen. Unter Anwendung verschiedener siRNA-Sequenzen ist es nicht nur gelungen endogenes NFAT2 spezifisch und hocheffektiv zu unterdrücken, sondern auch die Auswirkungen auf die Expression von c-Myc und die Zellzyklustransition zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass in Analogie zu den Ergebnissen nach pharmakologischer Hemmung von Calcineurin, Pankreaskarzinomzellen nach „silencing“ von NFAT2 signifikant weniger proliferieren, und dass die Reduktion des Zellwachstums auf einem Arrest der Zellen in der G1-Phase beruht. Mehr noch, Repression der endogenen NFAT2 Expression ging mit einer dramatischen Reduktion der endogenen c-Myc Expression einher, die sich auch durch Stimulation des Calcineurin/ NFAT Signalweges durch Ionomycin nur partiell wiederherstellen ließ. Die diskrete Restinduzierbarkeit von c-Myc nach Simulation

NFAT2-negativer Zellen, lässt sich wahrscheinlich über NFAT2 unabhängige Mechanismen, z.B. durch Aktivierung von NFAT1, weiterer NFAT-Proteine oder durch Aktivierung anderer NFAT-unabhängiger Calcineurin-regulierter Transkriptionfaktoren erklären. Es bleibt aber festzuhalten, dass der erfolgreiche „knock-down“ von NFAT2 massiven Einfluß, sowohl auf die basale, als auch auf die Calcineurin-induzierte Expression von c-Myc nimmt, und dass die Repression von c-Myc zu einem signifikanten G1-Arrest der Pankreaskarzinomzellen führt.

Abschließend wurden Untersuchungen durchgeführt, die überprüfen sollten, inwieweit die transkriptionelle Induktion von c-Myc für den NFAT-induzierten Progress des Zellzyklus von Pankreaskarzinomzellen von Bedeutung ist.

Hierzu wurden Experimente durchgeführt, in denen Zellzyklusanalysen nach kombinierter Modifikation des Calcineurin/ NFAT Signalweges und der endogenen c-Myc Induzierbarkeit, erhoben wurden. Tatsächlich führte die Aktivierung des Calcineurin/ NFAT2 Signalweges nur dann zu einer signifikanten G1/ S-Phasen-Transition, wenn die endogene Expression von c-Myc erlaubt wurde. siRNA vermitteltes Silencing der endogenen c-Myc Expression, hingegen, resultierte in einem Versagen des Zellzyklus-Progress obgleich der Calcineurin/ NFAT Signalweg funktionell aktivierbar blieb. Im Gegensatz hierzu konnte der CsA-vermittelte G1-Arrest in Pankreaskarzinomzellen durch artifizielle Überexpression von c-Myc (nach Transfektion eines c-Myc-Expressionsplasmids) überwunden werden, eine Situation wie sie in Pankreaskarzinomzellen mit c-Myc Amplifikation vorliegt.

Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der NFAT2 regulierten Expression von c-Myc, lassen c-Myc als direktes Zielgen von NFAT2 erkennen (Buchholz et al., 2006). Promotorsequenzanalysen des humanen Promotors erbrachten den Nachweis von mindestens 13 potentiellen NFAT2-Bindungsstellen, wobei eine perfekte GGAAA-Bindungssequenz innerhalb der Transkriptionsstartpunkte P1 und P2, einer kurzen, aber höchst responsiven Promotorregion, lokalisiert ist. Die Reportergen Assays konnten einerseits zeigen, dass Transfektion von NFAT2 zu einer massiven Induktion des ca. 2,7 kb-langen c-Myc-Promotors führt, und dass andererseits die punktuelle Mutation der proximalen Bindungssequenz mit einer signifikanten Reduktion der Induzierbarkeit des c-Myc Promotors vergesellschaftet ist. Darüber hinaus konnte die Bindung von NFAT2 an der proximalen Bindungssequenz mittels DNA-Pulldownassays nachgewiesen und desweiteren aufgezeigt werden, dass die siRNA vermittelte Repression von endogenem

NFAT2 in einer signifikanten Reduktion der basalen Promotoraktivität des gesamten c-Myc Promotors mündet (Buchholz et al., 2006). Damit wurde in diesen Charakterisierungsstudien des humanen c-Myc Promotors dieser als direktes Zielgen von NFAT2 bestätigt, wobei NFAT2 sowohl die basale, als auch die Calcineurin stimulierte Expression von c-Myc, v.a. über Interaktion des proximalen Promotorabschnittes, reguliert. Interessanterweise liegt diese NFAT2-Bindungssequenz des proximalen Promotors innerhalb einer zuvor als „TGF β inhibitory element“ (TIE) bezeichnete Promoterregion, deren Repression in normalen epithelialen Zellen von essenzieller Bedeutung für die TGF β induzierte Wachstumshemmung ist. Während TGF β in frühen Tumorstadien über Hemmung dieses TIE-Elementes maßgeblich zur Tumorsuppression beiträgt, geht die TGF β -Inhibition dieses Promotorabschnittes während der Tumorprogression verloren (Chen et al., 2001). Mechanistische biochemische Untersuchungen führten zur Identifikation von mindestens zwei ähnlichen Mechanismen, die in der TGF β -vermittelten Repression des TIE Elementes von Bedeutung sind und die beide durch Interaktion mit reprimierenden Transkriptionsfaktoren definiert werden. Dabei scheinen v.a. Proteine der E2F-Familie (v.a. E2F4) (Chen et al., 2002) und der Sp1/ KLF-artigen (v.a. KLF11) (Buck et al., 2006) Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung zu sein, da diese nach TGF β -Stimulation mit Smad-Proteinen einen DNA-Bindungskomplex am TIE Element eingehen und wahrscheinlich zelltyp- und zellzyklusabhängig zur Repression von c-Myc beitragen. Diese Repression von c-Myc ist von essenzieller Bedeutung für alle weiteren Zellzyklus inhibierenden Mechanismen, einschließlich der späteren Induktion der Zellzyklus-Inhibitoren p15 und p21. Findet die TGF β -induzierte und Smad/ E2F4 oder Smad/ KLF11 vermittelte Repression von c-Myc nicht statt, so bleibt die Bindung von c-Myc an wichtigen Bindungselementen der p15 und p21 Promotoren erhalten und eine Interaktion der Smad Proteine zur transkriptionellen Induktion wird verhindert (Chen et al., 2002).

Damit wird klar, warum die transkriptionelle Repression von c-Myc durch TGF β eine fundamentale Rolle in der Tumorprogression spielt und warum der Verlust dieser Funktion ein zentrales Ereignis im Progress epithelialer Tumoren darstellt.

In weiterführenden Arbeiten wird nun überprüft werden, ob mechanistische Interaktionen zwischen Effektoren der TGF β -Inhibition und der NFAT-vermittelten Induktion des proximalen c-Myc Promotors bestehen. Es bleibt aufgrund der direkten Nähe der NFAT-Bindungssequenz zu spekulieren, dass NFAT in einer direkten Konkurrenz mit Smad-Proteinen und deren Interaktionspartner steht und diese während der Tumorprogression aus ihrer Promotorbindung verdrängt. Dieser Hypothese wird durch aktuelle Daten der

Literatur belegt, die eine physikalische und funktionelle Interaktion von NFAT2 mit Mitgliedern der Sp1/ KLF-Familie nachweisen konnten (Alfonso-Jaume et al., 2004; Santini et al., 2001). Denkbar wäre also, dass während der Tumorprogression Smad-KLF11- Komplexe von NFAT-Sp1 Komplexen mit der Konsequenz einer gesteigerten c-Myc Expression, substituiert werden.

Zusammenfassend gelang es in der vorliegenden Arbeit NFAT2 als wichtiges Onkogen mit Bedeutung in der Wachstumsregulation des Pankreaskarzinoms aufzuzeigen. Entsprechend den Ergebnissen wird NFAT2 in einem Großteil der humanen Pankreaskarzinome überexprimiert, unterliegt der Regulation des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges und ist für die transkriptionelle Induktion des Transkriptionsfaktors c-Myc, einem wichtigen Regulator der Zellzykluskontrolle, verantwortlich.

4.3 Bedeutung und Ausblick

Die Überexpression des Transkriptionsfaktors c-myc wurde in einer Vielzahl epithelialer und hämatopoetischer Tumoren beschrieben und ist mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert. Die onkogene Wirkung von c-Myc beruht v.a. auf seinen ausgeprägten Eigenschaften in der Regulation des Zellzyklus, wobei die Überexpression oder Aktivierung von c-Myc mit einer gesteigerten Transition der G1-Phase in die S-Phase vergesellschaftet ist (Grandori et al., 2000; Henriksson und Luscher, 1996; Dang et al., 2006). Obgleich die funktionelle Bedeutung von c-Myc in Tumoren recht gut beschrieben ist, bleiben die Mechanismen, die zur gesteigerten Expression von c-Myc führen nur unzureichend verstanden.

Im Pankreaskarzinom, beispielsweise, wird eine Überexpression von c-Myc in bis zu 70% der Fälle beschrieben (Li et al., 2005), wobei nur in ca. 30% aller humanen Pankreaskarzinome eine chromosomale Amplifikation des c-myc Gens als Ursache nachgewiesen werden konnte (Schleger et al., 2002). Damit wird klar, dass auch andere nicht genetische Mechanismen für die gesteigerte Expression von c-Myc im Pankreaskarzinom von Bedeutung sein müssen. Die vorliegende Arbeit liefert hierzu einen wichtigen Beitrag, da der Transkriptionsfaktor NFAT2 als transkriptioneller Induktor von c-Myc in Pankreaskarzinomzellen identifiziert. Dieser neue Regelmechanismus platziert nicht nur NFAT2 als zentralen Regulator von c-Myc, sondern erklärt auch die gesteigerte Expression von c-Myc in Pankreaskarzinomzellen trotz fehlender genetischer Abberation.

Im Kontext der klinischen Relevanz könnte diese Arbeit einen wertvollen Ansatz liefern. Kernproblem des Pankreaskarzinoms ist das rasche Tumorwachstum bei früher Metastasierungstendenz und schlechter Ansprechen auf herkömmliche Therapiestrategien. Neue molekulare Ansätze sind in Erprobung und könnten – vielleicht auch in Kombination mit konventionellen Methoden – eine Verbesserung der Therapieerfolge erzielen. Voraussetzung ist allerdings ein besseres Verständnis der biologischen und molekularen Zusammenhänge. In dieser Arbeit konnte ein wichtiger pathogentischer Mechanismus identifiziert werden, der zu einem Wachstumsvorteil entarteter Zellen des Pankreas beiträgt. Diese Untersuchungsergebnisse könnten folglich Grundlage für einen neuen molekularen Therapieansatz liefern, welcher auf der selektiven Inhibition des onkogenen Transkriptionsfaktors NFAT2 beruht. Diese ist durch Gabe des Calcineurin-Antagonisten CsA natürlich nicht geben, da CsA nicht ausschließlich NFAT-Proteine, sondern auch alle anderen Calcineurin-regulierten Transkriptionsfaktoren und nukleären Protein hemmen würde. Benötigt werden also spezifische Inhibitoren, die selektiv die Aktivität von NFAT2 im Pankreaskarzinom – und möglicherweise auch in anderen soliden Tumoren- hemmen. Die Identifikation derartiger Inhibitoren („small molecule inhibitors“) ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Expression, Regulation und Funktion des Transkriptionsfaktors NFAT2 (nuclear factor of activated T-cells) im Pankreaskarzinom durchgeführt.

Zunächst wurde die Expression von NFAT2 in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien (Panc 1, ASPC-1, S-028, IMIM PC-1, IMIM PC-2 und TD-2) sowohl auf RNA (Ribonucleinsäure)- als auch auf Proteinebene bestätigt. Untersuchungen zur Regulation von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen zeigten, dass die zelluläre Lokalisation, DNA (Desoxyribonucleinsäure)-Bindung und transkriptionelle Aktivität von NFAT2 durch die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin reguliert wird. Es wurde gezeigt, dass Induktion des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges im Pankreaskarzinom in eine erhöhte durch Dephosphorylierung initiierte Aktivierung, eine damit verbundene nukleäre Translokation und erhöhte DNA-Bindungsaktivität von NFAT2 mündet.

Desweiteren wurden die Auswirkungen der Aktivierung bzw. Hemmung des Ca^{2+} /Calcineurin Signalweges auf den Zellzyklus untersucht. Dazu wurde die Aktivität von NFAT2 pharmakologisch durch Hemmung des Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges in Panc-1 Zellen durch CsA (Cyclosporin A) -Behandlung erniedrigt und die Effekte dieser Inhibition mit unbehandelten Proben im Thymidinproliferationsassays und in Durchflusszytometrien verglichen. Als Ergebnis konnte eine Hemmung der Proliferation der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf bis zu 50% und ein signifikantes Verharren der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus beobachtet werden.

Interessanterweise ließen sich diese Effekte aber nur in den Zelllinien Panc-1 und ASPC-1 beobachten und dies, obgleich alle analysierten Zellen einen intakten Calcineurin/ NFAT2 Signalweg besitzen. Tatsächlich blieb die Zellzyklustransition der Pankreaskarzinomzellen TD-2 und IMIM PC-2 von einer pharmakologischen Calcineurin-Hemmung unbeeinflusst. Da TD-2 und IMIM PC-2 Zellen bekannterweise eine chromosomale Amplifikation des c-Myc Gens, eines bekannten Onkogens des Pankreas, besitzen, diese Amplifikation hingegen nicht in den anderen Pankreaskarzinomzellen unserer Untersuchungen vorhanden ist, entstand die Hypothese, dass die Resistenz der nicht-responsiven Zelllinien Folge dieser c-Myc Amplifikation ist und das andererseits c-Myc ein wichtiges „downstream-Target“ von NFAT2 darstellen könnte.

Durch Repression der endogenen NFAT2 Expression in Pankreaskarzinomzellen durch Anwendung der RNA-Interferenztechnologie, konnte in Thymidinproliferationsassays und Durchflusszytometrien der Nachweis erbracht werden, dass die regulatorischen Einflüsse des aktiven Ca^{2+} / Calcineurin Signalweges auf Tumorproliferation und Tumorprogress über spezifische Aktivierung von NFAT2 und dadurch verbundene transkriptionelle Induktion des Onkogens c-Myc initiiert werden. Dieser Signalweg funktioniert allerdings nur in Zellen, in welchen die basale c-Myc Expression noch normalen Regelmechanismen unterliegt. Ist die endogene c-Myc Expression z.B. durch chromosomale Abberationen wie Amplifikation bereits dereguliert, gehen die Einflüsse des Ca^{2+} / Calcineurin/ NFAT2 Signalweges verloren.

Erste Daten auf RNA-Ebene und in Reporterassays deuten darauf hin, dass die c-Myc Expression über direkte Bindung von NFAT2 an dessen Promoter und damit verbundener gesteigerter transkriptioneller Induktion reguliert wird.

NFAT2 wird im Pankreaskarzinom über einen aktiven Ca^{2+} / Calcineurin Signalweg reguliert. Aktivierung dieser Signalkaskade resultiert in einer gesteigerten Expression von endogenem c-Myc über Bindung von NFAT2 am c-Myc Promoter und anschließende transkriptionelle Induktion von c-Myc. Durch die aufgehobene Repression dieses Promoterabschnittes des c-Myc Promoters kommt es zu einer gesteigerten Expression von c-Myc im Tumor und damit assoziiert zu Tumorprogress, im Sinne einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen und einer Induktion des Zellzyklus.

Damit zeigt diese Arbeit einen alternativen, signalwegabhängigen Mechanismus der Regulation der c-Myc Überexpression im Pankreaskarzinom zur häufig vorkommenden Amplifikation dieses Genabschnittes auf.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Alfonso-Jaume MA, Mahimkar R, Lovett DH (2004). Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Sp1/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells. *Biochem J* 380: 735-747.
- 2) Almoguerra C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53: 549-554.
- 3) Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J (1998). Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3: 250-268.
- 4) Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2004). Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken: 32-35.
- 5) Arora-Gupta N, Davies P, McKiernan P, Kelly DA (2004). The effect of long-term calcineurin inhibitor therapy on renal function in children after liver transplantation. *Pediatr Transplant* 8: 145-150.
- 6) Baumgart M, Heinmoller E, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM (2005). The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. *Cell Oncol* 27: 3-13.
- 7) Bowles MJ, Benjamin IS (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract: Cancer of the stomach and pancreas. *Brit Med J* 323: 1413-1416.
- 8) Bradford MM (1976). A rapid and sensitiv method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- 9) Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/ calcineurin signaling pathway. *EMBO J* 25: 3714-3724.
- 10) Buchholz M, Klinik für Innere Medizin, SP Gastroenterologie, Universitätsklinik Marburg (2003). Unveröffentlichte Befunde.
- 11) Buck A, Buchholz M, Wagner M, Adler G, Gress T, Ellenrieder V (2006). The tumor suppressor KLF11 mediates a novel mechanism in transforming growth factor beta-induced growth inhibition that is inactivated in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res* 4: 861-72.

- 12) Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8: 27-32.
- 13) Cascinu S, Verdecchia L, Valeri N, Berardi R, Scartozzi M (2006). New target therapies in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 17: 148-152.
- 14) Chen CR, Kang Y, Massague J (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 992-999.
- 15) Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19-32.
- 16) Crabtree GR, Olson EN (2002). NFAT-signaling: Choreographing the social lives of cells. *Cell* 109: 67-79.
- 17) Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16: 253-64.
- 18) de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL et al. (1998). Role of the NF-Atc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392: 182-186.
- 19) De Nigris F, Balestrieri ML, Napoli C (2006). Targeting c-Myc, Ras and IGF cascade to treat cancer and vascular disorders. *Cell cycle* 5: 1621-1628.
- 20) Easton JB, Houghton PJ (2006). mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 25: 6436-6446.
- 21) Ellenrieder V, Klinik für Innere Medizin, SP Gastroenterologie, Universitätsklinik Marburg (2005). Unveröffentlichte Befunde.
- 22) Erlanson DA, Chytil M, Verdine GL (1996). The leucine zipper domain controls the orientation of AP-1 in the NFAT.AP-1.DNA complex. *Chem Biol* 3: 981-91.
- 23) Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- 24) Fisher WE (2001). Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg* 25: 503-508.
- 25) Garraway LA, Sellers WR (2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 593-602.

- 26) Gomez MF, Bosc LV, Stevenson AS, Wilkerson MK, Hill-Eubanks DC, Nelson MT (2003). Constitutively elevated nuclear export activity opposes Ca²⁺-dependent NFATc3 nuclear accumulation in vascular smooth muscle: role of JNK2 and Crm-1. *J Biol Chem* 278: 46847-46853.
- 27) Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 653–699.
- 28) Graef IA, Chen F, Crabtree GR (2001b). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 11: 505-512.
- 29) Greenblatt J (1991). Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* 66: 1067-1070.
- 30) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
- 31) Henriksson M, Luscher B (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68:109–182.
- 32) Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM (2001). Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med* 193: 607-620.
- 33) Hochheimer A, Tijan R (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev* 17: 1309-1320.
- 34) Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205-2232.
- 35) Holzmann K, Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Kestler HA, Schwoerer A, Rau B, Radlwimmer B, Dohner H, Lichter P, Gress T, Bentz M (2004). Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes. *Cancer Res* 64: 4428-4433.
- 36) Horsley V, Pavlath GK (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaption. *J Cell Biol* 156: 771-774.

- 37) Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB (1991). Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer* 47: 323-328.
- 38) Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2969-2972.
- 39) Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 4: 540-544.
- 40) Jungert K, Buck A, Buchholz M, Wagner M, Adler G, Gress TM, Ellenrieder V (2006). Smad-Sp1 complexes mediate TGF β -induced early transcription of oncogenic Smad7 in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 27: 2392-401.
- 41) Knudson AG (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823.
- 42) Klöppel G, Kosmahl M (2001). Cystic lesions and neoplasms of the pancreas. The features are becoming clearer. *Pancreatology* 1: 648-655.
- 43) Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR (2005). Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11: 2117-2123.
- 44) Lipskaia L, Compre AM (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 96: 55-68.
- 45) Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20: 2476-2489.
- 46) Marczell AP, Stierer M (1992). Partial pancreaticoduodenectomy (Whipple procedure) for pancreatic malignancy: occlusion of a non-anastomosed pancreatic stump with fibrin sealant. *HPB Surg* 5: 251-259.
- 47) Marquez N, Sancho R, Ballero M, Bremner P, Appendino G, Fiebich BL, Heinrich M, Munoz E (2004). Imperatorin inhibits T-cell proliferation by targeting the transcription factor NFAT. *Planta Med* 70: 1016-1021.
- 48) Mosieniak G, Pyrzynska B, Kaminska B (1998). Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a new component of the signal transduction pathway in glioma cells. *J Neurochem* 71: 134-141.
- 49) Murphy LL, Hughes CC (2002). Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase 3 beta pathway. *J Immunol* 169: 3717-3725.

- 50) Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400: 581-585.
- 51) Neal JW, Clipstone NA (2001). Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J Biol Chem* 276: 3666-3673.
- 52) Neoptolemos JP, Stocken DD, Dunn JA, Almond J, Beger HG, Pederzoli P, Bassi C, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Buckels J, Deakin M, Adab FA, Sutton R, Imrie C, Ihse I, Tihanyi T, Olah A, Pedrazzoli S, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW (2001). Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial. *Ann Surg* 234: 758-768.
- 53) Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18: 3004-3016.
- 54) Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- 55) Pavlath GK, Horsley V (2003). Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle* 2: 420-423.
- 56) Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN (1994). K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54: 1556-1560.
- 57) Ponticelli C (2005). Cyclosporine: from renal transplantation to autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 551-558.
- 58) Ptashne M, Gann AA (1990). Activators and targets. *Nature* 346: 329-31.
- 59) Pugh BF (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255: 1-14.
- 60) Puri S, Magenheimer BS, Maser RL, Ryan EM, Zien CA, Walker DD, Wallace DP, Hempson SJ, Calvet JP (2004). Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway. *J Biol Chem* 279: 55455-55464.
- 61) Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. (1998). The transcription factor NFATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392: 186-190.
- 62) Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common

- involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54: 3025-3033.
- 63) Safe S, Abdelrahim M (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 41: 2438-2448.
- 64) Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP (2001). Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9575-9580.
- 65) Schleger C, Verbeke C, Hildenbrand R, Zentgraf H, Bleyl U. (2002). c-MYC activation in primary and metastatic ductal adenocarcinoma of the pancreas: incidence, mechanisms, and clinical significance. *Mod Pathol* 15: 462-469.
- 66) Schneider G, Schmid RM (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2: 15.
- 67) Schreiner B, Greten FR, Baur DM, Fingerle AA, Zechner U, Bohm C, Schmid M, Hameister H, Schmid RM (2003). Murine pancreatic tumor cell line TD2 bears the characteristic pattern of genetic changes with two independently amplified gene loci. *Oncogene* 22: 6802-6809.
- 68) Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57: 3126-3130.
- 69) Silverman DT (2001). Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Teratog Carcinog Mutagen* 21:7-25.
- 70) Takahashi T, Ishikura H, Motohara T, Okushiba S, Dohke M, Katoh H (1997). Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol* 65: 164-170.
- 71) Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, Castagnini A, Di Francesco V, Frulloni L, Bovo P, Vaona B, Angelini G, Vantini I, Cavallini G, Pederzoli P (1999). Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 44: 1303-1311.
- 72) Terada N, Lucas JJ, Gelfand EW (1991). Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. *J Immunol* 147: 698-704.

- 73) Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H, Kiss Z (1998). Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 353: 374-378.
- 74) Tomita M, Reinhold MI, Molkentin JD, Naski MC (2002). Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J Biol Chem* 277: 42214-42218.
- 75) Venkatesh N, Feng Y, DeDecker B, Yacono P, Golan D, Mitchison T, McKeon F (2004). Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8969-8974.
- 76) Vogelstein B, Kinzler KW (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141.
- 77) Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789-99.
- 78) Wu CC, Hsu SC, Shih HM, Lai MZ (2003). Nuclear factor of activated T cells c is a target of p38 mitogen-activated protein kinase in T cells. *Mol Cell Biol* 23: 6442-6454.
- 79) Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199: 1513-1522.
- 80) Zamboni G, Capelli P, Pesci A, Beghelli S, Luttgies J, Kloppel G (2000). Pancreatic head mass: what can be done? Classification: the pathological point of view. *J Panc* 1: 77-84.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Adler danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. T. Gress danke ich für die Möglichkeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe meine Versuche durchführen zu dürfen.

Frau Alexandra Schatz und Frau Jessica Motzer danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und Anleitung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. V. Ellenrieder für die hervorragende Betreuung und Hilfestellung während dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichte und ohne deren Unterstützung diese Arbeit letztendlich nicht möglich gewesen wäre.