

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

TRAIL-Resistenz im duktalem Adenokarzinom des
Pankreas – molekulare Mechanismen

Susanne Theresa Paula Schüler

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. G. Schneider
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid
3. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 25.10.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.11.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Apoptose.....	1
1.2.1 Intrinsischer und Extrinsischer Apoptosesignalweg.....	2
1.2.2 Die TRAIL-Rezeptoren	3
1.2.3 Das S-Phase Kinase-assoziierte Protein 2 (SKP2).....	3
1.3 Histondeacetylasen (HDACs).....	4
1.4 Fragestellung und Zielsetzung.....	5
2 Material und Methoden.....	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Chemikalien	6
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	8
2.1.3 Kommerziell erhältliche Kits	8
2.1.4 Geräte	9
2.1.5 Lösungen und Puffer	10
2.1.6 Antikörper.....	11
2.1.7 siRNA (small interfering RNA)	12
2.1.8 Echtzeit-PCR- <i>Primer</i>	13
2.1.9 <i>Primer</i> für die <i>Screening</i> -PCR bei Klonierungen.....	13
2.1.10 Luciferase-Reportergen Analyse	13
2.1.11 Zelllinien.....	13
2.2 Experimentalmethoden.....	14
2.2.1 Zellkultur	14
2.2.2 Western Blot.....	16
2.2.3 Hoechst-Färbung.....	17
2.2.4 MTT-Zellviabilitätsassay	18

2.2.5	Luciferase-Reporter-Gen-Assay	18
2.2.6	Caspase-Assay	19
2.2.7	FACS-Analyse.....	19
2.2.8	Isolierung von RNA	20
2.2.9	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.2.10	Klonierung der Standardreihen für die quantitative Echtzeit-PCR.....	22
2.2.11	Reinigung der bakteriellen Plasmid-DNA mittels Miniprep	23
2.2.12	Echtzeit-PCR.....	24
2.3	Statistische Analysen.....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	SKP2 kontrolliert die G1-Phasenprogression und die Resistenz von MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL	25
3.2	Die Kontrolle der TRAIL-Sensitivität durch SKP2 ist zelltypspezifisch	28
3.3	SKP2 ist nicht an der Regulation der Sensitivität gegenüber dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid beteiligt	30
3.4	Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht an der durch SKP2-Depletion vermittelten TRAIL-Sensitivierung beteiligt	31
3.5	TRAIL-Behandlung führt zur beschleunigten Spaltung von BID und einer Depletion von c-Flip _L , XIAP und MCL1 in mit SKP2-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen.....	32
3.6	Durch SKP2-Depletion initiierte Sensibilisierung für TRAIL ist abhängig von Caspase 2	33
3.7	HDAC2-Herunterregulation sensitiviert duktale Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose.....	34
3.8	Valproinsäure sensitiviert duktale Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose.....	36
3.9	TRAIL-vermittelte Apoptose wird in dukталen Pankreaskarzinomzellen nicht durch HDAC1 beeinflusst	38
3.10	HDAC2-abhängige Regulation des BH3- <i>only</i> Proteins NOXA ist nicht an der durch HDAC2-Depletion vermittelten Sensitivierung gegenüber TRAIL beteiligt	39

3.11	HDAC2 reguliert den TRAIL-Rezeptor DR5 in MiaPaCa2 Zellen.....	40
3.12	HDAC2 kontrolliert NF-κB in duktalem Pankreaskarzinomzellen.....	43
3.13	Caspase 2 ist an der Sensitivierung von HDAC2-depletierten MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL beteiligt.....	44
4	Diskussion.....	47
4.1	S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 2 (SKP2) kontrolliert die Resistenz gegenüber TRAIL im duktalem Pankreaskarzinom.....	47
4.2	Histondeacetylase 2 (HDAC2) kontrolliert die TRAIL-Resistenz im duktalem Pankreaskarzinom.....	48
4.3	Funktion der Caspase 2 in der TRAIL-induzierten Apoptose von Pankreaskarzinomzellen.....	51
4.4	Ausblicke	52
5	Zusammenfassung.....	53
6	Literaturverzeichnis.....	54
	Lebenslauf.....	61
	Danksagung	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	SKP2-siRNA induziert einen G1-Phasenarrest des Zellzyklus in MiaPaCa2 Zellen.	25
Abbildung 2:	SKP2 kontrolliert den TRAIL-abhängigen Viabilitätsverlust von MiaPaCa2 Zellen.....	26
Abbildung 3:	SKP2 kontrolliert die TRAIL-induzierte Apoptose in MiaPaCa2 Zellen.	27
Abbildung 4:	SKP2 kontrolliert die TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspasen.....	28
Abbildung 5:	Herunterregulation von SKP2 nach Transfektion in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien.	29
Abbildung 6:	SKP2 kontrolliert die TRAIL-Sensitivität zelltypspezifisch.	30
Abbildung 7:	Die Etoposid-Sensitivität von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen ist SKP2-unabhängig.	31
Abbildung 8:	SKP2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität ist unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies.	32
Abbildung 9:	SKP2 reguliert TRAIL-Resistenzproteine in MiaPaCa2 Zellen.....	33
Abbildung 10:	Caspase 2 reguliert die SKP2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in MiaPaCa2 Zellen.	34
Abbildung 11:	Die HDAC1 Expression ist vom Einsatz HDAC2-spezifischer siRNA unbeeinflusst.....	35
Abbildung 12:	HDAC2-Depletion sensitiviert MiaPaCa2 und Panc1 Zellen für TRAIL.	35
Abbildung 13:	HDAC2-Depletion induziert die TRAIL-abhängige Caspase-Aktivierung in duktalem Pankreaskarzinomzellen.....	36
Abbildung 14:	Der HDAC1 VPA sensitiviert duktales Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose.....	37
Abbildung 15:	HDAC1 ist nicht an der Regulation von TRAIL-induzierter Apoptose in duktalem Pankreaskarzinomzellen beteiligt.	38
Abbildung 16:	HDAC2-abhängige Regulierung von NOXA ist nicht an der Sensitivierung für TRAIL beteiligt.....	39

Abbildung 17: Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose nach HDAC2-Depletion ist unabhängig von TRAIL-induzierter Transkription.	40
Abbildung 18: HDAC2-Depletion beschleunigt die Spaltung von Caspase 8 in MiaPaCa2 Zellen.	41
Abbildung 19: HDAC2 reguliert den TRAIL-Rezeptor DR5 in MiaPaCa2 Zellen.	42
Abbildung 20: Einfluss von HDAC2 auf apoptoseregulierende Proteine.....	43
Abbildung 21: HDAC2 kontrolliert die NF- κ B-Aktivität.	44
Abbildung 22: Caspase 2 reguliert die HDAC2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in MiaPaCa2 Zellen.	45
Abbildung 23: Caspase 2 reguliert die HDAC2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in duktalem Pankreaskarzinomzellen.	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien	6
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien	8
Tabelle 3:	Kommerziell erhältliche Kits	8
Tabelle 4:	Geräte	9
Tabelle 5:	Eingesetzte Puffer	10
Tabelle 6:	Puffer für FACS-Analyse	11
Tabelle 7:	Primäre Antikörper für Western Blot.....	11
Tabelle 8:	Sekundäre Antikörper für Western Blot.....	12
Tabelle 9:	Primärer Antikörper für FACS-Analyse	12
Tabelle 10:	Sekundärer Antikörper für FACS-Analyse.....	12
Tabelle 11:	siRNA Zielsequenzen (Matrizenstrang).....	12
Tabelle 12:	Echtzeit-PCR- <i>Primer</i>	13
Tabelle 13:	<i>Screening-PCR-Primer</i>	13
Tabelle 14:	Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel.....	16

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	DNase	Desoxyribonuklease
µl	Mikroliter	dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
µM	Mikromolar	DPC4	SMAD Family member 4
A	Ampère	DR	Death-Rezeptor
AK	Antikörper	E. coli	Escherichia coli
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	et al.	et alii (und andere)
ATP	Adenosintriphosphat	FACS	Fluorescence activated cell sorting
BAK	BCL-2 homologous Antagonist/Killer	FADD	Fas-associated via Death-Domain
BAX	BCL-2 associated X Protein	Fas	TNF-superfamily Receptor 6, Fibroblast-associated
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2	Fas-L	Fas-Ligand
BCL-X _L	Apoptosis Regulator BCL-X, large isoform	FCS	Fetal Calf Serum
BH3	BCL-2 homology 3	FLICE	FADD-like interleukin-beta converting enzyme
BID	BH3-interacting Domain Death Agonist	Flip	FLICE-like Inhibitory Protein
BSA	Bovines Serumalbumin	FW	Forward
Caspase	Cysteiny-Aspartat spezifische Protease	g	Gramm
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A	G-Phase	Gap-Phase
cDNA	komplementäre DNA	h	Stunde(n)
c-Flip _L	Cellular FLICE-like Inhibitory Protein, large isoform	HDAC	Histondeacetylase
clAP	Cellular inhibitor of apoptosis	HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor
cm	Zentimeter	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	IAP	Inhibitor of Apoptosis
CUX1	Cut-like homeobox 1	IC50	Mittlere inhibitorischer Konzentration
DcR	Decoy-Rezeptor	IP	Immunpräzipitation
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	kD	Kilodalton
DISC	Death-inducing signaling complex	K-RAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	l	Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid	LB	Lysogeny broth/Luria Bertani
DNA	Desoxyribonucleid acid		

M	Molar	RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
mA	Milliampère	RT	Reverse Transkription
MCL1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1	RV	Reverse
mg	Milligramm	s	Sekunde
min	Minute	SAHA	Suberoylanilide hydroxamic Acid
ml	Milliliter	SCF	SKP1-Cullin-F-box-Protein
mM	Millimolar	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
M-Phase	Mitose-Phase	siRNA	Small interfering RNA
mRNA	messenger-RNA	SIRT	Situin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	SKP1	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 1
NAC	N-Acetylcystein	SKP2	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	SMAD	Contraction of Sma and Mad (Mothers against decapentaplegic)
NF-κB	Nuclear Factor-κB	S-Phase	Synthese-Phase
nm	Nanometer	STAT	Signal transducer and activator of transcription
nM	Nanomolar	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
NOXA	Damage protein, a pro-apoptotic BH3-containing protein	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol	TP53	Tumorsuppressorprotein 53
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie	TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PBS	Phosphat Buffered Saline	UV	Ultraviolett
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	V	Volt
pDNA	Plasmid DNA	v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase	VPA	Valproinsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid	w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
RNA	Ribonucleid Acid	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
RNase	Ribonuclease		
rpm	Rotations Per Minute		

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt mit 85 % aller pankreatischen Tumoren die häufigste Karzinomart dar. In der westlichen Welt ist es die zehnthäufigste Krebsform, auf Grund seiner aggressiven Natur nimmt es jedoch den vierten Rang der Mortalitätsstatistiken für Krebs ein (Mihaljevic et al., 2010). Trotz enormer wissenschaftlicher Bemühungen besserten sich die 5-Jahres-Überlebensraten in den letzten Jahrzehnten nur unwesentlich und liegen immer noch bei nur 5 % (Jemal et al., 2010). Die infauste Prognose ist unter anderem Resultat des aggressiven lokalen Tumorwachstums, der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung und fehlender diagnostischer Modalitäten zur frühen Detektion. Außerdem fehlen beim duktalem Pankreaskarzinom effektive Therapieoptionen. Bei 15-20 % der Patienten wird das Pankreaskarzinom in einem resektablen Stadium diagnostiziert, aber nur 20 % der operierten Patienten überleben fünf Jahre (Li et al., 2004).

In Analogie zur Adenom-Karzinomsequenz des Kolonkarzinoms werden auch beim Pankreaskarzinom prä-maligne Vorstufen, die sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) 1-3, beschrieben (Hruban et al., 2001). Bereits in diesen Vorläuferläsionen lassen sich die charakteristischen genetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms nachweisen (Schneider et al., 2003). Das sequentielle Auftreten von Mutationen in dem Protoonkogen K-RAS und den Tumorsuppressorgenen CDKN2A, TP53 und DPC4/SMAD4 führt zur Initiation und Progression der Karzinogenese und damit letztendlich zum Pankreaskarzinom (Schneider et al., 2003).

1.2 Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein physiologischer Prozess zur Wachstumskontrolle von Zellen und Regulation der Gewebshomöostase (Fulda et al., 2006). Es handelt sich um ein zelluläres Programm, das sich durch typische morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und Bildung kleiner Blasen (blebbing) in der zytoplasmatischen Membran auszeichnet.

1.2.1 Intrinsischer und Extrinsischer Apoptosesignalweg

Die Induktion der Apoptose beruht auf einer Gruppe von Cysteinproteasen, den Caspasen. Caspasen werden als Proformen synthetisiert und durch Spaltung an einem Aspartatrest aktiviert. Da sie sich gegenseitig spalten und aktivieren, existiert ein Amplifikationsmechanismus über eine Proteasekaskade. Zusätzlich spalten Caspasen zahlreiche Substrate wie DNase-Inhibitoren oder Proteine des Zytoskeletts, was letzten Endes zu den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose führt (Hamacher et al., 2008).

Es gibt zwei alternative Signalwege um Apoptose zu initiieren, wobei beide über eine proteolytische Kaskade schließlich die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren:

Der eine Signalweg wird intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg genannt, weil das Mitochondrium die Schlüsselrolle bei der Apoptoseinitiierung einnimmt. Der intrinsische Weg wird durch Mangel an Überlebensfaktoren, Stress oder Zellschäden (Schneider et al., 2005; Hamacher et al., 2008), aber auch durch DNA-Schäden nach UV-, γ -Bestrahlung oder Chemotherapie eingeleitet (Schmitz et al., 2000). Der exakte Mechanismus ist noch nicht gänzlich geklärt, aber ein Ungleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Familie führt letztendlich zur Aktivierung von BAX und/oder BAK, die die äußere mitochondriale Membran permeabilisieren. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C und anderer Apoptoseinduktoren aus dem intermembranösen Spalt des Mitochondriums. Im Zytosol formen Cytochrom C, APAF-1, ATP und die Initiatorcaspase 9 den Apoptosom-Multiproteinkomplex, in dem die Initiatorcaspase 9 aktiviert wird. Dies induziert die Spaltung von Effektorcaspasen wie der Caspase 3 (Fulda, 2007; Hamacher et al., 2008).

Der zweite Signalweg wird extrinsischer Signalweg genannt und durch verschiedene Todesrezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert. Diese Rezeptoren sind Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Rezeptor-Superfamilie, die sich aus den TNF-, FAS- und TRAIL- (TNF-related apoptosis inducing ligand-) Rezeptoren zusammensetzt (Hussein et al., 2003). Sie haben eine gemeinsame intrazelluläre Domäne, die Todesdomäne (death domain) genannt wird. Die Aktivierung des Rezeptors nach extrazellulärer Bindung eines spezifischen Liganden (TNF- α , FAS-L und TRAIL) initiiert die Rekrutierung des *FAS-associated death domain proteins* (FADD) und der Procaspasen 8 und 10 zur Todesdomäne, welche den *death-inducing signaling complex* (DISC) bilden. Am DISC wird die Initiatorcaspase 8

aktiviert. In Typ I-Zellen führt dies direkt zur Aktivierung von Effektorcaspasen und zur Apoptose. In Typ II-Zellen, zu denen auch duktale Pankreaskarzinomzellen zählen (Hinz et al., 2000), sind die über den DISC aktivierten Caspasen nicht ausreichend, um effektiv Apoptose zu induzieren und es bedarf eines mitochondrialen Verstärkermechanismus. Hierzu wird das pro-apoptotische BH3-*only* Protein BID durch Caspase 8 gespalten. Aktiviertes BID transloziert ins Mitochondrium und induziert letztendlich die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (Igney et al., 2002). Über die Bildung des Apoptosoms trägt dieser Mechanismus zur Aktivierung von Effektorcaspasen in Typ II-Zellen bei (Mahalingam et al., 2009).

1.2.2 Die TRAIL-Rezeptoren

TRAIL ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie, das durch Bindung an Todesrezeptoren Apoptose induzieren kann (LeBlanc et al., 2003). Bisher sind fünf verschiedene Rezeptoren bekannt. Die TRAIL-Rezeptoren-1 und -2, auch DR4 und DR5 genannt, besitzen zytoplasmatische Todesdomänen und können dadurch den Apoptosesignalweg aktivieren. Die TRAIL-Rezeptoren-3 und -4, auch DcR1 und DcR2 genannt, sind Decoy-Rezeptoren, da ihre extrazelluläre Domäne zwar in Homologie zu der von DR4 und DR5 aufgebaut ist, eine intrazelluläre Domäne jedoch fehlt. Der fünfte TRAIL-Rezeptor, der sogenannte Osteoprotegrin, ist ein sekretierter Rezeptor, der jedoch nur eine sehr niedrige Affinität für TRAIL besitzt (Mahalingam et al., 2009). Innerhalb der TNF-Familie zeichnet sich TRAIL durch eine tumorselektive zytotoxische Wirkweise aus (Ashkenazi et al., 1999).

1.2.3 Das S-Phase Kinase-assoziierte Protein 2 (SKP2)

Das Onkogen S-Phase Kinase-assoziierte Protein 2 (SKP2) ist ein F-Box-Protein, das in den meisten humanen Tumoren überexprimiert wird. SKP2 wirkt als Rezeptorkomponente des SKP1-Cullin-F-box-Protein- (SCF-) Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Seine onkogene Funktion wird durch die Ubiquitinierung und Degradierung von Proteinen wie den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p57^{Kip2} oder dem Retinoblastoma-like 2 (p130) Protein vermittelt (Frescas et al., 2008; Nakayama et al., 2005; Hershko, 2008). In Pankreaskarzinomzellen wird das *SKP2*-Gen durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und NF- κ B-Signalwege aktiviert (Reichert et al., 2007; Schneider et al., 2006). Außerdem wurde

in etwa einem Drittel aller Pankreaskarzinome ein hohes SKP2-Expressionsniveau beobachtet, wobei die hohe SKP2-Expression ein unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose ist (Einama et al., 2006).

1.3 Histondeacetylasen (HDACs)

Histondeacetylasen (HDACs) regulieren über reversible Deacetylierung die Expression und Aktivität zahlreicher Proteine, die sowohl bei der Initiierung als auch der Progression von Karzinomen involviert sind. Entsprechend phylogenetischer Analysen und Sequenzhomologien können sie in die Klasse I bis IV Deacetylasen eingeteilt werden. Die HDACs 1, 2, 3 und 8 sind den Hefen Rpd3 homolog und repräsentieren die Klasse I. Der Klasse II gehören die den Hefen Hda1 homologen Enzyme HDAC 4, 5, 6, 7, 9 und 10 an. Sie wird entsprechend der Anzahl ihrer katalytischen Domänen unterteilt. Die HDACs 4, 5, 7 und 9 haben eine katalytische Domäne und werden in die Klasse IIa eingeteilt, die HDACs 6 und 10 haben zwei katalytische Domänen und bilden die Klasse IIb (Schneider et al., 2010). HDAC11 wird der Klasse IV zugeordnet, da sie Ähnlichkeit mit den Klassen I und II besitzt. Abgesehen von HDAC3 sind die HDACs der Klasse I vor allem im Kern lokalisiert, wohingegen Klasse II-Enzyme erst nach spezifischer Stimulation in den Kern wandern. Im Gegensatz zur Zink-abhängigen Katalyse der Klasse I, II und IV-Enzyme, setzen die Klasse III Deacetylasen (SIRT 1-7) NAD^+ als Kofaktor ein (Yang et al., 2008; Haberland et al., 2009).

Die ersten identifizierten Substrate der HDACs sind Histone. HDACs deacetylieren die ϵ -Aminogruppe der Lysine im N-Terminus der Histone, was zu einer Verdichtung des Chromatingerüsts (Heterochromatin) und meist zu einer Suppression der Genexpression führt (Yang et al., 2008; Haberland et al., 2009). Im Gegensatz zu HDACs führt die Histon-Acetyltransferase-vermittelte Acetylierung der N-terminalen Lysinreste von Histonen zu einer offenen Chromatinstruktur (Euchromatin) und transkriptioneller Aktivierung. Spezifische Muster von Histonacetylierung und -deacetylierung beeinflussen andere post-translationelle Histonmodifizierungen, welche den sogenannten „Histon-Code“ generieren (Jenuwein et al., 2001; Glozak et al., 2007). Zum Beispiel ist die Acetylierung des Lysins 9 des Histons H3 ein Zeichen aktiver Transkription. Phylogenetische Analysen zeigen, dass sich die klassischen HDACs vor den Histonproteinen entwickelt haben (Schneider et al., 2010). Daher wird eine stetig wachsende Anzahl von HDAC-Substraten beschrieben, die keine

Histone sind. Viele dieser Proteine sind Transkriptionsfaktoren wie p53, NF- κ B und STATs. Deshalb können Veränderungen im Transkriptom unter der Behandlung mit HDAC-Inhibitoren (HDACI) durch eine direkte Modulation des „Histon-Codes“ oder als Konsequenz einer indirekten Modulation der Transkriptionsfaktoraktivität hervorgerufen werden (Schneider et al., 2010; Witt et al., 2009; Buchwald et al., 2009; Spange et al., 2009).

Da HDACs an der Kontrolle von Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration und Angiogenese von Krebs beteiligt sind, bilden sie eine attraktive therapeutische Zielgruppe (Glozak et al., 2007). So wird der HDACI Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) seit 2006 in der Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms verwendet (Marks, 2007; Xu et al., 2007).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

TNF-related apoptosis inducing ligand- (TRAIL-) Agonisten sind vielversprechende tumorzellspezifische Therapeutika, welche sich in verschiedenen Studien durch eine überaus gute Verträglichkeit auszeichnen (Kuijlen et al., 2010; Trarbach et al., 2010; Ashkenazi et al., 2008). Ihre therapeutische Effektivität wird jedoch in vielen Tumorzellen durch eine Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose reduziert, deren molekulare Mechanismen bisher noch nicht ausreichend verstanden werden. Auch in vielen Pankreaskarzinomzellen wurde eine TRAIL-Resistenz beschrieben (Schneider et al., 2008; Sahu et al., 2011; Wang et al., 2007). Seit längerem ist bekannt, dass das S-Phase Kinase-assoziierte Protein 2 (SKP2) bei der Zellzyklusregulation eine bedeutende Position einnimmt. Neuere Arbeiten lassen jedoch auf Zellzyklus-unabhängige Funktionen schließen (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003; Kitagawa et al., 2008). In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob SKP2 in Pankreaskarzinomzellen an der Regulation von Apoptose beteiligt ist.

Histondeacetylasen (HDACs) werden in vielen soliden Tumoren überexprimiert. Obwohl pan-HDAC-Inhibitoren in vielen Tumoren für TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisieren, sind die daran beteiligten HDAC-Isoformen nicht bekannt. Da die HDAC2 in Pankreaskarzinomen überexprimiert und an der Regulation der intrinsischen Therapieresistenz beteiligt ist, sollte die Funktion von HDAC2 in extrinsischen Apoptosewegen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Log DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammonium persulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Rad Protein-Assay Farbstoff Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Blotting Grade – Blocker – Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Butylhydroxyanisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMEM Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Etylendiamintetraessigsäure)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Etoposid	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst Reagenz H33342	EMD Biosciences, San Diego, CA, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P40 (NP40)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Oligofectamin™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Passiv-Lyse-Puffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TRAIL, Human, Recombinant, E.coli	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Valproinsäure (VPA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biopur Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cyro Tubes	Nunc Brand Products, Naperville, IL, USA
Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Micro Amp TM optical 96-well Reaction-Plate	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Neubauerzählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,65 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-lock Reaktionsgefäße Biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schlauchfolie	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Whatman [®] -Paper	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellkulturverbrauchsmaterialien (Flaschen, Schalen, well-Platten, Röhrchen)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen, Schweiz, Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Zellschaber	TPP [®] AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Hersteller
Caspase-Glo TM 3/7-Assay	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Renilla-Luciferase-Assay System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA
TOPO TA Cloning [®] Kit, Dual Promotor, pCRII [®] -TOPO [®] Vector	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe B.V., EH Breda, Niederlande
BD FACSCalibur™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CO ₂ -Begasungsbrutschrank HERAcell®240	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Dewar-Transportgefäß, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf 5432 Mixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Folienschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Galaxy Argon Plus	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Geldokumentationssystem Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelektrophoresekammer Sunrise	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Hofer™ Dual Gel Caster	Amersham, Freiburg, Deutschland
Hofer™ HE33 Mini Horizontal Submarine Unit	Amersham, Freiburg, Deutschland
Hofer™ SE 250 /SE 260	Amersham, Freiburg, Deutschland
Lumat LB 9507	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Mikrowelle	Siemens AG, München, Deutschland
Multipipette stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop NP-10 Fluorospektrometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg, Deutschland
PCR-Maschinen TPersonal/TGradient	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter pH 521	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Power Supply EPS 601	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Präzisionswaage Kern, FTB	Gottlieb Kern & Son GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Semi-Dry-Blottingapparatur	Kreutz, Reiskirchen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Vortex VF2	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Zentrifuge Avanti J25	Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Eingesetzte Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
Laufpuffer (10fach)	35 mM SDS, 0,25 M TRIS/HCl, 2 M Glycin
Transferpuffer	39 mM Glycin, 48 mM TRIS/HCl, 0,037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Ethanol, pH 8,3
PBS (10fach)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 40 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	0,35 M SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,3 M TRIS/HCl, 0,7 mM Bromphenolblau Na-Salz, 5 % (w/v) Mercaptoethanol, pH 6,8
IP-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,9), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 0,5 % (v/v) NP40, 10 % (v/v) Glycerol
Blocking-Puffer	5 % (v/v) Magermilchpulver, 0,1 % (v/v) NP40, gelöst in PBS
Waschpuffer	1x PBS, 0,1 % (v/v) NP40 oder 1x PBS, 0,1 % (v/v) TWEEN 20
<i>Stripping</i> -Puffer (Odyssey)	25 mM Glycin, 2 % (w/v) SDS, pH 2
TAE-Puffer (50fach)	2 M TRIS, 100 mM EDTA, 5,71 % (v/v) Essigsäure (100 %), pH 8,5

Tabelle 6: Puffer für FACS-Analyse

Puffer für FACS-Analyse	Zusammensetzung
Propidiumjodid-Färbepuffer	NaCitrate 0,1 % (w/v), Triton X-100 0,1 % (v/v), Propidiumjodid 50 µg/ml, pH 6,8

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper für Western Blot

Tabelle 7: Primäre Antikörper für Western Blot

AK	Typ	Wirt	Verdünnung
DR4	ProScience Inc., Poway, CA, USA	Hase	1:500
DR5	ProScience Inc., Poway, CA, USA	Hase	1:500
HDAC2 (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1:500
HDAC2 (monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Maus	1:500
SKP2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Maus	1:250
XIAP	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	Ziege	1:500
clAP1	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	Hase	1:500
clAP2	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	Ziege	1:500
Survivin	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	Hase	1:250
BID	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:500
Caspase 8	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Maus	1:500
BCL-X _L	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:250
MCL1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1:500
Flip	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Hase	1:250
PARP	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	Maus	1:250
HDAC1	Upstate/Millipore, Billerica, MA, USA	Maus	1:250
β-Actin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	Maus	1:2000

Sekundäre Antikörper für Western Blot

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper für Western Blot

AK	Typ	Verdünnung
AlexaFluor680-coupled	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:5000
IRDye™800-coupled	Rockland Inc., Gilbertsville, PA, USA	1:5000

Primärer Antikörper für FACS-Analyse

Tabelle 9: Primärer Antikörper für FACS-Analyse

AK	Typ	Konzentration
DR5	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	2 µg/ml

Sekundärer Antikörper für FACS-Analyse

Tabelle 10: Sekundärer Antikörper für FACS-Analyse

AK	Typ	Verdünnung
PE-conjugated goat anti-mouse F(ab') ₂ anti-IgG+IgM	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England	1:100

2.1.7 siRNA (small interfering RNA)

Die siRNAs wurden bei Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Die Lagerung erfolgte in einem Stock von 40 µM bei -80 ° C.

Die verwendeten siRNAs hatten folgende Zielsequenzen:

Tabelle 11: siRNA Zielsequenzen (Matrizenstrang)

Bezeichnung	Sequenz
Kontroll-siRNA	5' CAG UCG CGU UUG CGA CUG GdTdT 3'
HDAC2	5' GCC UCA UAG AAU CCG CAU GdTdT 3'
SKP2-3	5' GCA UGU ACA GGU GGC UGU UdTdT 3'
SKP2-1	5' GGG AGU GAC AAA GAC UUU GdTdT 3'
HDAC1	5' GCA GAU GCA GAG AUU CAA CdTdT 3'
NOXA	5' GGA AGU CGA GUG UGC UAC UdTdT 3'
Caspase 2-94	5' ACA GCU GUU GUU GAG CGA AdTdT 3'
Caspase 2-510	5' CUU CCA GCU GGC AUA UAG GdTdT 3'

2.1.8 Echtzeit-PCR-Primer

Tabelle 12: Echtzeit-PCR-Primer

Bezeichnung		Sequenz
Cyclophilin	Cyclo-FW	5' ATG GTC AAC CCC ACC GTG T 3'
	Cyclo-RV	5' TCT GCT GTC TTT GGG ACC TTG TC 3'
HDAC2	HDAC2-FW	5' AGC ATC AGG ATT CTG TTA CGT TAA TGA 3'
	HDAC2-RV	5' CAA CAC CAT CAC CAT GAT GAA TAT CT 3'
NOXA	NOXA-FW	5' CGG AGA TGC CTG GGA AGA A 3'
	NOXA-RV	5' CCA AAT CTC CTG AGT TGA GTA GCA 3'
HDAC1	HDAC1-FW	5' GCT CCA TCC GTC CAG ATA AC 3'
	HDAC1-RV	5' CTC AAA CAG GCC ATC GAA TA 3'

2.1.9 Primer für die Screening-PCR bei Klonierungen

Tabelle 13: Screening-PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz
M13 RV	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

2.1.10 Luciferase-Reportergen Analyse

Das 3 \times κB-Luc Reportergen wurde von Liptay et al. beschrieben (Liptay et al., 2003). Der HDAC2-Expressionsvektor wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. M. Göttlicher zur Verfügung gestellt. pcDNA3 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde eingesetzt um die transfizierte DNA-Menge konstant zu halten. Alle Plasmide wurden zur Verifizierung sequenziert (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland).

2.1.11 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden ausschließlich humane Karzinomzelllinien verwendet, welche von der ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) über LGC Promochem, Wesel, Deutschland bezogen wurden.

MiaPaCa2, Panc1 und PaTull Zellen wurden in DMEM Medium, DanG und BxPC3 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert. Das jeweiligen Medium wurde mit 10 % (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin versehen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 ° C und unter 5 % CO₂-Begasung.

2.2 Experimentalmethoden

Sämtliche Zellkulturversuche wurden als Triplikate durchgeführt. Außerdem wurde jedes Ergebnis durch mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente bestätigt.

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit den angegebenen Medien in Brutschränken. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden an Sterilwerkbänken durchgeführt. Um die Zellen zu passagieren und auszusäen, wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und vereinzelt. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer durchgeführt.

2.2.1.1 Chemische Hemmung von HDAC2

Als Klasse I HDAC-Inhibitor (HDACI) wurde Valproinsäure (VPA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. VPA wurde nach Herstellerangaben gelöst und bei -20 ° C gelagert. Vor Behandlung der Zellen wurde zunächst eine 1,5 mM Verdünnung hergestellt. Das alte Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für 24 Stunden auf den Zellen belassen.

2.2.1.2 Behandlung der Zellen mit *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)

Die Stimulierung von TRAIL-Rezeptoren erfolgte mit humanem rekombinantem TRAIL (EMD Biosciences, San Diego, CA; USA). Dieses wurde als Stock mit einer Konzentration von 100 ng/µl in PBS gelöst und bei -80 ° C aufbewahrt. Für die Behandlung der Zellen wurde TRAIL mit dem entsprechenden Medium weiter verdünnt. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit TRAIL und VPA wurde der Ansatz mit den verwendeten Konzentrationen in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Das alte Medium wurde von den Zellen abgesaugt, durch die Verdünnung ersetzt und für die angegebenen Zeiträume auf den Zellen belassen.

2.2.1.3 Hemmung der Transkription mit Actinomycin D

Die Hemmung der Transkription erfolgte mit Actinomycin D (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Dieses wurde als Stock mit einer Konzentration von 1 mg/ml in DMSO gelöst und bei -20 ° C aufbewahrt. Vor Behandlung der Zellen

wurde eine Verdünnung von 1 µg/ml mit dem entsprechenden Medium hergestellt. Dann wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für 2 Stunden auf den Zellen belassen.

2.2.1.4 siRNA-Transfektion

Die Aussaat der Zellen erfolgte 24 Stunden vor der Transfektion in folgender Zelldichte: In 96-*well*-Platten wurden 2000 Zellen pro *well*, in 12-*well*-Platten 20000 Zellen pro *well* und in 6-*well*-Platten 50000 Zellen pro *well* ausgesät. Zunächst wurden die Zellen mit Medium ohne FCS gewaschen um etwaige Serumrückstände zu entfernen. Dann wurden bei 96-*well*-Platten 80 µl, bei 12-*well*-Platten 400 µl und bei 6-*well*-Platten 800 µl serumfreies Medium vorgelegt.

Die Zellen wurden mit Hilfe von OligofectaminTM nach Angaben des Herstellers mit siRNA transfiziert. Pro *well* wurden 50 nM siRNA eingesetzt. Nach 5-minütiger Vorinkubation von OligofectaminTM mit Opti-MEM[®] wurde es zu dem Ansatz aus siRNA und Opti-MEM[®] gegeben. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde Medium mit 20 % (v/v) FCS zugegeben. Das Medium wurde am folgenden Tag durch frisches Medium mit 10 % (v/v) FCS ersetzt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für die entsprechenden Analysen verwendet.

2.2.1.5 Ganzzellextrakte

Um Ganzzellextrakte zu gewinnen wurden die Zellen vor der Ernte mit PBS gewaschen. Mit Hilfe von IP-Puffer wurden die Zellen lysiert. Sie wurden mit einem Zellschaber auf Eis abgekratzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und für 20 Minuten bei 13200 rpm und 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe der Methode nach Bradford wurde die Proteinmenge in den Proben bestimmt. In eine Mikrotiterplatte wurden je *well* 300 µl des 1:5 verdünnten Bradford-Reagenzes gegeben. Aus Rinderalbumin (BSA) wurde eine Standardreihe erstellt. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde die Absorption der Farbreaktion im Mikroplatten-Absorptionsphotometer Anthos 2001 gemessen. Daraus konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

Durch entsprechende Verdünnung mit IP-Puffer wurde in allen Proben eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95 ° C erhitzt. Anschließend wurden die Extrakte bei -80 ° C weggefroren.

2.2.2 Western Blot

Mittels vertikaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine aus Ganzzellextrakten elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Trenngele wurde je nachdem, in welchem Bereich das Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine lag, zwischen 7,5 und 15 % Acrylamid eingesetzt:

Tabelle 14: Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel
(Mengen beziehen sich auf 5,5 x 8,5 x 0,075 cm Gele)

	Trenngele					Sammelgel
	7,5 %	9 %	10 %	12 %	15 %	4 %
ddH ₂ O	2,45 ml	2,35 ml	2,05 ml	1,7 ml	1,2 5ml	1,5 ml
Trenngel-/Sammelgelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	650 µl
Acrylamidlösung 30 %	1,25 ml	1,35 ml	1,65 ml	2,0 ml	2,5 ml	375 ml
SDS 10 %	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
APS 10 %	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	12,5 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	5 µl

Begonnen wurde mit der Vorbereitung des Trenngels. Nach Zugabe von APS und TEMED startete die Polymerisation. Zügig wurde der Ansatz in eine *Hofer™ Dual Gel Caster* pipettiert und mit Isopropanol überschichtet um einen glatten Abschluss an der Oberfläche sicherzustellen. Nach etwa 20 Minuten war das Gel polymerisiert, das Isopropanol konnte entfernt und durch den Sammelgelansatz ersetzt werden. Ein Probenkamm wurde eingesetzt. Nach weiteren 20 Minuten wurde dieser entfernt und die entstandenen Probenaschen wurden mit Laufpuffer gespült. Die Ganzzellextrakte wurden auf Eis aufgetaut und anschließend 6 Minuten bei 95 ° C erhitzt. Die Proben wurden aufgetragen, mit Laufpuffer überschichtet und bei einer Spannung zwischen 80 und 120 V in einer Gel-Laufapparatur *Hofer™ SE 250* bzw. *SE 260* aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Immobilon-P PVDF Membran nach dem *Semi-Dry-Verfahren*. Zur Aktivierung wurde die Membran in

Methanol geschwenkt, in ddH₂O gewaschen und in Transferpuffer gelegt. Auch das Trenngel wurde mit Transferpuffer abgespült. Je nach Proteingröße wurde zwischen 20 und 50 Minuten bei 0,8 mA/cm² geblottet.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nach dem Proteintransfer für 45 Minuten in *Blocking-Puffer* geschwenkt, welcher aus in Waschpuffer 5 % (w/v) gelöstem Magermilchpulver hergestellt wurde. Der Primärantikörper wurde in 3 ml *Blocking-Puffer* verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt. Der sekundäre, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 in *Blocking-Puffer* verdünnt und für 60 Minuten auf der Membran bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Es folgte eine neue Reihe von Membranwaschungen wie oben beschrieben, unter Ausschluss von Licht. Nun konnte mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System die Fluoreszenzintensität bei 700 bzw 800 nm Wellenlänge abgebildet werden.

Um auf einer Membran weitere Proteine zu detektieren wurde die Membran zur Lösung gebundener Antikörper bei Raumtemperatur für 20 Minuten in *Stripping-Puffer* geschwenkt, mit Waschpuffer abgespült und anschließend für 45 Minuten erneut mit *Blocking-Puffer* geblockt.

2.2.3 Hoechst-Färbung

Das Hoechst-Reagenz H33342 färbt DNA an, die anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden kann.

In 96-*well*-Platten wurde 24 Stunden nach Aussaat von 2000 Zellen eine Transfektion mit siRNA durchgeführt. 48 Stunden später wurden die Zellen für den jeweils angegebenen Zeitraum mit TRAIL behandelt. Das Hoechst- Reagenz wurde in einem 2 mM Stock gelagert und in einer Endverdünnung von 1:500 zu dem Medium gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation stellte sich die Kernstruktur in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Die Identifikation apoptotischer Zellen gelang durch die Darstellung der für die Apoptose charakteristischen kondensierten DNA. Zur Quantifizierung des Anteils apoptotischer Zellen wurden in zwei bis drei Gesichtsfeldern 300 bis 500 Zellen und gleichzeitig alle apoptotisch veränderten Zellen gezählt.

2.2.4 MTT-Zellviabilitätsassay

Es wurden auf einer 96-*well*-Platte 2000 Zellen je *well* ausgesät. Es folgte entweder eine siRNA-Transfektion oder eine Inkubation mit VPA wie unter 2.2.1.4 und 2.2.1.1 beschrieben. 48 Stunden später wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum mit TRAIL behandelt. Anschließend wurde der Assay gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. In jedes *well* wurden 10 µl des MTT-Reagenzes zum Medium pipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium vorsichtig abpipettiert. Die Lösung des Präzipitats erfolgte in 200 µl einer 1:1 Verdünnung aus DMSO und Ethanol. Nun konnte mit Hilfe des Mikroplatten-Absorptionsphotometer Anthos 2001 die spektrophotometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Die Referenzwellenlänge war 650 nm.

2.2.5 Luciferase-Reportergen-Assay

Für diesen Assay wurden 20000 Zellen je *well* einer 12-*well*-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurde eine Ko-Transfektion mit 500 ng pDNA und 50 nM siRNA durchgeführt. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit Medium ohne FCS gewaschen und es wurden 400 µl Medium vorgelegt. Die Transfektion des Plasmides und der siRNA erfolgte mit OligofectamineTM nach Angaben des Herstellers. Nach fünfminütiger Vorinkubation des Master Mixes aus OligofectamineTM und OptiMEM wurde er zum Transfektionsansatz aus siRNA, pDNA und OptiMEM gegeben. Nach weiteren 20 Minuten Inkubation wurden 100 µl des Ansatzes in jedes *well* gegeben. 4 Stunden später wurde Medium mit 20 %igem FCS zugegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 %igem FCS. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen entweder weitere 24 Stunden später geerntet oder für den angegebenen Zeitraum mit TRAIL behandelt und anschließend lysiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, für 15 Minuten in, im Verhältnis 1:5 verdünntem, Passiv-Lyse-Puffer gelöst, geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Lysat für 20 Minuten bei 4 ° C und 13200 rpm zentrifugiert. Die Luciferase-Aktivität konnte mit einem Renilla-Luciferase-Assay System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) am LB 9501 Luminometer gemessen werden.

2.2.6 Caspase-Assay

Zur Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität der Zellen wurde ein *Caspase-Glo™ 3/7-Assay* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) durchgeführt. Das Caspase-Reagenz wurde nach Herstellerangaben gemischt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 ° C lichtgeschützt gelagert.

Für diesen Assay wurden auf einer 96-*well*-Platte 2000 Zellen je *well* ausgesät. 24 Stunden später folgte eine siRNA-Transfektion wie unter 2.2.1.4 beschrieben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum mit TRAIL bzw. TRAIL und Actinomycin D behandelt.

Anschließend wurden je *well* 100 µl des Caspase-Reagenzes pipettiert. Während einer einstündigen Inkubation kam es zur Zellyse, gefolgt von Caspase-Spaltung des Substrats, was ein freies Aminoluciferin freisetzte. Dieses wurde durch eine Luciferase gespalten und rief ein Lumineszenzsignal hervor, welches mit dem *FLUOstar OPTIMA Microplate Reader* gemessen wurde. Dieses Lumineszenzsignal war proportional zur Caspase 3/7-Aktivität.

2.2.7 FACS-Analyse

Diese Methode wurde zum einen zur Zellzyklusanalyse und zum anderen zur Untersuchung der Oberflächenexpression des DR5-Rezeptors auf MiaPaCa2 Zellen genutzt.

2.2.7.1 Zellzyklusanalyse

Um die verschiedenen Zellzyklusphasen einer Zelle unterscheiden zu können, wurde die DNA mit Propidiumiodid angefärbt. So können die Zellen bei einer bestimmten Intensität detektiert und einer Phase des Zellzyklus zugeordnet werden.

24 Stunden vor Transfektion mit *SKP2*-spezifischer siRNA wurden 50000 Zellen je *well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgte wie unter 2.2.1.4 beschrieben.

Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, in 600 µl PBS aufgenommen und bei 1,8 rpm für 10 Minuten bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nochmals in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Propidiumiodid-Färbepuffer resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation

unter Ausschluss von Licht erfolgte eine Fixierung mittels Formaldehyd. Die Messung erfolgte mit Hilfe der CellQuestPro-Software am BD FACSCalibur™-Durchflusszytometer.

2.2.7.2 DR5-Oberflächenexpressionsanalyse

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression des DR5-Rezeptors wurden die Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben transfiziert. Nach 48 Stunden wurden sie abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und in PBS mit 2 µg/ml Primärantikörper beziehungsweise Kontroll-Immunglobulin G resuspendiert. Die Zellen wurden für 60 Minuten auf Eis gefärbt, anschließend mit 3 ml kaltem PBS gewaschen und für 60 Minuten auf Eis lichtgeschützt mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit 3 ml kaltem PBS wurden die Zellen in 1 ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert und 10000 Zellen pro Probe wurden mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie unter Verwendung des Galaxy Argon Plus Zytometers analysiert.

2.2.8 Isolierung von RNA

Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben mit siRNA transfiziert. Um die RNA zu ernten, wurde das Medium abgesaugt und unter einem Abzug wurden die Zellen auf Eis mit 100 µl RLT-Puffer und 1 µl β-Mercaptoethanol pro *well* lysiert, mit einem Zellschaber zügig abgekratzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 ° C gelagert.

Die Extraktion der RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen nach Protokoll des Herstellers. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und Maximalgeschwindigkeit (13200 rpm). Die auf Eis aufgetauten Zelllysate wurde zunächst in dem *QIAshredder Spin Columns* 2 Minuten lang zentrifugiert. Um optimale Bindebedingungen an die Silicagel-Membran herzustellen, wurden dem homogenisierten Lysat 600 µl 70 %-igen Ethanol zugesetzt. 600 µl des Lysats wurden in eine *RNeasy Mini* Säule pipettiert und für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das restliche Lysat wurde auf die Säulen gegeben und zentrifugiert. Nun wurde die an die *RNeasy Silicagel*-Membran gebundene RNA mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Um auch kleinste DNA-Reste zu eliminieren, wurden 80 µl eines DNase Inkubations Mix, bestehend aus 10 µl DNase I Stock-Lösung und 70 µl RDD-Puffer, mittig auf die Membran pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine

weitere Waschung mit 350 µl RW1-Puffer, gefolgt von 30 Sekunden Zentrifugation und zwei weiteren Spülungsschritten mit RPE-Puffer. Nach der letzten Zugabe von RPE-Puffer wurde für 2 Minuten zentrifugiert. Es folgte eine Zentrifugation ohne Pufferzusatz für eine weitere Minute, um eine ausreichende Entfernung des Ethanols sicherzustellen. Zum Eluieren der isolierten RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation wurde das Reaktionsgefäß eine Minute lang zentrifugiert und sofort auf Eis gelagert.

Die RNA-Menge wurde sogleich mittels photometrischer Bestimmung der Absorption mit Hilfe des NanoDrop-Fluorospektrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.2.9 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Gegensatz zu einer gewöhnlichen PCR wird bei der semiquantitativen nur eine gewisse Menge an cDNA amplifiziert. Durch die Wahl einer Zyklenzahl, bei der die Amplifizierung noch im linearen Bereich ist, können Unterschiede in der Menge des PCR-Produkts semiquantitativ dargestellt werden. Als Kontrolle wurde Cyclophilin eingesetzt.

Die RNA wurde wie unter 2.2.8 beschrieben isoliert (RNeasy Kit, Qiagen) und in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit Hilfe der *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Ein Ansatz setzte sich zusammen aus 5 µl 10xRT-Puffer, 11 µl dNTP, 10 µl MgCl₂, 2,4 µl Hexamere, 1 µl RNA-Inhibitor, 1,25 µl Multiscribe RT (50 U/µl), 1,0 µg RNA und einer entsprechenden Menge ddH₂O. Die cDNA-Synthese erfolgte in einer PCR-Maschine nach folgendem Programm: 10 min bei 25 ° C, 1 h bei 48 ° C, 5 min bei 95 ° C und Pause bei 4 ° C.

Daraufhin konnte die cDNA amplifiziert werden. Der Master Mix setzte sich aus 2,25 µl FW-Primer (10 µM), 2,25 µl RV-Primer (10 µM), 5,5 µl H₂O und 12,5 µl REDTaq zusammen. In jedes Reaktionsgefäß wurden 22,5 µl Master Mix und 2,5 µl cDNA pipettiert. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: 3 min bei 95 ° C, 45 s bei 95 ° C, 45 s bei 60 ° C, 60 s bei 72 ° C, Durchführung der Schritte 2 bis 4 28-mal, dann 10 min bei 72 ° C. Nun wurde der amplifizierte Ansatz auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde in einer Mikrowelle 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgeköcht. Unter Rühren ließ man das Gel abkühlen und nach Erreichen von etwa 55 ° C wurde es in die

Gießvorrichtung gegossen. Das erkaltete Gel wurde in die mit TAE-Puffer und Ethidiumbromid gefüllten Laufkammern gelegt. In die jeweilige Kammer wurden 20 µl Probe sowie ein DNA-Marker aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V für 1,5 Stunden. In einem Geldokumentationssystem konnten die Nukleinsäurebanden durch UV-Licht bei 302 nm detektiert werden.

2.2.10 Klonierung der Standardreihen für die quantitative Echtzeit-PCR

Zu Beginn wurde mit den entsprechenden Echtzeit-PCR-*Primern* ein PCR-Produkt hergestellt. Für den Master Mix wurden 2 µl FW-*Primer* (10 µM), 2 µl RV *Primer* (10 µM), 25 µl REDTaq, 19 µl PCR-H₂O zusammenpipettiert. Dann wurden 2 µl cDNA (20ng/µl) zugegeben. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: 3 min bei 95 ° C, 45 s bei 95 ° C, 45 s bei 60 ° C, 1 min bei 72 ° C, Durchführung der Schritte 2 bis 4 40-mal, dann 10 min bei 72 ° C. Anschließend wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert, ob es sich um ein einziges PCR-Produkt handelt.

Nun wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des *TOPO TA Cloning*[®]-Kits gemäß Herstellerangaben in chemisch kompetente Top10-*E. coli* Bakterien eingebracht. Zunächst wurde der Ansatz für die *TOPO*[®] *Cloning* Reaktion mit 4 µl des PCR-Produkts, 1 µl Salzlösung und 1 µl *TOPO*[®]-Vektor pipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch das PCR-Produkt in das Plasmid ligiert wurde. Als nächstes wurden 2 µl Plasmid zu den *E. coli* Bakterien pipettiert und der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42 ° C und weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Durch diese Schockerhitzung soll das Eindringen des Plasmids ins Bakterium erleichtert werden. Es wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei 37 ° C wurden die Zellen auf LB-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 ° C bebrütet. Kanamycin wurde als Stock mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelagert und mit einer Verdünnung von 1:1000 zum LB-Agar gegeben.

Am nächsten Tag wurden einzeln stehende Kolonien gepickt und zusammen mit 50 µl PCR-Wasser für 5 Minuten bei 95 ° C inkubiert. Das Ergebnis wurde mit Hilfe einer *Screening-PCR* kontrolliert (Master Mix: 1 µl FW-*Primer* (10 µM), 1 µl RV-*Primer* (10 µM), 3 µl PCR-Wasser, 15 µl REDTaq). Um sicherzustellen, dass das PCR-Produkt richtig herum eingebaut ist, wurde in obigem Ansatz statt dem

FW-Primer ein M13-RV-Primer eingesetzt. Zusammen mit 10 µl Probe wurde eine PCR folgendermaßen durchgeführt: 3 min bei 95 ° C, 45 s bei 95 ° C, 45 s bei 72 ° C, 45 s bei 72 ° C, Durchführung der Schritte 2 bis 4 40-mal, dann 10 min bei 72 ° C. Nun wurde eine geeignete Kolonie ausgewählt und die DNA wie unter 2.2.11 beschrieben mittels Miniprep extrahiert.

Für die Durchführung einer Echtzeit-PCR wurde mit Hilfe der gewonnenen DNA eine Standardreihe hergestellt. Dazu musste nach Messung der DNA-Konzentration und unter Kenntnis der Anzahl der Basenpaare des entstandenen Plasmids die Molekülmenge pro µl berechnet werden:

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

So wurden Standards mit 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^3$, 800, 160, 32 und 6,4 Molekülen/µl zu je 500µl in TE-Puffer verdünnt.

2.2.11 Reinigung der bakteriellen Plasmid-DNA mittels Miniprep

Gemäß dem Herstellerprotokoll (QIAfilter Plasmid Purification Handbook) von QIAGEN wurde das Plasmid mittels einer Miniprep aufgereinigt. Die ausgewählte Kolonie wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit 5 ml LB-Medium und 5 µl Kanamycin über Nacht bei 37 ° C bebrütet.

Am nächsten Tag wurde das Zentrifugenröhrchen bei 4 ° C für 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die abgesetzten Zellen wurden in 250 µl Puffer P1 gut resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 und 350 µl Puffer P3 folgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 13200 rpm. Der Überstand wurde in eine *QIAprep Spin Column* überführt, welche dann für 60 s bei 13200 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl Puffer PB und 750 µl Puffer PE, wobei dazwischen immer für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde. Zur Entfernung etwaiger Flüssigkeitsreste wurde nochmals für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die *QIAprep Spin Column* in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Zum Eluieren der DNA wurden 30 µl EB-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert, eine Minute inkubiert und eine Minute bei 13200 rpm zentrifugiert. Nun konnte die Konzentration der gewonnenen DNA mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von

260 nm mit dem NanoDrop-Fluorospektrometer gemessen werden. Anschließend wurde die Probe bei -20 ° C weggefroren.

2.2.12 Echtzeit-PCR

Zunächst wurde wie unter 2.2.8 beschrieben RNA geerntet, isoliert und photometrisch gemessen. Anschließend wurde sie in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.9) und im Verhältnis 1:5 mit TE-Puffer verdünnt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Der einfache Ansatz für den Master Mix setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 12,5 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* Puffer, 0,25 µl *FW-Primer* (10µM), 0,25 µl *RV-Primer* (10µM) und 7 µl PCR-Wasser. In die *Micro Amp™ optical 96-well Reaction-Plate* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) wurden je *well* 20 µl des Master Mixes und 5 µl cDNA pipettiert, wobei alle Versuche im Triplikate erfolgten. Für die Standardreihe wurde statt cDNA die entsprechende Verdünnung der Standardreihe eingesetzt. Am Ende wurde die Platte mit einer speziellen Folie versiegelt und 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Echtzeit-PCR mit dem *StepOne™ Real Time PCR System* nach vorheriger Programmierung der *StepOne™ Software v2.0* durchgeführt (10 min bei 95 ° C, 15 s bei 95 ° C, 1 min bei 60 ° C, 15 s bei 95 ° C, Durchführung der Schritte 2 bis 4 40-mal, dann 1 min bei 60 ° C, dann Schmelzkurvenanalyse bei 60 ° C + 0,3 ° C/min, 15 s bei 95 ° C). Die Software errechnete nach Durchführung der Echtzeit-PCR die Molekülmengen jeder Probe. Cyclophilin wurde als Kontrolle eingesetzt, da es unter allen Bedingungen gleich exprimiert wird. Zur Normalisierung wurde die errechnete Molekülmenge zunächst durch den Wert von Cyclophilin dividiert. Nun konnte die relative Veränderung der mRNA-Expression ermittelt werden.

2.3 Statistische Analysen

Die Programme GraphPad Prism4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), Canvas 7.0 (Daneba Systems, Inc., jetzt ACD Systems of America, Inc., Miami, FL, USA) und Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) dienten der Erstellung von Abbildungen und der statistischen Analyse. Bei sämtlichen Daten wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte gezeigt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde ein zweiseitiger Student t-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 SKP2 kontrolliert die G1-Phasenprogression und die Resistenz von MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Signalwege, die die SKP2-Transkription aktivieren zu einer Akzeleration der G1/S-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen führen (Reichert et al., 2007; Schneider et al., 2006; Schneider et al., 2007).

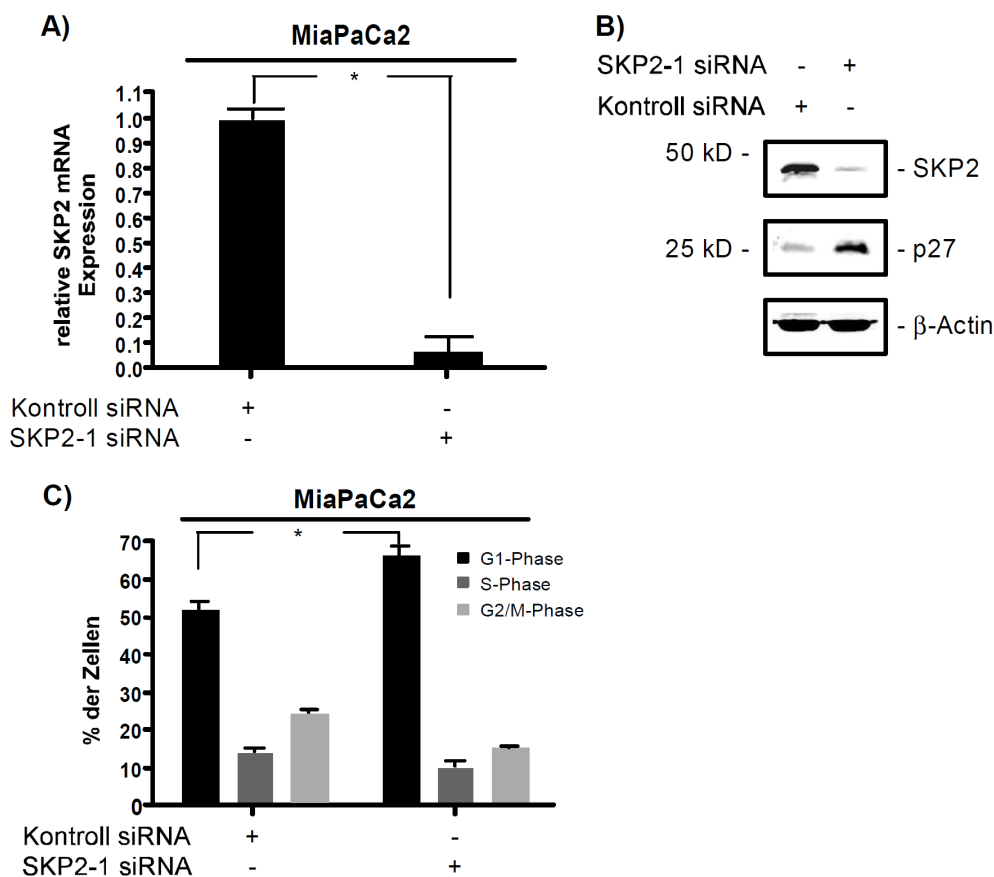


Abbildung 1: SKP2-siRNA induziert einen G1-Phasenarrest des Zellzyklus in MiaPaCa2 Zellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll- und SKP2-spezifischer (SKP2-1) siRNA transfiziert. (A) Quantitative SKP2-mRNA-Expressionsanalyse. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. Die mRNA-Menge von SKP2 wurde mittels Echtzeit-PCR quantifiziert und gegenüber der Cyclophilinmenge normalisiert (*p<0,05 im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Western Blot Analyse von SKP2 und p27^{Kip1}. β-Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung (C) Färbung der Zellen mit Propidiumiodid und FACS-Analyse. Der Anteil der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase ist jeweils angegeben (* p<0.05 im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Um die Rolle von SKP2 bei der Regulation des Zellzyklus in dem untersuchten Modell nachzuweisen, wurde die RNA-Interferenz Technologie eingesetzt. 48 Stunden nach Transfektion einer *SKP2*-spezifischen siRNA war die *SKP2*-mRNA- (Abbildung 1A) und Proteinexpression (Abbildung 1B) verglichen mit Kontroll-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen deutlich vermindert. Vereinbar mit einer wichtigen Rolle von SKP2 bei der Zellzyklusregulation, konnte eine erhöhte Expression des SKP2-Targets p27^{Kip1} (Abbildung 1B) und eine nachfolgende Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abbildung 1C) beobachtet werden.

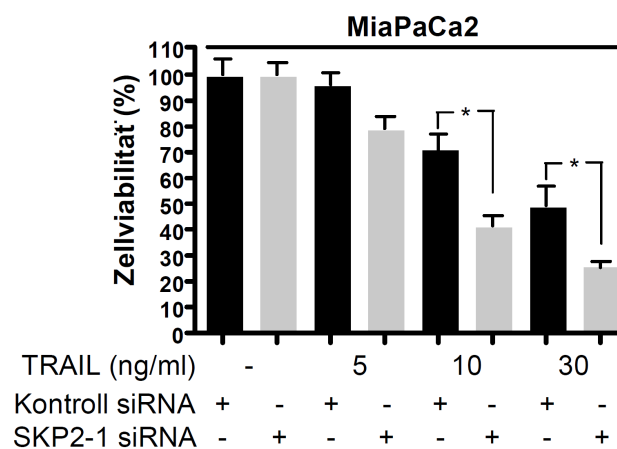


Abbildung 2: SKP2 kontrolliert den TRAIL-abhängigen Viabilitätsverlust von MiaPaCa2 Zellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *SKP2*-spezifischer (*SKP2-1*) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit steigenden TRAIL-Dosen behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Duktale Pankreaskarzinomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus sind besonders sensitiv für TRAIL-induzierte Apoptose (Retzer-Lidl et al., 2007). Daher wurden die Zellen nach Herunterregulation von SKP2 mit TRAIL behandelt. Nach SKP2-Depletion weisen die Zellen einen erhöhten TRAIL-induzierten Viabilitätsverlust auf (Abbildung 2). Dieser ist bedingt durch eine deutlich erhöhte Apoptoserate (Abbildung 3A-C).

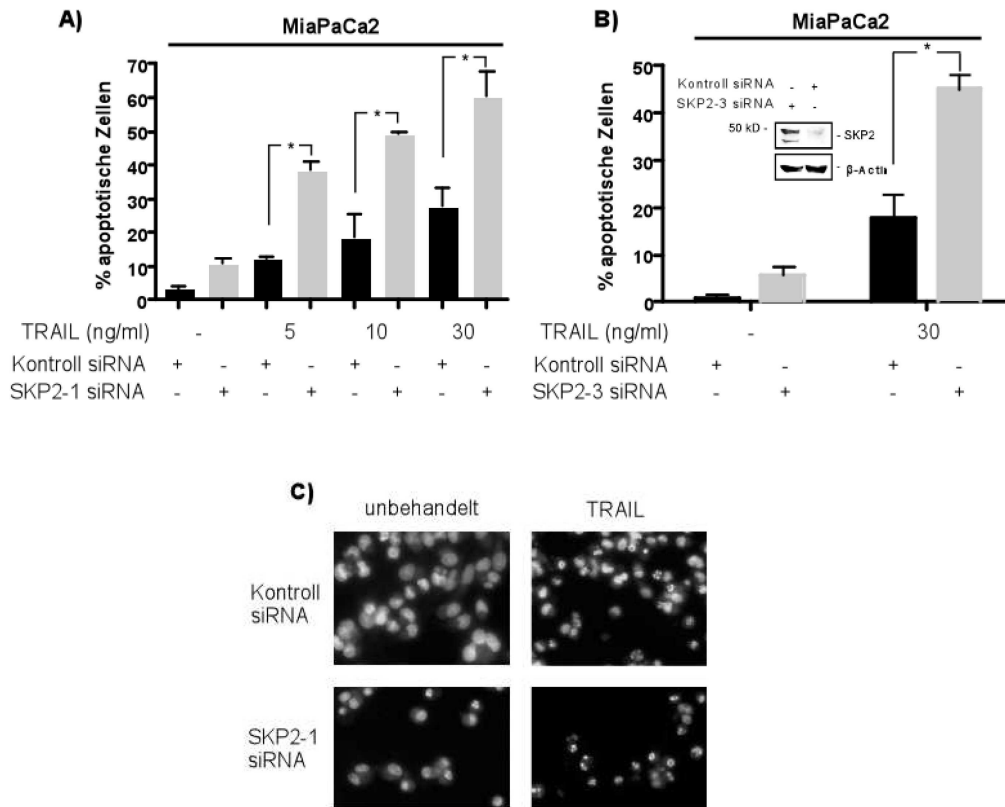


Abbildung 3: SKP2 kontrolliert die TRAIL-induzierte Apoptose in MiaPaCa2 Zellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *SKP2*-spezifischer (*SKP2-1* (A, C), *SKP2-3* (B)) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Die Zellen wurden für 24 Stunden mit steigenden TRAIL-Dosen behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Apoptotische Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst-Färbung quantifiziert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Western Blot Analyse von SKP2 48 Stunden nach Transfektion. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Apoptotische Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst-Färbung quantifiziert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (C) Die Zellen wurden entweder für weitere 24 Stunden mit 30 ng/ml TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzmikroskopie (Originalvergrößerung 40fach) von MiaPaCa2 Zellen nach Anfärbung der Kerne mit Hoechst-Reagenz.

SKP2-depletierte MiaPaCa2 Zellen zeigen eine signifikant gesteigerte Aktivierung von Effektorcaspasen nach Behandlung mit TRAIL. So zeigt sich in SKP2-depletierten Zellen nach Behandlung mit TRAIL eine gesteigerte Spaltung des Caspase-Substrats Poly-(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP) (Abbildung 4A). Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde eine zweite *SKP2*-spezifische siRNA eingesetzt. Wieder führte der *SKP2-Knockdown* (Abbildung 3B) zu einer deutlichen Erhöhung der TRAIL-induzierten Apoptoserate (Abbildung 3B) und Caspase-Aktivierung (Abbildung 4B). Zusammen zeigen diese Daten, dass SKP2 an der Regulation der Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose beteiligt ist.

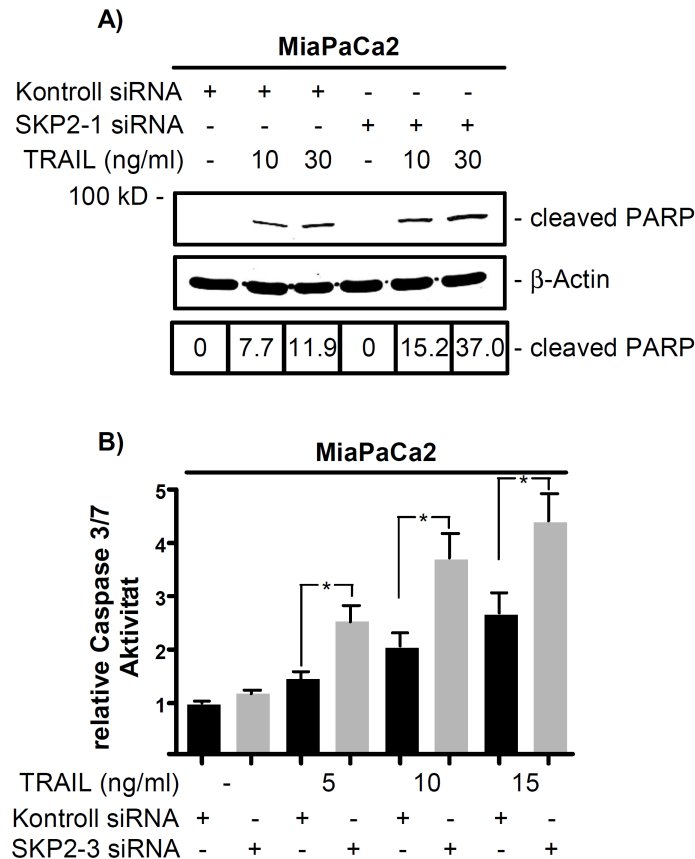


Abbildung 4: SKP2 kontrolliert die TRAIL-induzierte Aktivierung von Caspasen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder SKP2-spezifischer (*SKP2-1* (A), *SKP2-3* (B)) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit steigenden TRAIL-Dosen behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Western Blot Analyse der PARP-Spaltung. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. Die relative Expression von gespaltenem PARP ist angegeben. (B) MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben für weitere 2 Stunden mit TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Mittels eines Lumineszenz-Caspase-Assays wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.2 Die Kontrolle der TRAIL-Sensitivität durch SKP2 ist zelltypspezifisch

Um zu untersuchen, ob SKP2 generell an der Regulation der Sensitivität für TRAIL-induzierte Apoptose beteiligt ist, wurden die duktaalen Pankreaskarzinomzelllinien DanG, Panc1 und PaTull mit einer SKP2-spezifischen siRNA transfiziert. Der SKP2-*Knockdown* wurde 48 Stunden nach Transfektion der SKP2-spezifischen siRNA auf Protein- (Abbildung 5A) und mRNA-Ebene (Abbildung 5B) nachgewiesen.

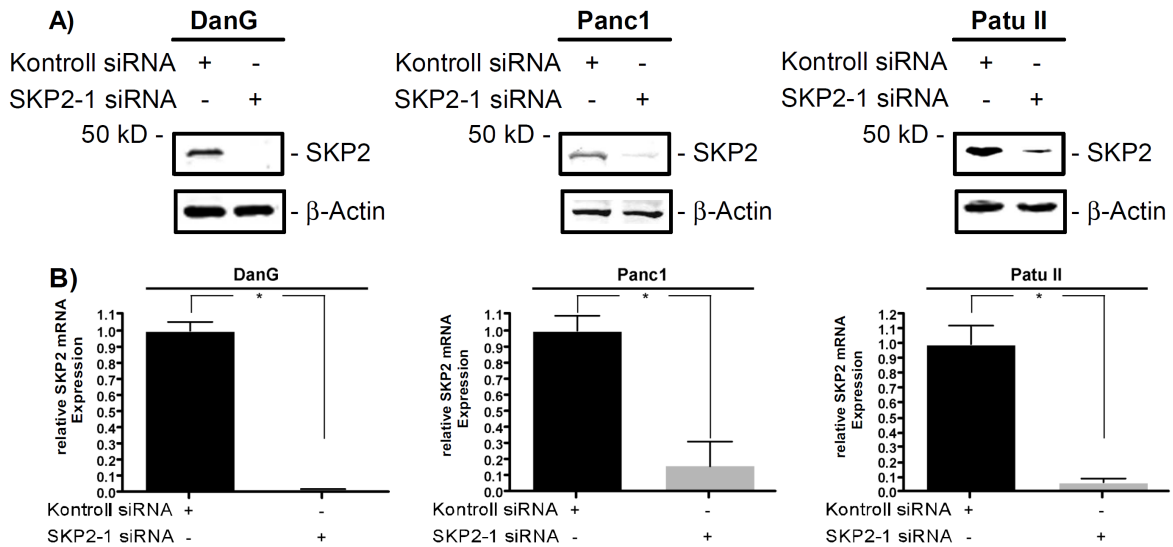


Abbildung 5: Herunterregulation von SKP2 nach Transfektion in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. DanG, Panc1 und PatuII Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder einer SKP2-spezifischen (*SKP2-1*) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Western Blot Analyse von SKP2. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) Quantitative SKP2-mRNA-Expressionsanalyse. SKP2-mRNA-Level wurden mit Hilfe einer Echtzeit-PCR Analyse quantifiziert und gegen Cyclophilin Expressionslevels normalisiert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Obwohl die Depletion von SKP2 den TRAIL-induzierten Viabilitätsverlust signifikant erhöhte (Abbildung 6A) und die TRAIL-induzierte Apoptoserate in DanG Zellen deutlich steigerte (Abbildung 6A), veränderte die SKP2-Depletion die TRAIL-Sensitivität von Panc1 und PaTull Zellen nicht (Abbildungen 6A und B). Diese Daten sprechen dafür, dass die SKP2-abhängige Regulation der TRAIL-Sensitivität zelltypspezifisch ist, was durch die Heterogenität der Tumoren bedingt sein könnte.

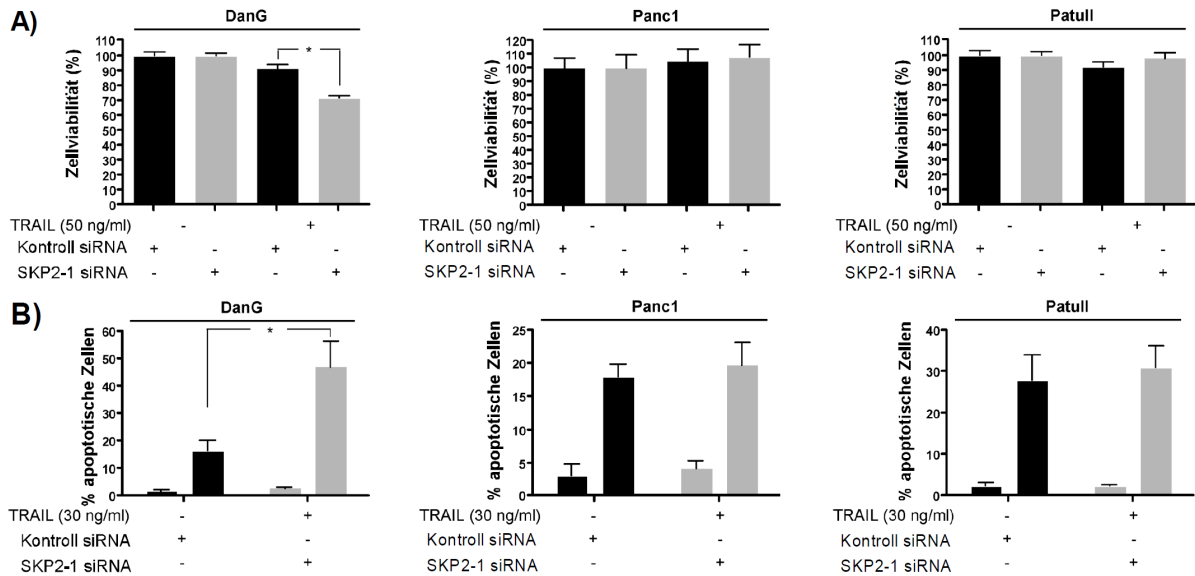


Abbildung 6: SKP2 kontrolliert die TRAIL-Sensitivität zelltypspezifisch. DanG, Panc1 und Patull Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder einer SKP2-spezifischen (SKP2-1) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Die Zellen wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit 50 ng/ml TRAIL behandelt oder als Kontrollen belassen. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Zellen wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Apoptotische Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst-Färbung quantifiziert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.3 SKP2 ist nicht an der Regulation der Sensitivität gegenüber dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid beteiligt

Der Einsatz von DNA-schädigenden Substanzen ist eine aktuelle Strategie bei der Therapie solider Tumoren. Aktuelle Arbeiten zeigten, dass SKP2 Resistenz gegenüber Apoptose bewirkt, welche durch DNA-Schädigung induziert ist (Kitagawa et al., 2008; Sun et al., 2007). Daher wurde in dieser Arbeit die Sensitivität von SKP2-depletierten duktalem Pankreaskarzinomzellen gegenüber dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid getestet. Wie in Abbildung 7 gezeigt, änderte sich die Sensitivität von SKP2-depletierten MiaPaCa2 (Abbildung 7A) und Panc1 Zellen (Abbildung 7B) im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nicht.

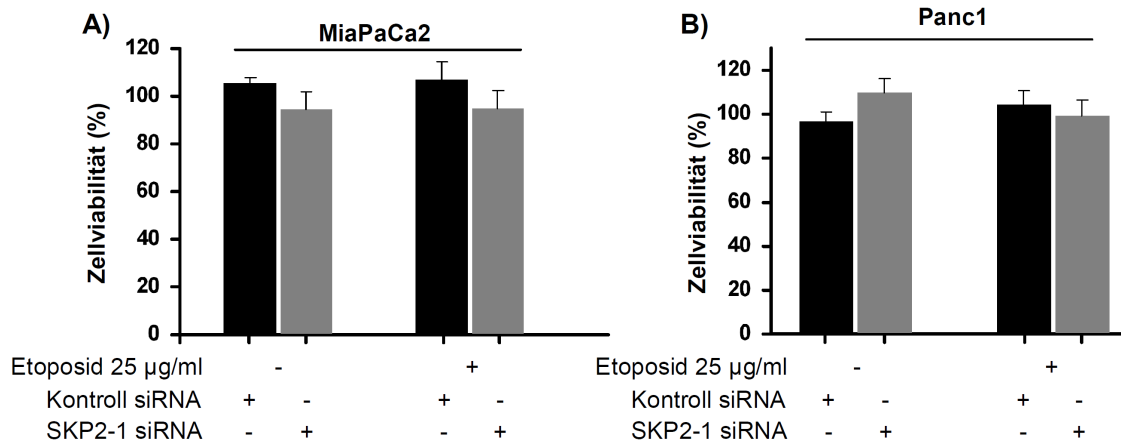


Abbildung 7: Die Etoposid-Sensitivität von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen ist SKP2-unabhängig. (A) MiaPaCa2 und (B) Panc1 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer *SKP2*-spezifischen (*SKP2-1*) siRNA behandelt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben für weitere 24 Stunden mit Etoposid behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt.

3.4 Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht an der durch SKP2-Depletion vermittelten TRAIL-Sensitivierung beteiligt

Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies bei der TNF-vermittelten Apoptose wird kontrovers diskutiert (Lee et al., 2002; Inayat-Hussain et al., 2010; Izeradjene et al., 2005; Alleva et al., 2001). Um den Beitrag von reaktiven Sauerstoffspezies an erhöhter TRAIL-Sensitivität SKP2-depletierter Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) behandelt. Die Apoptoserate von mit *SKP2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen mit und ohne 24-stündiger TRAIL-Behandlung blieb nach Einsatz von 10 mM N-Acetylcystein verglichen mit den Kontrollzellen unverändert hoch (Abbildungen 8), was gegen einen Beitrag von Sauerstoffradikalen an TRAIL-induzierter Apoptose in SKP2-depletierten Zellen spricht.

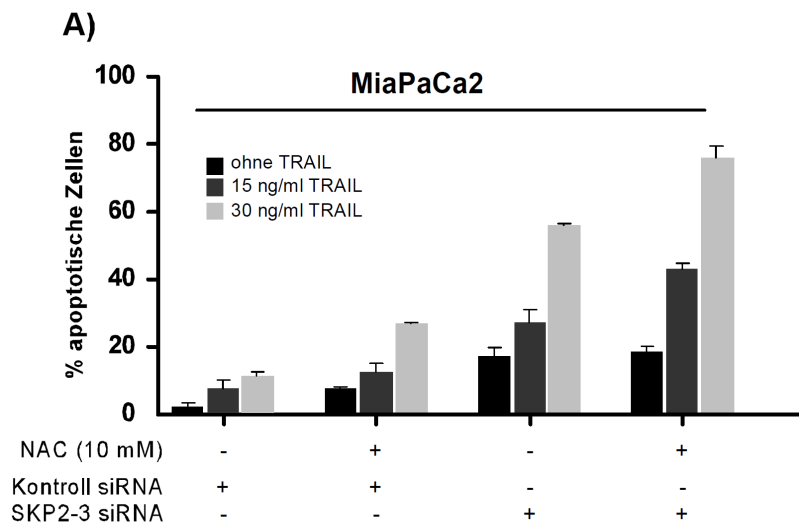


Abbildung 8: SKP2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität ist unabhängig von reaktiven Sauerstoffspezies. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *SKP2*-spezifischer (*SKP2*-3) siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben mit 10 mM NAC eine Stunde vorbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Anschließend wurden die Zellen wie angegeben zusätzlich mit TRAIL behandelt oder unbehandelt belassen. Apoptotische Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Hoechst-Färbung quantifiziert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.5 TRAIL-Behandlung führt zur beschleunigten Spaltung von BID und einer Depletion von c-Flip_L, XIAP und MCL1 in mit *SKP2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen

Die Sensitivität duktaler Pankreaskarzinomzellen gegenüber TRAIL wird auf Ebene des *Death-inducing signaling complex* (DISC), der Apoptoseinhibitorproteine (IAPs) und des Mitochondriums kontrolliert (Hamacher et al., 2008; Fulda, 2009).

Übereinstimmend mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, wurde im Zeitverlauf eine beschleunigte Spaltung von BID in *SKP2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen beobachtet (Abbildung 9). 24 Stunden nach TRAIL-Behandlung zeigte sich weiterhin eine gesteigerte Herunterregulation von XIAP und c-Flip_L in *SKP2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen (Abbildung 9). Außerdem war bereits 6 Stunden nach TRAIL-Behandlung eine Herunterregulation des anti-apoptotischen BCL-2-Familienmitglieds MCL1 in *SKP2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen zu sehen. Während die basale Expression von BCL-X_L in *SKP2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen leicht erhöht war (Abbildung 9), zeigte sich die basale Expression von cIAP1 und cIAP2 in *SKP2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen unverändert.

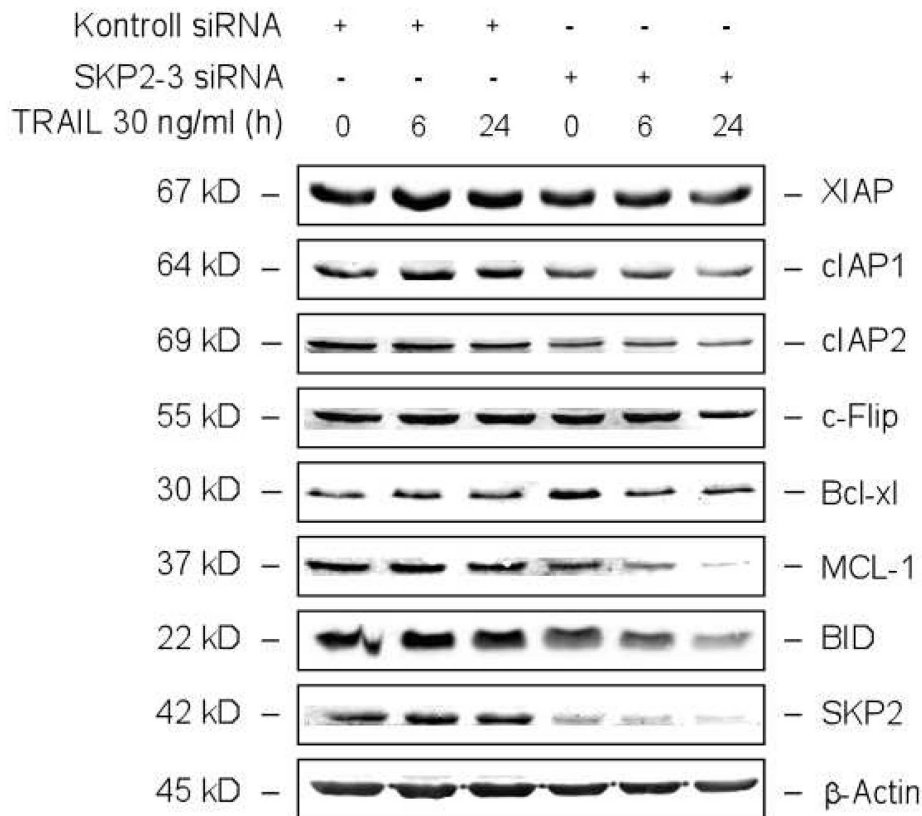


Abbildung 9: SKP2 reguliert TRAIL-Resistenzproteine in MiaPaCa2 Zellen. 48 Stunden nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA oder einer *SKP2*-spezifischen (*SKP2*-3) siRNA wurden MiaPaCa2 Zellen im Zeitverlauf wie angegeben mit TRAIL behandelt. Im Western Blot wurde die Expression von XIAP, cIAP1, cIAP2, c-Flip_L, BCL-X_L, MCL1, BID und SKP2 ermittelt. β-Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

3.6 Durch SKP2-Depletion initiierte Sensibilisierung für TRAIL ist abhängig von Caspase 2

Neben Caspase 8 scheint auch Caspase 2 im TRAIL-vermittelten Apoptosesignalweg eine entscheidende Rolle zu spielen (Wagner et al., 2004; Shin et al., 2005; Olsson et al., 2009). Der effiziente *Knockdown* nach Transfektion mit beiden *Caspase 2*-spezifischen siRNAs wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen. Die unter 3.1 beschriebene Sensitivierung von MiaPaCa2 Zellen für TRAIL nach *Knockdown* von SKP2 wurde nach Ko-Transfektion mit *SKP2*- und *Caspase 2*-siRNA aufgehoben (Abbildung 10A). Auch die Caspase 3/7-Aktivität blieb bei den mit *SKP2*- und *Caspase 2*-siRNA ko-transfizierten Zellen trotz TRAIL-Behandlung niedrig (Abbildung 10B). Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass Caspase 2 einen wichtigen Beitrag für die TRAIL-induzierte Apoptose in Pankreaskarzinomzellen leistet.

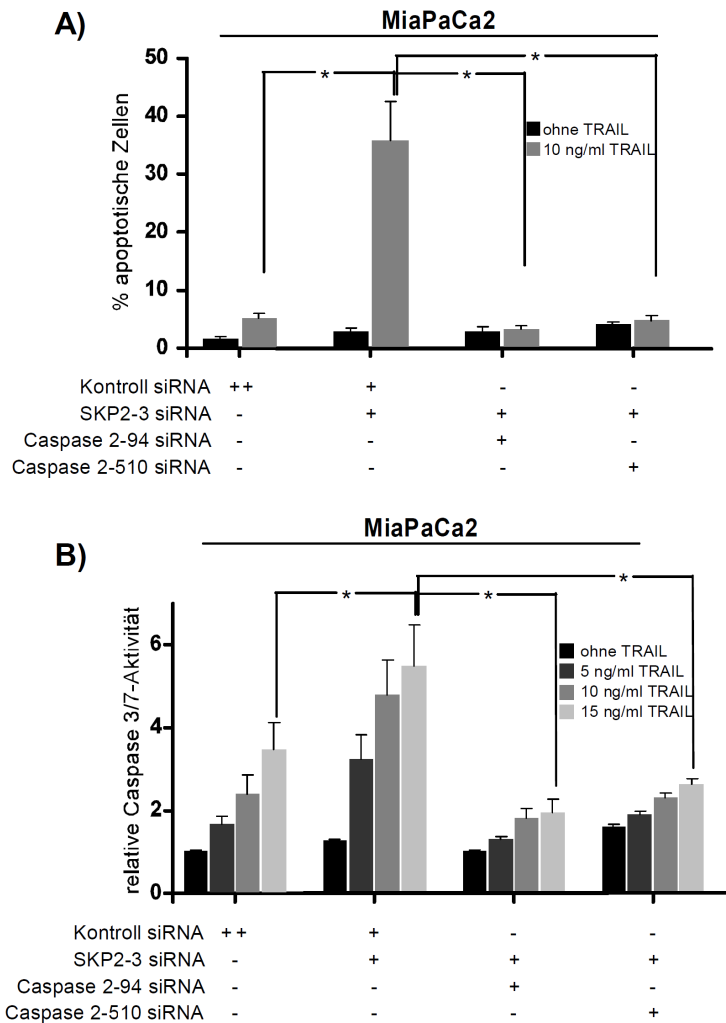


Abbildung 10: Caspase 2 reguliert die SKP2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in MiaPaCa2 Zellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder mit *SKP2*-spezifischer (*SKP2-3*) siRNA transfiziert oder mit *SKP2*- und *Caspase 2*- (*Caspase 2-94* oder *Caspase 2-510*) siRNA ko-transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Die Zellen wurden wie angegeben für weitere 6 Stunden mit 10 ng/ml TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Apoptoserate wurde nach Hoechst-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskop ermittelt (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Die Zellen wurden wie angegeben für 2 Stunden mit TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Mittels eines Lumineszenz-Caspase-Assays wurden die Caspasen 3 und 7 gemessen (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.7 HDAC2-Herunterregulation sensitiviert duktale Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose

Kürzlich konnte die HDAC2-vermittelte Kontrolle der Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen gegenüber Topoisomerase II Inhibitor-vermittelter Apoptose gezeigt werden (Fritsche et al., 2009). Um die Rolle von HDAC2 im extrinsischen Apoptosesignalweg zu untersuchen, wurde eine *HDAC2*-spezifische siRNA in dukталen Pankreaskarzinomzellen eingesetzt (Abbildung 11).

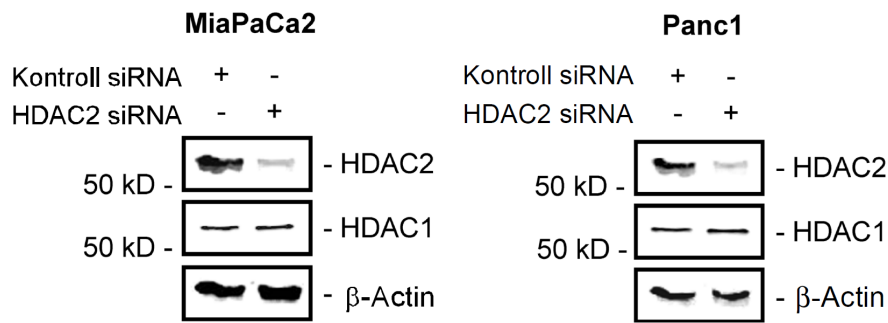


Abbildung 11: Die HDAC1 Expression ist vom Einsatz HDAC2-spezifischer siRNA unbeeinflusst. Die Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder einer HDAC2-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt. Western Blot Analyse von HDAC2 und HDAC1 von MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts). β-Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

HDAC2-depletierte MiaPaCa2 und Panc1 Zellen wiesen verglichen mit den Kontrollen nach TRAIL-Behandlung eine stark verringerte Viabilität und eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate auf (Abbildungen 12A und B).

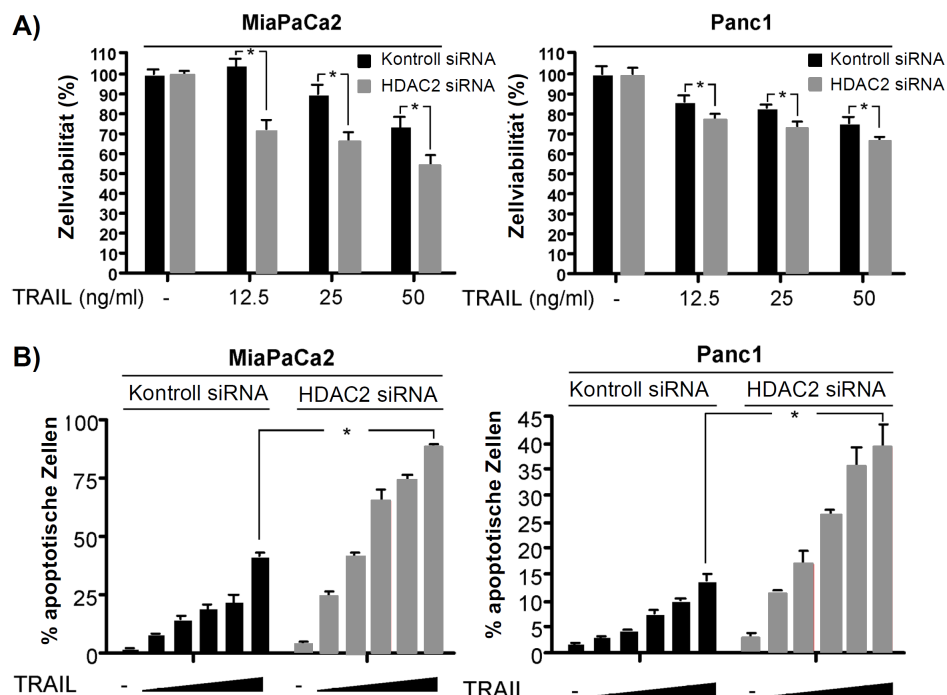


Abbildung 12: HDAC2-Depletion sensitiviert MiaPaCa2 und Panc1 Zellen für TRAIL. Die Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder einer HDAC2-spezifischen siRNA transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion mit TRAIL behandelt. (A) MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts) wurden wie angegeben für weitere 24 Stunden mit steigenden TRAIL-Dosen behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) MiaPaCa2 (links) oder Panc1 Zellen (rechts) wurden für weitere 24 Stunden mit steigenden Dosen TRAIL behandelt (6,25, 12,5, 25, 50 und 100 ng/ml) oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Apoptotische Zellen wurden nach Hoechst-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Die gesteigerte Induktion von Apoptose durch TRAIL in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen wurde im Western Blot durch den Nachweis der Spaltung von PARP validiert (Abbildung 13). Außerdem wurde eine erhöhte Spaltung von PARP nach Behandlung mit TRAIL auch in mit *HDAC2*-siRNA transfizierten DanG und BxPC3 Zellen beobachtet (Abbildung 13). Dies deutet auf eine generelle Kontrolle des extrinsischen Apoptosesignalwegs durch HDAC2 in duktalem Pankreaskarzinomzellen hin.

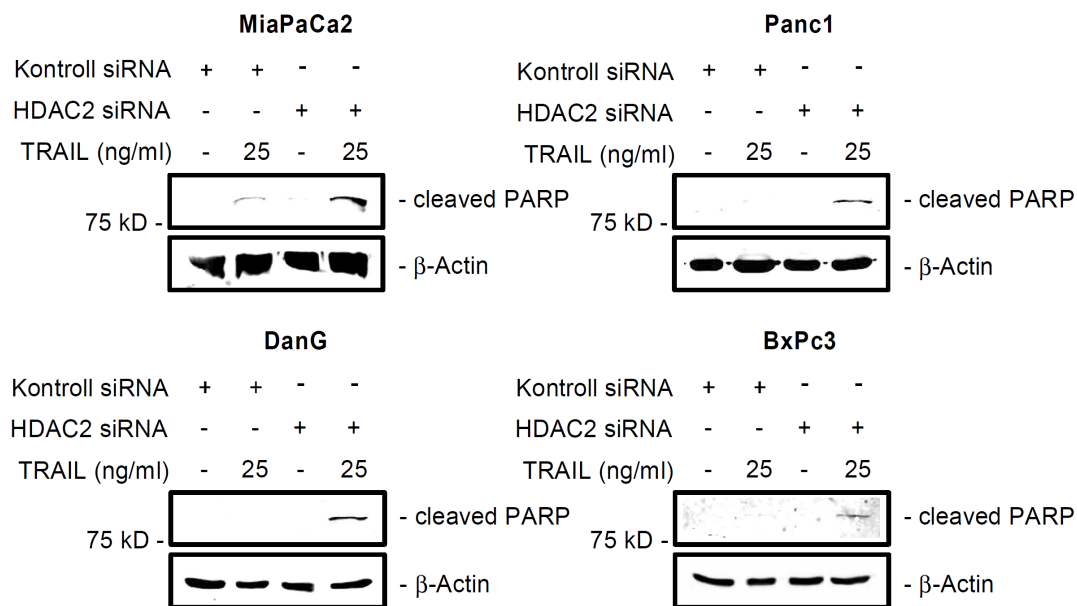


Abbildung 13: HDAC2-Depletion induziert die TRAIL-abhängige Caspase-Aktivierung in duktalem Pankreaskarzinomzellen. Die Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder einer *HDAC2*-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit TRAIL behandelt. MiaPaCa2, Panc1, DanG und BxPC3 Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit 25 ng/ml TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Western Blot Analyse zur Detektion von gespaltenem PARP diente als Nachweis der Caspase-Aktivierung. β-Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

3.8 Valproinsäure sensitiviert duktales Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose

Da Valproinsäure (VPA) in niedrigen Dosierungen als ein eher Klasse I-spezifischer HDAC-Inhibitor (HDACI) eingestuft wird und dafür bekannt ist, HDAC2 auch in Pankreaskarzinomzellen über einen proteasomalen Weg abzubauen (Göttlicher et al., 2001; Krämer et al., 2003; Fritsche et al., 2009), wurden die durch Einsatz von siRNA erhaltenen Ergebnisse mit VPA überprüft. VPA wurde in der Konzentration 1,5 mM eingesetzt. Diese Wirkspiegel werden auch in klinischen Studien erreicht (Göttlicher et al., 2001). Die Kombinationsbehandlung von MiaPaCa2 und Panc1

Zellen mit TRAIL und VPA führten dosisabhängig zu einer signifikant reduzierten Viabilität, verglichen mit den Zellen, die nur mit TRAIL behandelt worden waren (Abbildung 14A). Auch im Hoechst-Assay wurde eine erhöhte Apoptoserate in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen beobachtet, die gleichzeitig mit VPA und TRAIL behandelt worden sind (Abbildung 14B). Dies reproduziert die mittels RNA-Interferenz-Technologie gewonnenen Ergebnisse und deutet darauf hin, dass HDAC2 die TRAIL-induzierte Apoptose in Pankreaskarzinomzellen hemmt.

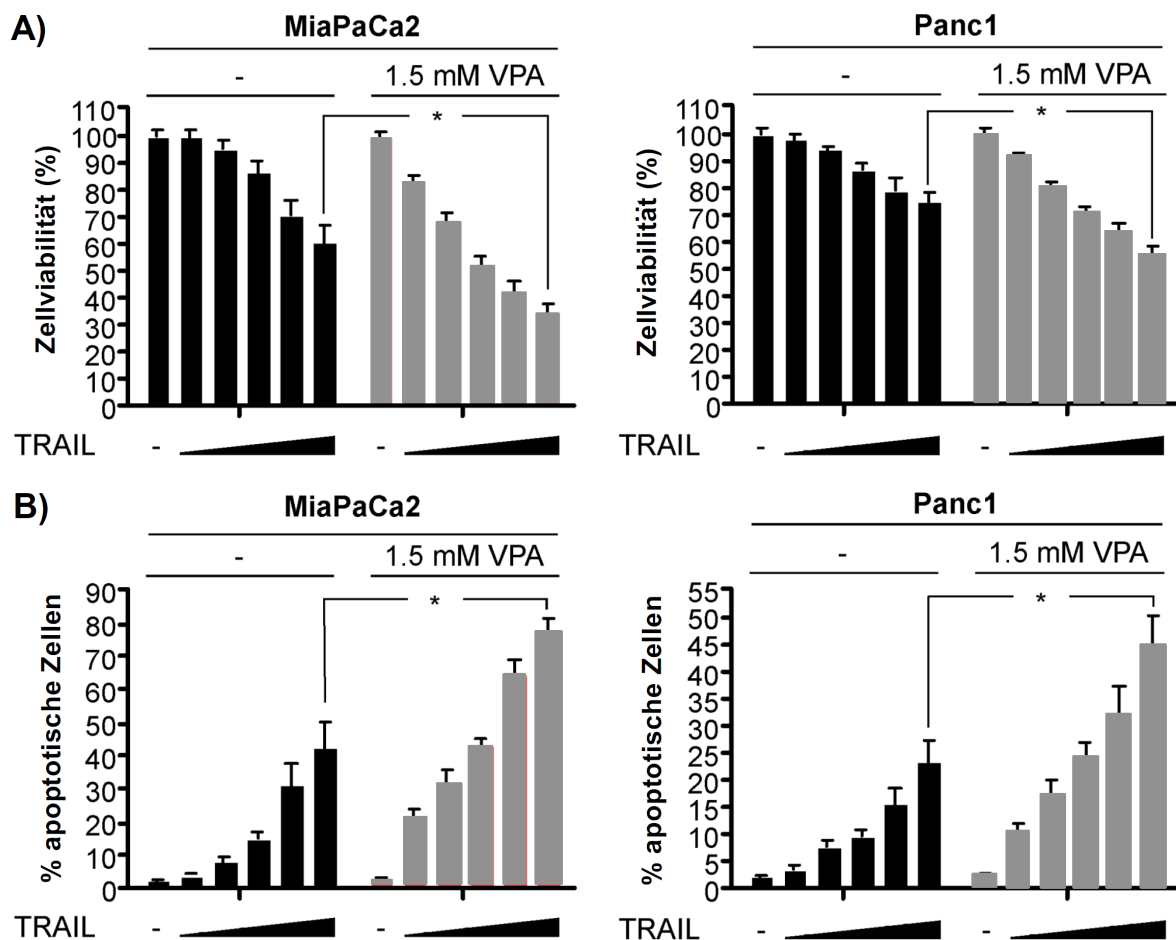


Abbildung 14: Der HDACI VPA sensitiviert duktile Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose. MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts) wurden mit VPA vorbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit TRAIL oder der Kombination aus TRAIL und VPA behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. TRAIL wurde in den Konzentrationen 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 ng/ml eingesetzt. (A) Die Viabilität wurde mittels MTT-Assays gemessen (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Apoptotische Zellen wurden nach Hoechst-Färbung in der Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.9 TRAIL-vermittelte Apoptose wird in dukталen Pankreaskarzinomzellen nicht durch HDAC1 beeinflusst

Da HDAC-Isoenzym-spezifische Funktionen kaum definiert sind, wurde untersucht, ob die TRAIL-Sensitivität auch durch HDAC1 reguliert wird. Transfektion von *HDAC1*-siRNA in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen resultierte in einer spezifischen Herunterregulation von HDAC1, wobei die HDAC2-Expression nicht beeinträchtigt wurde (Abbildung 15A). Der TRAIL-induzierte Viabilitätsverlust von MiaPaCa2 und Panc1 Zellen blieb jedoch in den mit *HDAC1*-siRNA transfizierten Zellen verglichen mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen unverändert (Abbildung 15B). Außerdem konnte kein Anstieg der Apoptosefraktion in HDAC1-depletierten und TRAIL-behandelten MiaPaCa2 und Panc1 Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass HDAC2 spezifisch an der Regulation von TRAIL-induzierter Apoptose beteiligt ist.

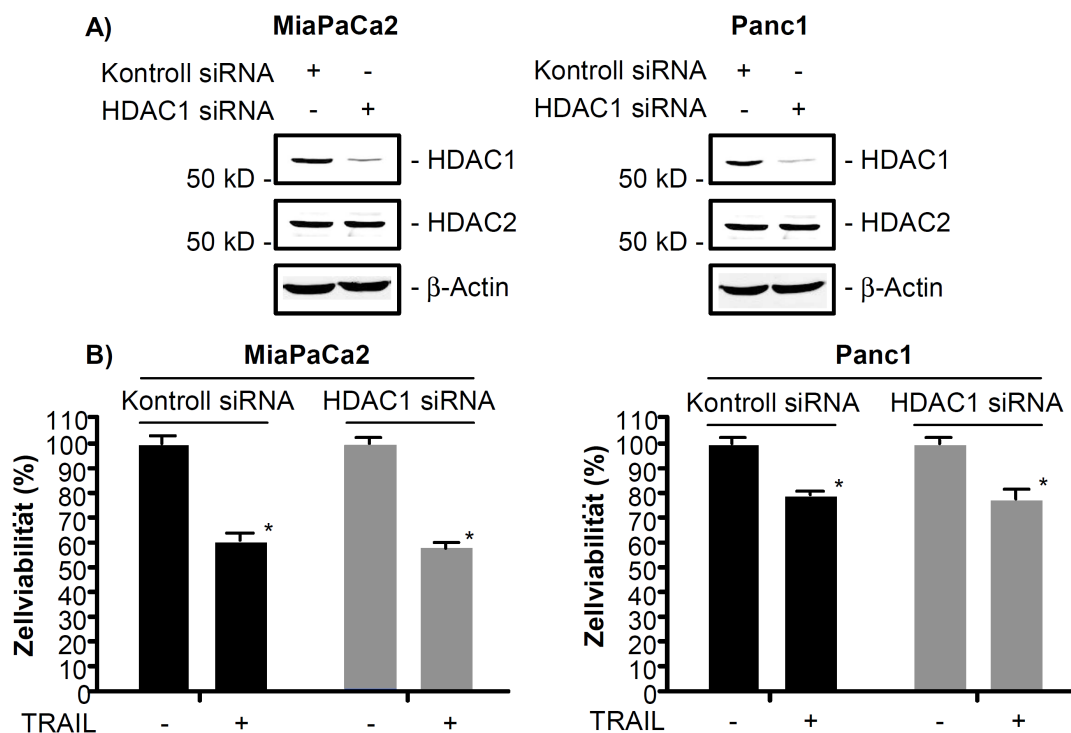


Abbildung 15: HDAC1 ist nicht an der Regulation von TRAIL-induzierter Apoptose in dukталen Pankreaskarzinomzellen beteiligt. MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts) wurden mit Kontroll-siRNA oder einer *HDAC1*-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Western Blot Analysen von HDAC1 und HDAC2. β-Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit 50 ng/ml TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Viabilität wurde mittels MTT-Assays bestimmt (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.10 HDAC2-abhängige Regulation des BH3-*only* Proteins NOXA ist nicht an der durch HDAC2-Depletion vermittelten Sensitivierung gegenüber TRAIL beteiligt

Wir konnten zeigen, dass es nach Transfektion einer *HDAC2*-spezifischen siRNA zu einer erhöhten Expression des pro-apoptotischen BH3-*only* Proteins NOXA in Pankreaskarzinomzellen kommt (Fritsche et al., 2009). Um den Einfluss von NOXA auf die HDAC2-abhängige Sensitivierung gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose zu untersuchen, wurden MiaPaCa2 Zellen simultan mit *HDAC2*- und *NOXA*-spezifischer siRNA transfiziert. Wie in Abbildung 16A gezeigt, wurde die Hochregulation der *NOXA*-mRNA durch die Depletion von HDAC2 signifikant verhindert, wenn die Zellen mit beiden siRNAs transfiziert wurden. Trotzdem blieb die durch HDAC2-*Knockdown* verursachte Sensitivierung von MiaPaCa2 Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose in mit *HDAC2*- und *NOXA*-siRNA ko-transfizierten Zellen unverändert (Abbildung 16B), womit der Beitrag von NOXA an der nach HDAC2-Depletion auftretenden Sensitivierung für TRAIL ausgeschlossen wurde.

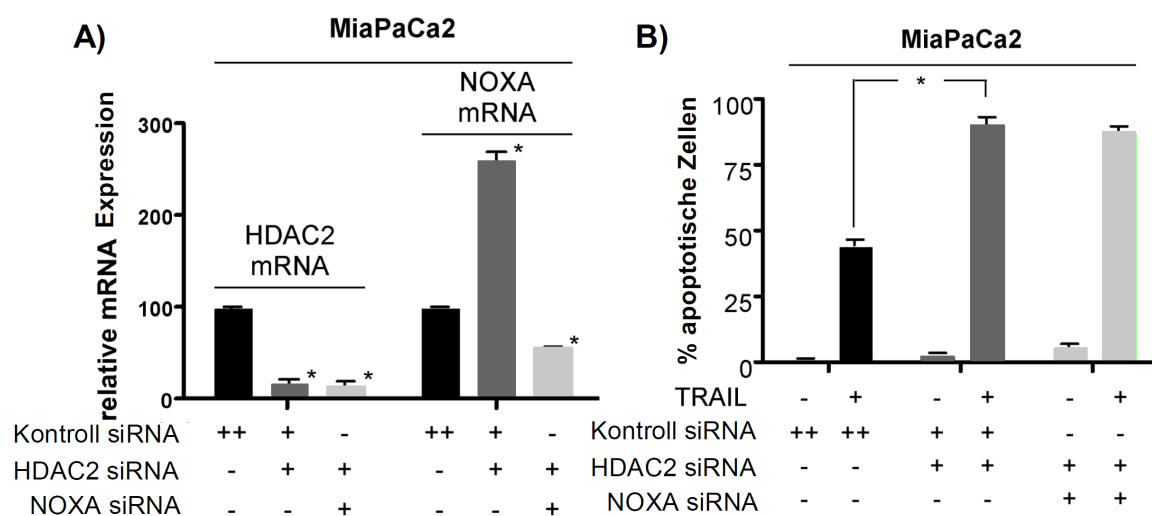


Abbildung 16: HDAC2-abhängige Regulation von NOXA ist nicht an der Sensitivierung für TRAIL beteiligt. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-, *HDAC2*-spezifischer- oder einer Kombination aus *HDAC2*- und *NOXA*-spezifischer siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Quantitative *NOXA*- und *HDAC2*-mRNA-Expressionsanalyse. Die mRNA-Level von *NOXA* und *HDAC2* wurden mit Hilfe einer Echtzeit-PCR Analyse quantifiziert und gegen Cyclophilin Expressionslevels normalisiert (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit 30 ng/ml TRAIL behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die apoptotischen Zellen wurden nach Hoechst-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

3.11 HDAC2 reguliert den TRAIL-Rezeptor DR5 in MiaPaCa2 Zellen

HDACs ändern die Genexpression durch die direkte Deacetylierung von ϵ -Aminolysingruppen am N-terminalen Ende der Histone (Spange et al., 2009). Um zu untersuchen, ob Transkription für die nach *HDAC2*-Depletion auftretende TRAIL-Sensitivierung notwendig ist, wurden MiaPaCa2 Zellen mit einer Kontroll- und einer *HDAC2*-spezifischen siRNA transfiziert und mit TRAIL oder einer Kombination aus TRAIL und Actinomycin D behandelt. So wurde die durch TRAIL-Signale induzierte Transkription gehemmt. Wie in Abbildung 17 gezeigt, war die TRAIL-induzierte Caspase 3/7-Aktivierung in *HDAC2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen signifikant erhöht. Außerdem führte die Blockade der Transkription in mit Kontroll- und *HDAC2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen zu einer erhöhten Caspase 3/7-Aktivität. Dies spricht dafür, dass die TRAIL-induzierte Transkription hauptsächlich anti-apoptotisch wirkt. Dennoch war die Caspase 3/7-Aktivität in gleichzeitig mit TRAIL und Actinomycin D behandelten *HDAC2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen signifikant höher als in gleichzeitig mit TRAIL und Actinomycin D behandelten und mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die erhöhte Sensitivität von *HDAC2*-depletierten MiaPaCa2 Zellen für TRAIL kann damit entweder über eine veränderte Genexpression nach alleiniger *HDAC2*-Depletion oder über einen Mechanismus, der keine Transkription benötigt, erklärt werden.

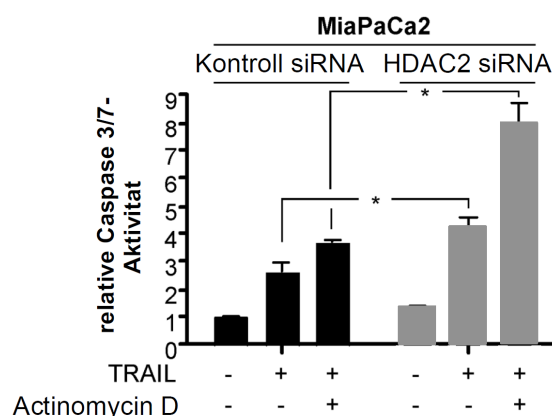


Abbildung 17: Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose nach *HDAC2*-Depletion ist unabhängig von TRAIL-induzierter Transkription. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *HDAC2*-spezifischer siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 2 Stunden mit 15 ng/ml TRAIL oder einer Kombination aus TRAIL und Actinomycin D (1 μ g/ml) behandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Mittels eines Lumineszenz-Caspase-Assays wurden die Caspasen 3 und 7 gemessen (* $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Zusätzlich zur erhöhten Caspase 3/7-Aktivität wurde eine beschleunigte Spaltung von Caspase 8 in HDAC2-depletierten und TRAIL-behandelten MiaPaCa2-Zellen beobachtet. Im Gegensatz zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen war Caspase 8 in den mit *HDAC2*-siRNA transfizierten Zellen bereits 3 Stunden nach der Behandlung mit TRAIL prozessiert (Abbildungen 18A und B). Ähnliche Ergebnisse wurden in VPA-behandelten MiaPaCa2 Zellen beobachtet.

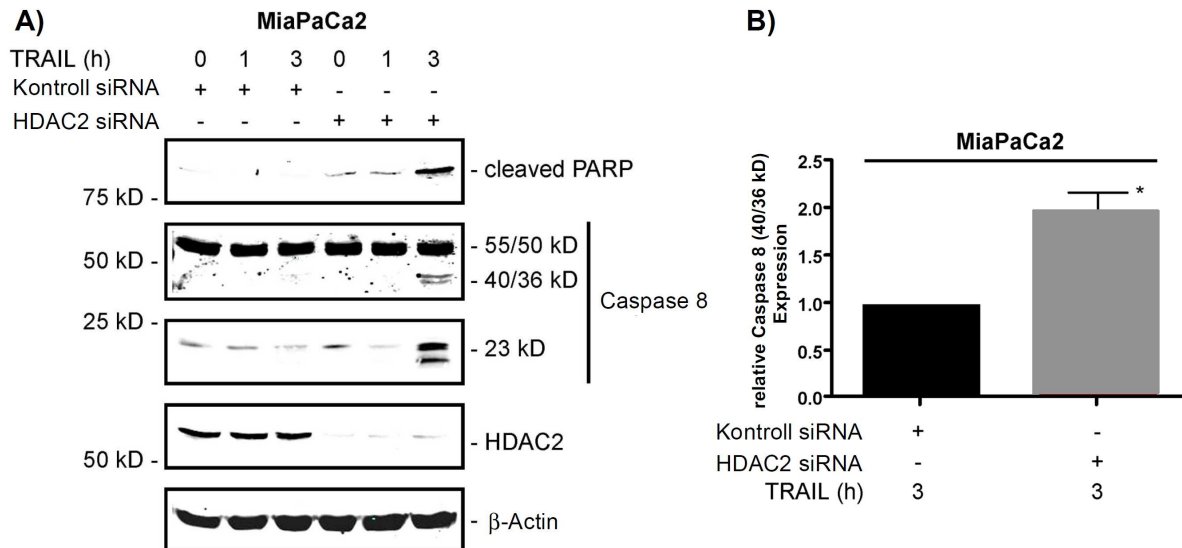


Abbildung 18: HDAC2-Depletion beschleunigt die Spaltung von Caspase 8 in MiaPaCa2 Zellen. MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *HDAC2*-spezifischer siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt. (A) Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 30 ng/ml TRAIL behandelt. In Western Blot Analysen wurde die Expression von Caspase 8 (55/50 kD), dem Caspase 8 Spaltprodukt (bei 40/36 kD und 23 kD), gespaltem PARP und von HDAC2 bestimmt. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) 3 Stunden nach Behandlung der Zellen mit TRAIL wurde die Expression der 40/36 kD Spaltprodukte der Caspase 8 in vier unabhängigen Experimenten quantifiziert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). Die Quantifizierung erfolgte mit dem Odyssey near-infrared Fluoreszenz-Scanner.

In Transkriptom-Profilen von HDAC2-depletierten Pankreaskarzinomzellen (Fritsche et al., 2009) zeigte sich eine verstärkte Expression des TRAIL-Rezeptors DR5. Wie in Abbildung 19 gezeigt, konnte eine gesteigerte DR5 Proteinexpression in HDAC2-depletierten MiaPaCa2 Zellen nachgewiesen werden.

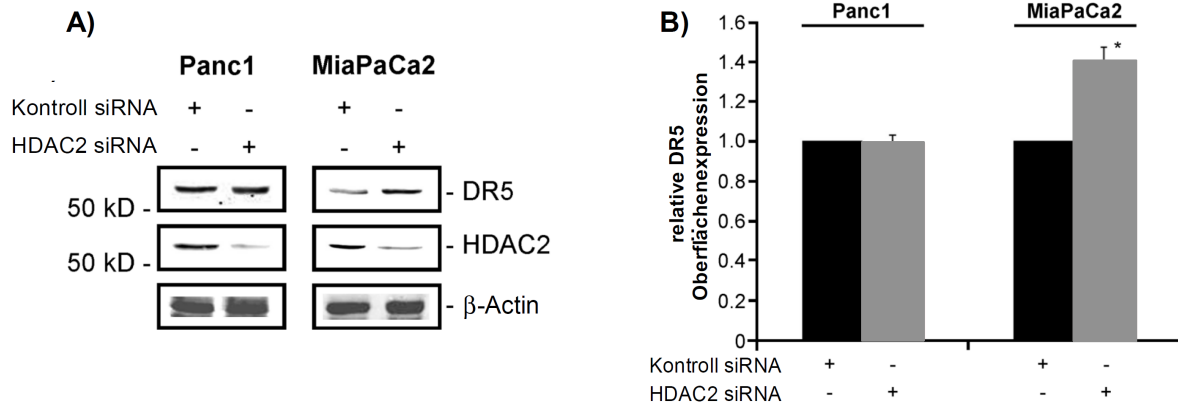


Abbildung 19: HDAC2 reguliert den TRAIL-Rezeptor DR5 in MiaPaCa2 Zellen. Panc1 (links) und MiaPaCa2 Zellen (rechts) wurden mit Kontroll-siRNA oder HDAC2-spezifischer siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen weiterbehandelt (A) Western Blot Analyse von DR5 und HDAC2. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (B) Bestimmung der DR5 Oberflächenexpression durch eine FACS Analyse (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu, wurde keinerlei Veränderung in der Expression von DR4, c-Flip XIAP, cIAP1, cIAP2 und MCL1 oder Survivin in mit *HDAC2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen beobachtet (Abbildung 20). Eine leichte, aber reproduzierbare Hochregulation von BCL-X_L zeigte sich in den HDAC2-depletierten MiaPaCa2 Zellen (Abbildung 20). Passend zu einer Steigerung der durch TRAIL induzierten Apoptose in HDAC2-depletierten MiaPaCa2 Zellen wurde eine verstärkte Eliminierung von c-Flip nach TRAIL-Behandlung bei mit *HDAC2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen beobachtet und auch BID wurde nach HDAC2-Depletion und TRAIL-Behandlung früher gespalten (Abbildung 20).

Im Gegensatz zu den MiaPaCa2 Zellen konnte in Panc1 Zellen keine Hochregulation von DR5 nach HDAC2-Depletion gezeigt werden (Abbildung 19A). In Übereinstimmung damit war die DR5 Expression an der Zelloberfläche in MiaPaCa2 Zellen, aber nicht in Panc1 Zellen, leicht erhöht (Abbildung 19B). Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass HDAC2-abhängige Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose in MiaPaCa2 Zellen BID vorgeschaltet ist.

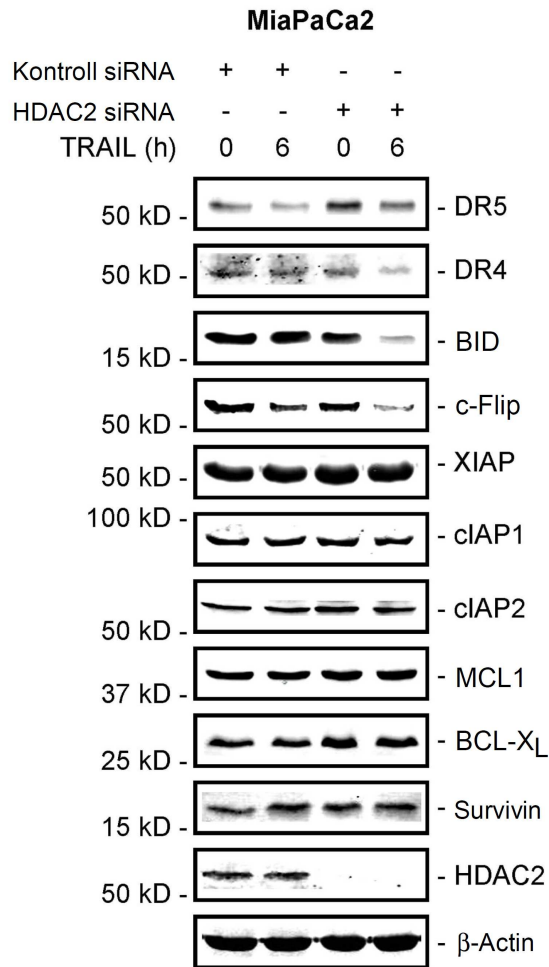


Abbildung 20: Einfluss von HDAC2 auf apoptoseregulierende Proteine. MiaPaCa2 Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA oder einer *HDAC2*-spezifischen siRNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 6 Stunden mit 30 ng/ml TRAIL behandelt. Im Western Blot wurde die Expression von DR5, DR4, BID, c-Flip, XIAP, cIAP1, cIAP2, MCL1, BCL-X_L, Survivin und HDAC2 ermittelt. β -Actin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

3.12 HDAC2 kontrolliert NF- κ B in duktalem Pankreaskarzinomzellen

Da NF- κ B bei der Resistenz von duktalem Pankreaskarzinomzellen gegen TRAIL eine Rolle spielt (Trauzold et al., 2001; Khanbolooki et al., 2006; Braeuer et al., 2006; Thomas et al., 2002), wurde die Regulation der NF- κ B-Aktivität mittels eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays untersucht. Wie in Abbildung 21A gezeigt, war die Aktivität eines NF- κ B Luciferase-Reporter-Genkonstrukts in HDAC2-depletierten MiaPaCa2 und Panc1 Zellen reduziert. Außerdem führte die Ko-Transfektion des NF- κ B Luciferase-Reporter-Genes mit einem HDAC2-Expressionsvektor in MiaPaCa2 und Panc1 Zellen zu einer Hochregulation der NF- κ B-Aktivität (Abbildung 21B). Insgesamt zeigen diese Daten, dass HDAC2 zur konstitutiven NF- κ B-Aktivität von Pankreaskarzinomzellen beiträgt.

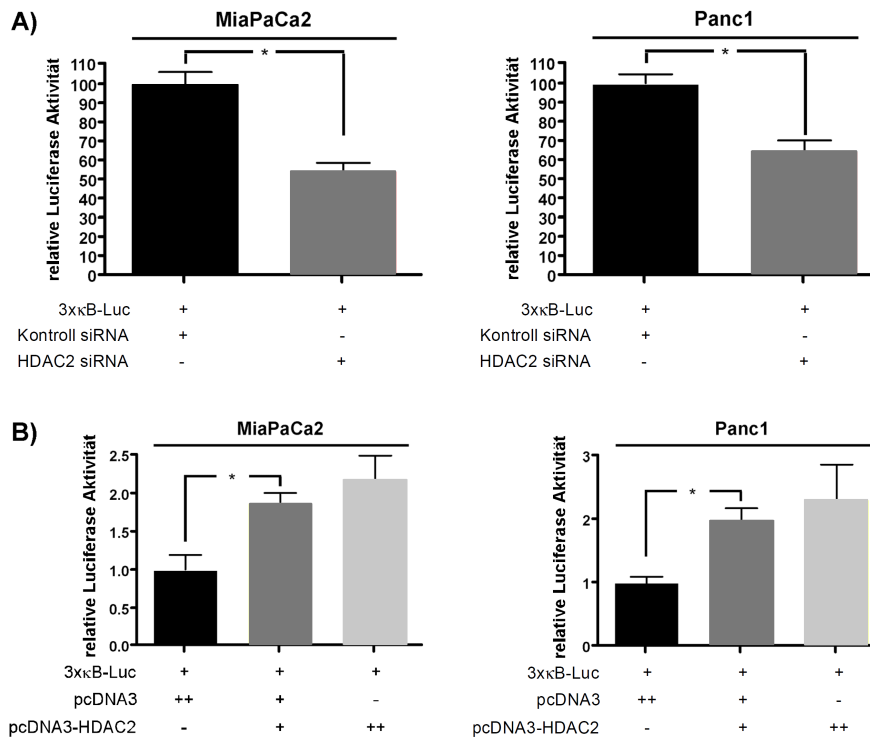


Abbildung 21: HDAC2 kontrolliert die NF-κB-Aktivität. (A) MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts) wurden gleichzeitig mit dem 3xκB Luciferase-Reporterigen Konstrukt (250ng) und den angegebenen siRNAs transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. (B) MiaPaCa2 (links) und Panc1 Zellen (rechts) wurden wie angegeben gleichzeitig mit dem 3xκB Luciferase-Reporterigen Konstrukt und dem HDAC2 Expressionsvektor (100 and 250 ng) transfiziert. Die DNA Menge wurde mittels Einsatz des leeren pcDNA3 Expressionsvektors konstant gehalten. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität gemessen.

3.13 Caspase 2 ist an der Sensitivierung von HDAC2-depletierten MiaPaCa2 Zellen gegenüber TRAIL beteiligt

Nachdem sich in SKP2-depletierten Zellen ein wichtiger Beitrag von Caspase 2 zur TRAIL-induzierten Apoptose zeigte, wurde die Caspase 2-Funktion auch nach HDAC2-Depletion untersucht. Wie in Abbildung 22A gezeigt, stieg die relative Caspase 3/7-Aktivität nach HDAC2-Depletion und Behandlung mit TRAIL in MiaPaCa2-Zellen signifikant an. Bei Ko-Transfektion mit *HDAC2*- und *Caspase 2*-spezifischer siRNA blieb die Caspase 3/7-Aktivität auf Niveau der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Auch nach Hoechst-Färbung blieb nach gemeinsamer Transfektion von Caspase 2 und HDAC2 und TRAIL-Behandlung eine Steigerung der Apoptoserate aus (Abbildung 22B). Selbiges wurde bei Behandlung der Zellen mit dem HDAC2-spezifischen HDACI VPA beobachtet (Abbildung 22C).

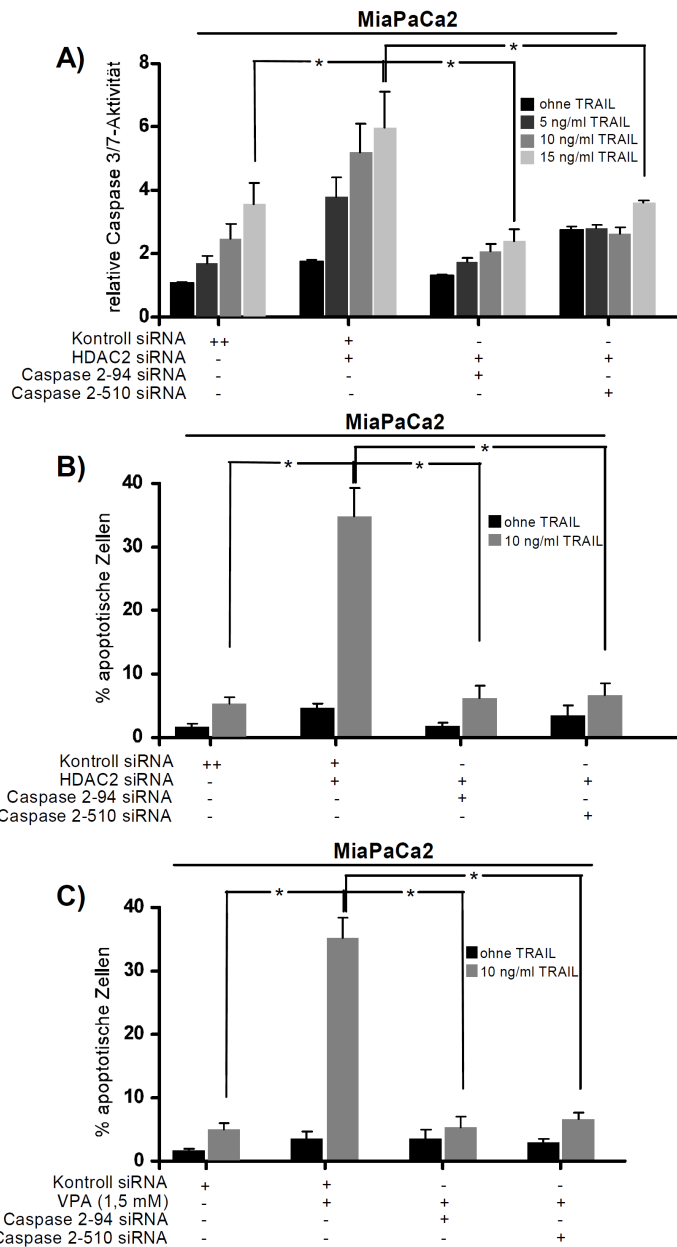


Abbildung 22: Caspase 2 reguliert die HDAC2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in MiaPaCa2 Zellen. (A) MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben mit Kontroll-siRNA oder *HDAC2*-spezifischer siRNA transfiziert oder mit *HDAC2*- und *Caspase 2*- (*Caspase 2-94* oder *Caspase 2-510*) siRNA ko-transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 2 Stunden mit 5, 10 oder 15 ng/ml TRAIL weiterbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Mittels eines Lumineszenz-Caspase-Assays wurden die Caspasen 3 und 7 gemessen (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (B) MiaPaCa2 Zellen wurden wie angegeben mit Kontroll-siRNA oder *HDAC2*-spezifischer siRNA transfiziert oder mit *HDAC2*- und *Caspase 2*- (*Caspase 2-94* oder *Caspase 2-510*) siRNA ko-transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 6 Stunden mit 10 ng/ml TRAIL weiterbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Apoptoserate wurde nach Hoechst-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskop ermittelt (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen). (C) MiaPaCa2 Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder *Caspase 2*-spezifischer siRNA behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1,5 mM VPA weiterbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zusätzlich für 6 Stunden mit 10 ng/ml TRAIL weiterbehandelt oder als unbehandelte Kontrollen belassen. Die Apoptoserate wurde nach Hoechst-Färbung mittels Fluoreszenzmikroskop ermittelt (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

Auch andere duktale Pankreaskarzinomzelllinien wie Panc1, DanG und BxPC3 Zellen zeigten ohne Caspase 2 nach Behandlung mit TRAIL keine Apoptose (Abbildung 23A-C). Diese Daten deuten darauf hin, dass Caspase 2 ein wichtiger Bestandteil des extrinsischen Apoptosesignalwegs in Pankreaskarzinomzellen ist.

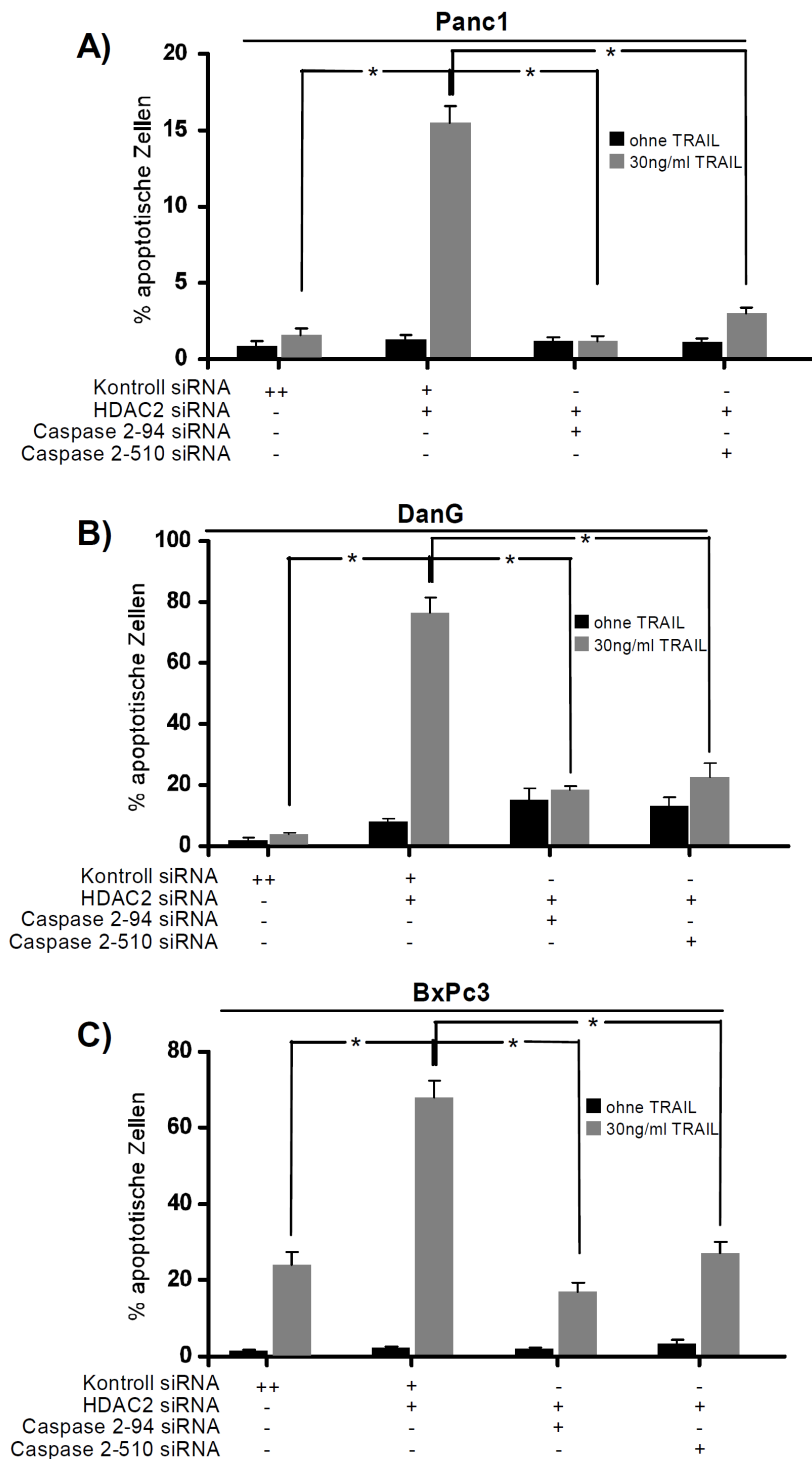


Abbildung 23: Caspase 2 reguliert die HDAC2-kontrollierte TRAIL-Sensitivität in duktalem Pankreaskarzinomzellen. Panc1 (A), DanG (B) und BxPc3 (C) Zellen wurden wie in Abbildung 22B beschrieben behandelt und analysiert (* $p < 0.05$ im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen).

4 Diskussion

4.1 S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 2 (SKP2) kontrolliert die Resistenz gegenüber TRAIL im duktalem Pankreaskarzinom

TNF-related apoptosis inducing ligand- (TRAIL-) agonistische therapeutische Ansätze werden aktuell in verschiedenen klinischen Studien untersucht (Johnstone et al., 2008; Newsom-Davis et al., 2009). Im Pankreas korreliert eine hohe TRAIL-Expression mit einem erhöhten Apoptoseindex. Daher könnte eine TRAIL-basierte Therapie eine praktikable Strategie für die Behandlung des duktalem Pankreaskarzinoms sein (Sanlioglu et al., 2008). Trotzdem sind primäre Tumorzellen oft resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Koschny et al., 2007). Humane Pankreaskarzinomzellen zeigen eine hohe mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für TRAIL, obwohl sie sowohl die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 als auch relevante Mediatoren des TRAIL Rezeptor Signalwegs exprimieren (Hamacher et al., 2008; Fulda, 2009). Eine TRAIL-Resistenz in Pankreaskarzinomzellen wird durch zahlreiche Proteine wie STAT3 (Huang et al., 2010), CUX1 (Ripka et al., 2010), c-Flip (Kauh et al., 2010), XIAP (Vogler et al., 2007), MCL1 (Huang et al., 2010), BCL-X_L (Bai et al., 2005) oder Survivin (Retzer-Lidl et al., 2007) bewirkt. Daher ist es für die Entwicklung neuer Therapien wichtig, molekulare Ziele zu definieren, deren Inhibition mit TRAIL-Agonisten synergistisch wirkt.

Die Hauptaufgabe von SKP2 ist es, den G1/S-Übergang des Zellzyklus zu regulieren, wobei hier vor allem die Ubiquitinierung von p27^{Kip1} eine entscheidende Rolle spielt (Frescas et al., 2008). Aktuellen Studien zufolge reguliert SKP2 auch krebsrelevante Prozesse wie Seneszenz (Lin et al., 2010), Anoikis (Wang et al., 2009) oder den intrinsischen Apoptoseweg (Kitagawa et al., 2008). Wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt wird, bewirkt SKP2 außerdem Resistenz gegenüber dem extrinsischen Apoptosesignalweg. SKP2 wird im Pankreaskarzinom hoch exprimiert und ist ein unabhängiger Prognoseparameter (Einama et al., 2006).

Es wurde eine beschleunigte BID-Spaltung und vermehrte Herunterregulation von c-Flip_L und XIAP nach Behandlung von SKP2-depletierten Zellen mit TRAIL beobachtet. Der Beitrag dieser Veränderungen zur erhöhten TRAIL-Sensitivität ist dennoch unklar. Die Regulation von XIAP und c-Flip_L in mit SKP2-transfizierten Zellen trat erst zu späten Zeitpunkten nach TRAIL-Behandlung auf. SKP2-

unabhängige Veränderungen, die sekundär durch die gesteigerte Apoptoseinduktion hervorgerufen werden, können daher nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu diesen spät auftretenden Ereignissen, war die Expression von MCL1, einem anti-apoptotischen BCL-2-Familienmitglied, bereits 6 Stunden nach TRAIL-Behandlung in SKP2-depletierten Zellen reduziert. MCL1 schützt Pankreaskarzinomzellen vor TRAIL- (Huang et al., 2010), TNF- und Chemotherapie-induzierter Apoptose. Die Regulation dieses kurzlebigen Proteins in Pankreaskarzinomzellen ist komplex und ein Einfluss auf Transkription, Translation und proteasomale Degradation wurde beschrieben (Michels et al., 2005). Wie SKP2, direkt oder indirekt, MCL1 in Pankreaskarzinomzellen reguliert, bleibt ungeklärt.

Eine Funktion von SKP2 bei der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit Chemotherapeutika konnte kürzlich gezeigt werden (Kitagawa et al., 2008). Auf molekularer Ebene inhibiert SKP2 die p53-abhängige Apoptose durch Bildung eines Komplexes mit der Histon-Acetyltransferase p300. Dadurch antagonisiert SKP2 die p53/p300-Interaktion, die zur Aktivierung eines pro-apoptotischen Programms nötig ist (Kitagawa et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Veränderung der Sensitivität von duktalem Pankreaskarzinomzellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose in SKP2-depletierten Zellen gefunden werden. Die Tatsache, dass sowohl MiaPaCa2 als auch Panc1 Zellen mutiertes p53 exprimieren, könnte diese Diskrepanz erklären.

Insgesamt sind weitere Studien nötig, um die Regulation der TRAIL-Sensitivität durch SKP2 im molekularen Detail zu entschlüsseln. Jedoch zeigt diese Arbeit eindeutige Hinweise, dass SKP2 Resistenz von Krebszellen gegenüber extrinsischer Induktion von Apoptose bewirken kann.

4.2 Histondeacetylase 2 (HDAC2) kontrolliert die TRAIL-Resistenz im duktalem Pankreaskarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der in niedrigen Konzentrationen Klasse I-selektive HDAC-Inhibitor (HDACI) Valproinsäure (VPA) Pankreaskarzinomzellen für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert. HDAC2 wird in vielen soliden Tumoren überexprimiert (Weichert, 2009), so auch im humanen Pankreaskarzinom (Fritsche et al., 2009; Lehmann et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HDAC2 die Resistenz gegenüber TRAIL kontrolliert.

Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre charakterisieren HDAC2 als relevanten therapeutischen Angriffspunkt. So konnte die HDAC2-abhängige Sensitivierung von Mamma- und Pankreaskarzinomzellen für Topoisomerase II Inhibitoren nachgewiesen werden (Fritsche et al., 2009; Marchion et al., 2009). Auch der Einfluss von HDAC2 auf das Ansprechen Östrogen- und Progesteronsrezeptor-spezifischer Therapien beim Mammakarzinom wurde belegt (Bicaku et al., 2008). Weiterhin zeigten Kaler et al. die HDAC2-abhängige Sensitivität von Kolonkarzinomzellen gegenüber TNF- α (Kaler et al., 2008). Insgesamt sollten diese Daten zur Entwicklung HDAC2-Isoenzym-spezifischer Inhibitoren führen, mit potenter tumorspezifischer Wirkung und geringer Toxizität (Krämer, 2009).

Wie oben ausgeführt wirken TRAIL-Resistenzmechanismen in Pankreaskarzinomzellen auf Ebene des TRAIL-Rezeptors, des *death-inducing signaling complex* (DISC), der Apoptoseinhibitorproteine (IAPs) oder des Mitochondriums (Fulda, 2009; Hamacher et al., 2008). In Microarray-Experimenten zeigte sich nach Depletion der HDAC2 keine signifikante Regulation der klassischen TRAIL-Resistenzgene c-Flip, XIAP, cIAP1, cIAP2, MCL1, BCL-X_L oder Survivin (Fritsche et al., 2009).

Natoni et al. beschrieben 2005 eine erhöhte Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen für Fas-induzierte Apoptose, welche aus einer reduzierten Expression von BCL-X_L und c-Flip nach Butyratbehandlung resultierte (Natoni et al., 2005). In dieser Arbeit konnte keine Regulation von BCL-X_L und c-Flip nach HDAC2-Depletion nachgewiesen werden, was für die Existenz von Kompensationsmechanismen spricht. Sequenzanalysen der HDAC1 und HDAC2 zeigen eine hochgradige Homologie beider Enzyme (Laherty et al., 1997; Gallinari et al., 2007). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von HDAC1 nach HDAC2-Depletion beobachtet (Wilting et al., 2010) und redundante Funktionen der HDAC1 und HDAC2 sind generell akzeptiert (Montgomery et al., 2007; Grozinger et al., 2002; Lagger et al., 2002). Unsere Ergebnisse stimmen jedoch mit aktuellen Beobachtungen in HCT116 Kolonkarzinomzellen überein, in denen eine Behandlung mit HDACi oder eine Depletion von HDAC2, aber nicht von HDAC1, für TNF- α -induzierte Apoptose sensitiviert (Kaler et al., 2008). Kaler et al. führen die HDAC2-abhängige Sensitivierung auf eine Hemmung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B zurück, da durch Einsatz einer HDAC2-spezifischen siRNA die TNF- α -abhängige Aktivierung eines NF- κ B Luciferase-Reportergens reduziert

wurde (Kaler et al., 2008). Passend dazu zeigt eine aktuelle Studie die Reduktion der basalen Bindung von RelA an ein Konsensus- κ B-Oligonukleotid nach Behandlung der dukalen Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 mit dem HDACI SAHA (Lehmann et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die basale NF- κ B-Transkriptionsaktivität in Pankreaskarzinomzellen von HDAC2 abhängig ist. Die basale, nicht aber die induzierte NF- κ B-Aktivität wirkt an der TRAIL-Resistenz von dukalen Pankreaskarzinomzellen mit (Braeuer et al., 2006). Außerdem führt die Inhibierung von NF- κ B durch den Super-Inhibitor delta-N-I κ B α (Trauzold et al., 2001) oder eine p65-siRNA (Khanbolooki et al., 2006) zu einer deutlichen Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose in Pankreaskarzinomzellen. Daher ist eine Beteiligung von NF- κ B in unserem Modellsystem naheliegend. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nach alleiniger HDAC2-Depletion keine Regulation der NF- κ B-Zielgene wie XIAP, BCL-X_L oder Survivin beobachtet werden.

HDACI sensitivieren maligne Zellen für TRAIL und es wurden verschiedene Mechanismen gezeigt. So kann die Hochregulation von TRAIL und TRAIL-Rezeptoren, die Herunterregulation von c-Flip, XIAP oder Mitgliedern der anti-apoptotischen BCL-2-Familienmitglieder oder die Modulation der NF- κ B-Aktivität eine Sensitivierung bewirken (Fulda, 2008; Carew et al., 2008).

Wie in vielen Studien, die HDACI zur Sensitivierung für TRAIL einsetzen, konnte auch in dieser Arbeit nach HDAC2-Depletion eine leichte Hochregulation der DR5-Protein- und Oberflächenexpression in MiaPaCa2 Zellen festgestellt werden. Die Erkenntnis, dass die HDACI-abhängige TRAIL-Sensitivierung unabhängig von DR5 stattfindet (Inoue et al., 2006) und dass keine DR5-Regulation in Panc1-Zellen auftrat, weist auf alternative HDAC2-regulierte Mechanismen hin, die eine Sensitivierung bewirken. Dass es sich hierbei um ein BID vorgeschaltetes Ereignis handeln könnte, zeigt die nach HDAC2-Depletion akzelerierte TRAIL-induzierte Spaltung von BID. Passend dazu wurde kürzlich die vermehrte Rekrutierung des *FAS-associated death domain proteins* (FADD) an den DR4 nach HDAC-Inhibition gezeigt (Inoue et al., 2009). So stellt die Theorie einer beschleunigten DISC-Formierung und –Funktion nach HDAC2-Herunterregulation eine attraktive Erklärung dar. Ob HDAC2 die Kontrolle der DISC-Bildung übernimmt ist aktuell noch unbekannt und bedarf weiterer Experimente.

4.3 Funktion der Caspase 2 in der TRAIL-induzierten Apoptose von Pankreaskarzinomzellen

Caspase 2 ist evolutionär ein hoch konserviertes Mitglied der Caspasefamilie und zeigt Sequenzhomologien mit Initiator- und Effektorcaspasen (Zhivotovsky et al., 2005; Krumschnabel et al., 2009). Insgesamt ist die Rolle der Caspase 2 im Apoptosesignalweg unklar. Zahlreiche Publikationen zeigen, dass für die initiale Aktivierung der Caspase 2 keine Spaltung nötig ist, sondern die Dimerisierung zweier Caspase 2-Monomere das Schlüsselereignis der Aktivierung ist (Baliga et al., 2004; Bouchier-Hayes et al., 2009). Die Spaltung von Caspase 2 durch Caspase 3 dient allein der Amplifikation und Stabilisierung (Kumar, 2009; Guha et al., 2010; Lin et al., 2004). Die Rolle der Caspase 2 in verschiedenen Todesrezeptorsignalwegen wurde demonstriert (Droin et al., 2001; Lavrik et al., 2006). Wagner et al. zeigten, dass eine Herunterregulation von Caspase 2 über RNA-Interferenz die TRAIL-induzierte Apoptose in einigen Typ II-Zellen wie den humanen Kolonkarzinomzellen HCT116 oder den Pankreaskarzinomzellen T3M4 signifikant inhibiert und, dass Caspase 2 für eine effektive Spaltung von BID nötig ist (Wagner et al., 2004). Olsson et al. zeigten, dass Caspase 2 den DISC als Aktivierungsplattform einsetzt, wobei die Rekrutierung von Caspase 8 zu diesem Komplex entscheidend für die Caspase 2 Aktivierung ist (Olsson et al., 2009). Aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, dass es zelltypspezifisch nach Caspase 2-Depletion zu einer reduzierten Aktivierung von Caspase 8 kommt, wobei keinerlei Interaktion zwischen Caspase 2 und 8 detektiert werden konnte (Kim et al., 2011). Passend dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Relevanz von Caspase 2 sowohl bei der SKP2- als auch der HDAC2-vermittelten Sensitivierung gegenüber TRAIL beobachtet. Dies spricht dafür, dass Caspase 2 unabhängig von SKP2 oder HDAC2 im Pankreaskarzinom eine entscheidende Rolle im TRAIL-induzierten Apoptosesignalweg spielt, wobei für ein besseres Verständnis der Funktion der Caspase 2 weitere Experimente nötig sind.

4.4 Ausblicke

Die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms wird unter anderem durch die weitgehende therapeutische Resistenz gegenüber etablierten Therapien bestimmt. Trotz wissenschaftlicher Fortschritte in der Aufklärung der Pathogenese des duktales Pankreaskarzinoms, besserte sich die Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten nur unwesentlich (Schneider et al., 2005; Mitry et al., 2008).

TRAIL-agonistische Wirkprinzipien stellen vor allem auf Grund ihrer relativ selektiven Wirkung auf entartete Zellen ein vielversprechendes Therapeutikum bei humanen Krebserkrankungen dar. Bisher limitiert jedoch die Resistenz vieler Tumorzellen gegenüber TRAIL seine Anwendung.

Das F-Box-Protein SKP2 wird im Pankreaskarzinom hoch exprimiert und ist einerseits entscheidend an der Zellzyklusregulation beteiligt, andererseits zeigt diese Arbeit eine wichtige Funktion von SKP2 bei der Regulation der Apoptose. Obwohl die genauen molekularen Mechanismen der Kontrolle der TRAIL-Resistenz durch SKP2 weiter unklar sind, definieren die Daten SKP2 als molekulare Zielstruktur für neue therapeutische Interventionen im Pankreaskarzinom.

In Tumoren sind HDACs an der Regulation von Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration und Angiogenese beteiligt (Glozak et al., 2007) und werden bereits breit in der Klinik angewendet. Auch im duktales Pankreaskarzinom wurde die Beteiligung von HDACs an der Kontrolle von Proliferation, Apoptose und Metastasierung schon mehrfach gezeigt (Schneider et al., 2010). Leider sind HDACI als Monotherapeutika nur in einer kleinen Gruppe hämatologischer Tumoren wirksam. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass rational und molekular begründete HDACI-basierte Kombinationstherapien in der Behandlung solider Tumoren wirksam sind (Bots et al., 2009). Solche geeigneten Kombinationen zu finden, ist vor allem beim Pankreaskarzinom von Bedeutung, nachdem eine kürzlich veröffentlichte klinische Phase-II-Studie keine Effektivität des schwachen HDACI CI-994 kombiniert mit dem aktuellen Standardtherapeutikum Gemcitabine belegen konnte (Richards et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von HDACI die TRAIL-Resistenz im Pankreaskarzinom überwindet. Dies stellt einen neuen therapeutischen Ansatz dar, der nach Bestätigung *in vivo* in der Klinik angewendet werden kann.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist ein Tumor mit einer sehr schlechten Prognose und konservative Therapiestrategien werden bisher erfolglos eingesetzt.

Obwohl das F-Box-Protein S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 2 (SKP2) im duktalem Pankreaskarzinom hoch exprimiert wird und die Zellzyklusprogression reguliert, sind seine weiteren Funktionen in Pankreaskarzinomzellen unbekannt. Mittels RNA-Interferenz konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass SKP2 in einigen duktalem Pankreaskarzinomzelllinien Resistenz gegenüber TRAIL, aber nicht gegenüber dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid vermittelt. Es wurde nach Behandlung von mit *SKP2*-siRNA transfizierten MiaPaCa2 Zellen mit TRAIL eine beschleunigte Spaltung des BH3-*only* Proteins BID und eine gesteigerte Herunterregulation von c-Flip_L, XIAP und MCL1 beobachtet. Insgesamt zeigen die Daten eine neue Funktion von SKP2 in der Regulation der extrinsischen Apoptose auf.

Obwohl gezeigt wurde, dass Histondeacetylasen (HDACs), vor allem die Klasse I HDACs HDAC1, 2 und 3 im Pankreaskarzinom hoch exprimiert werden, ist wenig über die spezifischen Funktionen der HDAC-Isoenzyme bekannt. Der *Knockdown* von HDAC2, aber nicht der von HDAC1, resultierte in Pankreaskarzinomzellen in einer Sensitivierung für TRAIL. Dementsprechend sensitiviert der HDAC-Inhibitor Valproinsäure für TRAIL-induzierte Apoptose in Pankreaskarzinomzellen. Auf molekularer Ebene wurde eine erhöhte Expression des DR5, eine beschleunigte Spaltung des BH3-*only* Proteins BID und eine erhöhte Caspase-Aktivierung in HDAC2-depletierten und TRAIL-behandelten Zellen beobachtet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die basale NF- κ B-Aktivität in duktalem Pankreaskarzinomzellen unter der Kontrolle von HDAC2 steht.

Insgesamt charakterisieren diese Daten eine neue HDAC2-Isoenzym-spezifische Funktion in Pankreaskarzinomzellen und zeigen eine weitere Strategie auf, um die TRAIL-Resistenz in Pankreaskarzinomzellen zu überwinden.

6 Literaturverzeichnis

Alleva, R., Tomasetti, M., Andera, L., Gellert, N., Borghi, B., Weber, C., Murphy, M. P., Neuzil, J. "Coenzyme Q Blocks Biochemical but Not Receptor-Mediated Apoptosis by Increasing Mitochondrial Antioxidant Protection." *FEBS Lett*, 503 (2001) 46-50

Ashkenazi, A., Holland, P., Eckhardt, S. G. "Ligand-Based Targeting of Apoptosis in Cancer: The Potential of Recombinant Human Apoptosis Ligand 2/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Rhapo2l/Trail)." *J Clin Oncol*, 26 (2008) 3621-30

Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I. L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokh, Z., Schwall, R. H. "Safety and Antitumor Activity of Recombinant Soluble Apo2 Ligand." *J Clin Invest*, 104 (1999) 155-62

Bai, J., Sui, J., Demirjian, A., Vollmer, C. M., Jr., Marasco, W., Callery, M. P. "Predominant Bcl-XI Knockdown Disables Antiapoptotic Mechanisms: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Based Triple Chemotherapy Overcomes Chemoresistance in Pancreatic Cancer Cells in Vitro." *Cancer Res*, 65 (2005) 2344-52

Baliga, B. C., Read, S. H., Kumar, S. "The Biochemical Mechanism of Caspase-2 Activation." *Cell Death Differ*, 11 (2004) 1234-41

Bicaku, E., Marchion, D. C., Schmitt, M. L., Munster, P. N. "Selective Inhibition of Histone Deacetylase 2 Silences Progesterone Receptor-Mediated Signaling." *Cancer Res*, 68 (2008) 1513-9

Bots, M., Johnstone, R. W. "Rational Combinations Using Hdac Inhibitors." *Clin Cancer Res*, 15 (2009) 3970-7

Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G. P., Connell, S., Tait, S. W., Dillon, C. P., Flanagan, J. M., Beere, H. M., Green, D. R. "Characterization of Cytoplasmic Caspase-2 Activation by Induced Proximity." *Mol Cell*, 35 (2009) 830-40

Braeuer, S. J., Buneker, C., Mohr, A., Zwacka, R. M. "Constitutively Activated Nuclear Factor-Kappab, but Not Induced Nf-Kappab, Leads to Trail Resistance by up-Regulation of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein in Human Cancer Cells." *Mol Cancer Res*, 4 (2006) 715-28

Buchwald, M., Krämer, O. H., Heinzl, T. "Hdaci--Targets Beyond Chromatin." *Cancer Lett*, 280 (2009) 160-7

Carew, J. S., Giles, F. J., Nawrocki, S. T. "Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms of Cell Death and Promise in Combination Cancer Therapy." *Cancer Lett*, 269 (2008) 7-17

Droin, N., Bichat, F., Rebe, C., Wotawa, A., Sordet, O., Hammann, A., Bertrand, R., Solary, E. "Involvement of Caspase-2 Long Isoform in Fas-Mediated Cell Death of Human Leukemic Cells." *Blood*, 97 (2001) 1835-44

Einama, T., Kagata, Y., Tsuda, H., Morita, D., Ogata, S., Ueda, S., Takigawa, T., Kawarabayashi, N., Fukatsu, K., Sugiura, Y., Matsubara, O., Hatsuse, K. "High-Level Skp2 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Correlation with the Extent of Lymph Node Metastasis, Higher Histological Grade, and Poorer Patient Outcome." *Pancreas*, 32 (2006) 376-81

- Frescas, D., Pagano, M. "Deregulated Proteolysis by the F-Box Proteins Skp2 and Beta-Trcp: Tipping the Scales of Cancer." *Nat Rev Cancer*, 8 (2008) 438-49
- Fritsche, P., Seidler, B., Schüler, S., Schnieke, A., Gottlicher, M., Schmid, R. M., Saur, D., Schneider, G. "Hdac2 Mediates Therapeutic Resistance of Pancreatic Cancer Cells Via the Bh3-Only Protein Noxa." *Gut*, 58 (2009) 1399-409
- Fulda, S. "Apoptosis Pathways and Their Therapeutic Exploitation in Pancreatic Cancer." *J Cell Mol Med*, 13 (2009) 1221-7
- Fulda, S. "Inhibitor of Apoptosis Proteins as Targets for Anticancer Therapy." *Expert Rev Anticancer Ther*, 7 (2007) 1255-64
- Fulda, S. "Modulation of Trail-Induced Apoptosis by Hdac Inhibitors." *Curr Cancer Drug Targets*, 8 (2008) 132-40
- Fulda, S., Debatin, K. M. "Extrinsic Versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy." *Oncogene*, 25 (2006) 4798-811
- Gallinari, P., Di Marco, S., Jones, P., Pallaoro, M., Steinkuhler, C. "Hdacs, Histone Deacetylation and Gene Transcription: From Molecular Biology to Cancer Therapeutics." *Cell Res*, 17 (2007) 195-211
- Glozak, M. A., Seto, E. "Histone Deacetylases and Cancer." *Oncogene*, 26 (2007) 5420-32
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., Heinzl, T. "Valproic Acid Defines a Novel Class of Hdac Inhibitors Inducing Differentiation of Transformed Cells." *Embo J*, 20 (2001) 6969-78
- Grozinger, C. M., Schreiber, S. L. "Deacetylase Enzymes: Biological Functions and the Use of Small-Molecule Inhibitors." *Chem Biol*, 9 (2002) 3-16
- Guha, M., Xia, F., Raskett, C. M., Altieri, D. C. "Caspase 2-Mediated Tumor Suppression Involves Survivin Gene Silencing." *Oncogene*, 29 (2010) 1280-92
- Haberland, M., Montgomery, R. L., Olson, E. N. "The Many Roles of Histone Deacetylases in Development and Physiology: Implications for Disease and Therapy." *Nat Rev Genet*, 10 (2009) 32-42
- Hamacher, R., Schmid, R. M., Saur, D., Schneider, G. "Apoptotic Pathways in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Mol Cancer*, 7 (2008) 64
- Hershko, D. D. "Oncogenic Properties and Prognostic Implications of the Ubiquitin Ligase Skp2 in Cancer." *Cancer*, 112 (2008) 1415-24
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., Ungefroren, H. "Bcl-XI Protects Pancreatic Adenocarcinoma Cells against Cd95- and Trail-Receptor-Mediated Apoptosis." *Oncogene*, 19 (2000) 5477-86
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Offerhaus, G. J. "Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions." *Am J Surg Pathol*, 25 (2001) 579-86
- Huang, S., Sinicrope, F. A. "Sorafenib Inhibits Stat3 Activation to Enhance Trail-Mediated Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells." *Mol Cancer Ther*, 9 (2010) 742-50

- Hussein, M. R., Haemel, A. K., Wood, G. S. "Apoptosis and Melanoma: Molecular Mechanisms." *J Pathol*, 199 (2003) 275-88
- Igney, F. H., Krammer, P. H. "Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis." *Nat Rev Cancer*, 2 (2002) 277-88
- Inayat-Hussain, S. H., Chan, K. M., Rajab, N. F., Din, L. B., Chow, S. C., Kizilors, A., Farzaneh, F., Williams, G. T. "Goniothalamin-Induced Oxidative Stress, DNA Damage and Apoptosis Via Caspase-2 Independent and Bcl-2 Independent Pathways in Jurkat T-Cells." *Toxicol Lett*, 193 (2010) 108-14
- Inoue, S., Harper, N., Walewska, R., Dyer, M. J., Cohen, G. M. "Enhanced Fas-Associated Death Domain Recruitment by Histone Deacetylase Inhibitors Is Critical for the Sensitization of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Trail-Induced Apoptosis." *Mol Cancer Ther*, 8 (2009) 3088-97
- Inoue, S., Twiddy, D., Dyer, M. J., Cohen, G. M. "Upregulation of Trail-R2 Is Not Involved in Hdaci Mediated Sensitization to Trail-Induced Apoptosis." *Cell Death Differ*, 13 (2006) 2160-2
- Izeradjene, K., Douglas, L., Tillman, D. M., Delaney, A. B., Houghton, J. A. "Reactive Oxygen Species Regulate Caspase Activation in Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Resistant Human Colon Carcinoma Cell Lines." *Cancer Res*, 65 (2005) 7436-45
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. "Cancer Statistics, 2010." *CA Cancer J Clin*, 60 (2010) 277-300
- Jenuwein, T., Allis, C. D. "Translating the Histone Code." *Science*, 293 (2001) 1074-80
- Johnstone, R. W., Frew, A. J., Smyth, M. J. "The Trail Apoptotic Pathway in Cancer Onset, Progression and Therapy." *Nat Rev Cancer*, 8 (2008) 782-98
- Kaler, P., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Augenlicht, L., Klampfer, L. "Hdac2 Deficiency Sensitizes Colon Cancer Cells to Tnfalpha-Induced Apoptosis through Inhibition of Nf-Kappab Activity." *Exp Cell Res*, 314 (2008) 1507-18
- Kauh, J., Fan, S., Xia, M., Yue, P., Yang, L., Khuri, F. R., Sun, S. Y. "C-Flip Degradation Mediates Sensitization of Pancreatic Cancer Cells to Trail-Induced Apoptosis by the Histone Deacetylase Inhibitor Lbh589." *PLoS One*, 5 (2010) e10376
- Khanbolooki, S., Nawrocki, S. T., Arumugam, T., Andtbacka, R., Pino, M. S., Kurzrock, R., Logsdon, C. D., Abbruzzese, J. L., McConkey, D. J. "Nuclear Factor-Kappab Maintains Trail Resistance in Human Pancreatic Cancer Cells." *Mol Cancer Ther*, 5 (2006) 2251-60
- Kim, B. M., Hong, S. H. "Sequential Caspase-2 and Caspase-8 Activation Is Essential for Saikosaponin a-Induced Apoptosis of Human Colon Carcinoma Cell Lines." *Apoptosis*, 16 (2011) 184-97
- Kim, S. Y., Herbst, A., Tworkowski, K. A., Salghetti, S. E., Tansey, W. P. "Skp2 Regulates Myc Protein Stability and Activity." *Mol Cell*, 11 (2003) 1177-88
- Kitagawa, M., Lee, S. H., McCormick, F. "Skp2 Suppresses P53-Dependent Apoptosis by Inhibiting P300." *Mol Cell*, 29 (2008) 217-31

- Koschny, R., Walczak, H., Ganten, T. M. "The Promise of Trail--Potential and Risks of a Novel Anticancer Therapy." *J Mol Med*, 85 (2007) 923-35
- Krämer, O. H. "Hdac2: A Critical Factor in Health and Disease." *Trends Pharmacol Sci*, 30 (2009) 647-55
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., Gottlicher, M. "The Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Selectively Induces Proteasomal Degradation of Hdac2." *Embo J*, 22 (2003) 3411-20
- Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C., Villunger, A. "The Enigma of Caspase-2: The Laymen's View." *Cell Death Differ*, 16 (2009) 195-207
- Kuijlen, J. M., Bremer, E., Mooij, J. J., den Dunnen, W. F., Helfrich, W. "Review: On Trail for Malignant Glioma Therapy?" *Neuropathol Appl Neurobiol*, 36 (2010) 168-82
- Kumar, S. "Caspase 2 in Apoptosis, the DNA Damage Response and Tumour Suppression: Enigma No More?" *Nat Rev Cancer*, 9 (2009) 897-903
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., Seiser, C. "Essential Function of Histone Deacetylase 1 in Proliferation Control and Cdk Inhibitor Repression." *EMBO J*, 21 (2002) 2672-81
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N. "Histone Deacetylases Associated with the Msin3 Corepressor Mediate Mad Transcriptional Repression." *Cell*, 89 (1997) 349-56
- Lavrik, I. N., Golks, A., Baumann, S., Krammer, P. H. "Caspase-2 Is Activated at the Cd95 Death-Inducing Signaling Complex in the Course of Cd95-Induced Apoptosis." *Blood*, 108 (2006) 559-65
- LeBlanc, H. N., Ashkenazi, A. "Apo2l/Trail and Its Death and Decoy Receptors." *Cell Death Differ*, 10 (2003) 66-75
- Lee, M. W., Park, S. C., Kim, J. H., Kim, I. K., Han, K. S., Kim, K. Y., Lee, W. B., Jung, Y. K., Kim, S. S. "The Involvement of Oxidative Stress in Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail)-Induced Apoptosis in Hela Cells." *Cancer Lett*, 182 (2002) 75-82
- Lehmann, A., Denkert, C., Budczies, J., Buckendahl, A. C., Darb-Esfahani, S., Noske, A., Muller, B. M., Bahra, M., Neuhaus, P., Dietel, M., Kristiansen, G., Weichert, W. "High Class I Hdac Activity and Expression Are Associated with Rela/P65 Activation in Pancreatic Cancer in Vitro and in Vivo." *BMC Cancer*, 9 (2009) 395
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J. L. "Pancreatic Cancer." *Lancet*, 363 (2004) 1049-57
- Lin, C. F., Chen, C. L., Chang, W. T., Jan, M. S., Hsu, L. J., Wu, R. H., Tang, M. J., Chang, W. C., Lin, Y. S. "Sequential Caspase-2 and Caspase-8 Activation Upstream of Mitochondria During Ceramide and Etoposide-Induced Apoptosis." *J Biol Chem*, 279 (2004) 40755-61

- Lin, H. K., Chen, Z., Wang, G., Nardella, C., Lee, S. W., Chan, C. H., Yang, W. L., Wang, J., Egia, A., Nakayama, K. I., Cordon-Cardo, C., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P. P. "Skp2 Targeting Suppresses Tumorigenesis by Arf-P53-Independent Cellular Senescence." *Nature*, 464 (2010) 374-9
- Liptay, S., Weber, C. K., Ludwig, L., Wagner, M., Adler, G., Schmid, R. M. "Mitogenic and Antiapoptotic Role of Constitutive Nf-KappaB/Rel Activity in Pancreatic Cancer." *Int J Cancer*, 105 (2003) 735-46
- Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S., Samali, A. "Trail Receptor Signalling and Modulation: Are We on the Right Trail?" *Cancer Treat Rev*, 35 (2009) 280-8
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Turner, J. G., Schmitt, M. L., Morelli, D. R., Munster, P. N. "Hdac2 Regulates Chromatin Plasticity and Enhances DNA Vulnerability." *Mol Cancer Ther*, 8 (2009) 794-801
- Marks, P. A. "Discovery and Development of Saha as an Anticancer Agent." *Oncogene*, 26 (2007) 1351-6
- Michels, J., Johnson, P. W., Packham, G. "Mcl-1." *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (2005) 267-71
- Mihaljevic, A. L., Michalski, C. W., Friess, H., Kleeff, J. "Molecular Mechanism of Pancreatic Cancer--Understanding Proliferation, Invasion, and Metastasis." *Langenbecks Arch Surg*, 395 (2010) 295-308
- Mitry, E., Rachet, B., Quinn, M. J., Cooper, N., Coleman, M. P. "Survival from Cancer of the Pancreas in England and Wales up to 2001." *Br J Cancer*, 99 Suppl 1 (2008) S21-3
- Montgomery, R. L., Davis, C. A., Potthoff, M. J., Haberland, M., Fielitz, J., Qi, X., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N. "Histone Deacetylases 1 and 2 Redundantly Regulate Cardiac Morphogenesis, Growth, and Contractility." *Genes Dev*, 21 (2007) 1790-802
- Nakayama, K. I., Nakayama, K. "Regulation of the Cell Cycle by Scf-Type Ubiquitin Ligases." *Semin Cell Dev Biol*, 16 (2005) 323-33
- Natoni, F., DiIordì, L., Santoni, C., Gilardini Montani, M. S. "Sodium Butyrate Sensitises Human Pancreatic Cancer Cells to Both the Intrinsic and the Extrinsic Apoptotic Pathways." *Biochim Biophys Acta*, 1745 (2005) 318-29
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., Walczak, H. "Is Trail the Holy Grail of Cancer Therapy?" *Apoptosis*, 14 (2009) 607-23
- Olsson, M., Vakifahmetoglu, H., Abruzzo, P. M., Hogstrand, K., Grandien, A., Zhivotovsky, B. "Disc-Mediated Activation of Caspase-2 in DNA Damage-Induced Apoptosis." *Oncogene*, 28 (2009) 1949-59
- Reichert, M., Saur, D., Hamacher, R., Schmid, R. M., Schneider, G. "Phosphoinositide-3-Kinase Signaling Controls S-Phase Kinase-Associated Protein 2 Transcription Via E2f1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells." *Cancer Res*, 67 (2007) 4149-56
- Retzer-Lidl, M., Schmid, R. M., Schneider, G. "Inhibition of Cdk4 Impairs Proliferation of Pancreatic Cancer Cells and Sensitizes Towards Trail-Induced Apoptosis Via Downregulation of Survivin." *Int J Cancer*, 121 (2007) 66-75

- Richards, D. A., Boehm, K. A., Waterhouse, D. M., Wagener, D. J., Krishnamurthi, S. S., Rosemurgy, A., Grove, W., Macdonald, K., Gulyas, S., Clark, M., Dasse, K. D. "Gemcitabine Plus Ci-994 Offers No Advantage over Gemcitabine Alone in the Treatment of Patients with Advanced Pancreatic Cancer: Results of a Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study." *Ann Oncol*, 17 (2006) 1096-102
- Ripka, S., Neesse, A., Riedel, J., Bug, E., Aigner, A., Poulsom, R., Fulda, S., Neoptolemos, J., Greenhalf, W., Barth, P., Gress, T. M., Michl, P. "Cux1: Target of Akt Signalling and Mediator of Resistance to Apoptosis in Pancreatic Cancer." *Gut*, 59 (2010) 1101-10
- Sahu, R. P., Batra, S., Kandala, P. K., Brown, T. L., Srivastava, S. K. "The Role of K-Ras Gene Mutation in Trail-Induced Apoptosis in Pancreatic and Lung Cancer Cell Lines." *Cancer Chemother Pharmacol*, 67 (2011) 481-7
- Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Balci, M. K., Omer, A., Griffith, T. S., Sanlioglu, S. "High Levels of Endogenous Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression Correlate with Increased Cell Death in Human Pancreas." *Pancreas*, 36 (2008) 385-93
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., Krammer, P. H. "Regulation of Death Receptor-Mediated Apoptosis Pathways." *Int J Biochem Cell Biol*, 32 (2000) 1123-36
- Schneider, G., Hamacher, R., Eser, S., Friess, H., Schmid, R. M., Saur, D. "Molecular Biology of Pancreatic Cancer--New Aspects and Targets." *Anticancer Res*, 28 (2008) 1541-50
- Schneider, G., Krämer, O. H., Fritsche, P., Schüler, S., Schmid, R. M., Saur, D. "Targeting Histone Deacetylases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *J Cell Mol Med*, 14 (2010) 1255-63
- Schneider, G., Reichert, M., Saur, D., Hamacher, R., Fritsch, R., Schmid, R. M. "Hdac3 Is Linked to Cell Cycle Machinery in Miapaca2 Cells by Regulating Transcription of Skp2." *Cell Prolif*, 40 (2007) 522-31
- Schneider, G., Saur, D., Siveke, J. T., Fritsch, R., Greten, F. R., Schmid, R. M. "Ikka Controls P52/Relb at the Skp2 Gene Promoter to Regulate G1- to S-Phase Progression." *EMBO J*, 25 (2006) 3801-12
- Schneider, G., Schmid, R. M. "Genetic Alterations in Pancreatic Carcinoma." *Mol Cancer*, 2 (2003) 15
- Schneider, G., Siveke, J. T., Eckel, F., Schmid, R. M. "Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects." *Gastroenterology*, 128 (2005) 1606-25
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., Kim, K. "Caspase-2 Primes Cancer Cells for Trail-Mediated Apoptosis by Processing Procaspase-8." *Embo J*, 24 (2005) 3532-42
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., Krämer, O. H. "Acetylation of Non-Histone Proteins Modulates Cellular Signalling at Multiple Levels." *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (2009) 185-98
- Sun, L., Cai, L., Yu, Y., Meng, Q., Cheng, X., Zhao, Y., Sui, G., Zhang, F. "Knockdown of S-Phase Kinase-Associated Protein-2 Expression in MCF-7 Inhibits Cell Growth and Enhances the Cytotoxic Effects of Epirubicin." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39 (2007) 999-1007

- Thomas, R. P., Farrow, B. J., Kim, S., May, M. J., Hellmich, M. R., Evers, B. M. "Selective Targeting of the Nuclear Factor-KappaB Pathway Enhances Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Pancreatic Cancer Cell Death." *Surgery*, 132 (2002) 127-34
- Trarbach, T., Moehler, M., Heinemann, V., Kohne, C. H., Przyborek, M., Schulz, C., Sneller, V., Gallant, G., Kanzler, S. "Phase II Trial of Mapatumumab, a Fully Human Agonistic Monoclonal Antibody That Targets and Activates the Tumour Necrosis Factor Apoptosis-Inducing Ligand Receptor-1 (Trail-R1), in Patients with Refractory Colorectal Cancer." *Br J Cancer*, 102 (2010) 506-12
- Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H., Kalthoff, H. "Cd95 and Trail Receptor-Mediated Activation of Protein Kinase C and Nf-KappaB Contributes to Apoptosis Resistance in Ductal Pancreatic Adenocarcinoma Cells." *Oncogene*, 20 (2001) 4258-69
- Vogler, M., Durr, K., Jovanovic, M., Debatin, K. M., Fulda, S. "Regulation of Trail-Induced Apoptosis by XIAP in Pancreatic Carcinoma Cells." *Oncogene*, 26 (2007) 248-57
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Soderberg, O., Kerppola, T. K., Larsson, L. G. "The F-Box Protein Skp2 Participates in C-Myc Proteasomal Degradation and Acts as a Cofactor for C-Myc-Regulated Transcription." *Mol Cell*, 11 (2003) 1189-200
- Wagner, K. W., Engels, I. H., Deveraux, Q. L. "Caspase-2 Can Function Upstream of Bid Cleavage in the Trail Apoptosis Pathway." *J Biol Chem*, 279 (2004) 35047-52
- Wang, P., Zhang, J., Bellail, A., Jiang, W., Hugh, J., Kneteman, N. M., Hao, C. "Inhibition of Rip and C-Flip Enhances Trail-Induced Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells." *Cell Signal*, 19 (2007) 2237-46
- Wang, X. C., Wu, Y. P., Ye, B., Lin, D. C., Feng, Y. B., Zhang, Z. Q., Xu, X., Han, Y. L., Cai, Y., Dong, J. T., Zhan, Q. M., Wu, M., Wang, M. R. "Suppression of Anoikis by Skp2 Amplification and Overexpression Promotes Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Mol Cancer Res*, 7 (2009) 12-22
- Weichert, W. "Hdac Expression and Clinical Prognosis in Human Malignancies." *Cancer Lett*, 280 (2009) 168-76
- Wilting, R. H., Yanover, E., Heideman, M. R., Jacobs, H., Horner, J., van der Torre, J., DePinho, R. A., Dannenberg, J. H. "Overlapping Functions of Hdac1 and Hdac2 in Cell Cycle Regulation and Haematopoiesis." *Embo J*, 29 (2010) 2586-97
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., Oehme, I. "Hdac Family: What Are the Cancer Relevant Targets?" *Cancer Lett*, 277 (2009) 8-21
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., Marks, P. A. "Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action." *Oncogene*, 26 (2007) 5541-52
- Yang, X. J., Seto, E. "The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases: From Bacteria and Yeast to Mice and Men." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (2008) 206-18
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S. "Caspase-2 Function in Response to DNA Damage." *Biochem Biophys Res Commun*, 331 (2005) 859-67

Lebenslauf

Persönliche Daten

Susanne Theresa Paula Schüler
Hornstraße 12b, 93053 Regensburg
01577-6824274
susischueler@yahoo.de
Geb. am 30. April 1984 in Stuttgart

Schulische Ausbildung

1994 - 2003 Gymnasium Dingolfing (Abitur 1,6)
2002 - 2003 Jungstudentin im Fach Klarinette an der Hochschule für Musik und Theater München

Studium

2003 - 2005 Vorklinischer Teil des Humanmedizinstudiums an der Technischen Universität und der Ludwig-Maximilians-Universität München
August 2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)
2005 - 2010 Klinischer Teil des Humanmedizinstudiums an der Technischen Universität München
2006 - 2007 Studium an der Université Catholique de Lille in Frankreich als Erasmusstudentin
Oktober 2010 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1,5)

Praktische Tätigkeiten

Krankenpflegepraktika

März, August, September 2004 Medizinische Poliklinik und Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München

Famulaturen

März 2006 Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Klinikum St. Georg Leipzig
Dezember 2006 - Juli 2007 Kliniken für Pneumologie, Endokrinologie, Traumatologie, Neurologie, Psychiatrie der Université Catholique de Lille in Frankreich
August 2007 Frauenklinik der Technischen Universität München
September 2007 Orthopädische Gemeinschaftspraxis Dingolfing
März 2008 Urologische Klinik der Technischen Universität München

Praktisches Jahr

August 2009 - Juli 2010
1. Tertian in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Marmara University of Istanbul
2. Tertian in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Krankenhaus Landshut-Achdorf
3. Tertian in der II. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München und im Deutschen Herzzentrum München

Sonstiges

- August 2008 -
März 2009 Studentische Hilfskraft in der Gynäkologischen Ambulanz
der Frauenklinik der Technischen Universität München
- März 2009 -
August 2010 Wissenschaftliche Hilfskraft in der II. Medizinischen Klinik
der Technischen Universität München

Ärztliche Tätigkeit

- seit Februar 2011 Assistenzärztin in der Universitätsfrauenklinik Regensburg im
Caritas-Krankenhaus St. Josef

Promotionsvorhaben

- seit April 2008 an der II. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München:
„TRAIL-Resistenz im duktalem Adenokarzinom des Pankreas –
molekulare Mechanismen.“

Publikationen

- Oktober 2009 P. Fritsche, B. Seidler, S. Schüler, A. Schnieke, M. Göttlicher,
R. M. Schmid, D. Saur and G. Schneider.
„HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via
the BH3-*only* protein NOXA.“ Gut 58:1399-409.
- November 2009 G. Schneider, O.H. Krämer, P. Fritsche, S. Schüler, R.M. Schmid and
D. Saur.
„Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma.“
J Cell Mol Med 14:1255-63.
- April 2010 S. Schüler, P. Fritsche, S. Diersch, A. Arlt, R.M. Schmid, D. Saur,
G. Schneider.
„HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells.“
Molecular Cancer 9:80.
- Januar 2011 S. Schüler, S. Diersch, R. Hamacher, R.M. Schmid, D. Saur and
G. Schneider.
SKP2 confers resistance of pancreatic cancer cells towards TRAIL-
induced apoptosis. International Journal of Oncology (2011) 38:219-25.
- Oktober 2010 Posterpräsentation auf der 65. Jahrestagung der DGVS in Stuttgart:
„HDAC2 reguliert die TRAIL-induzierte Apoptose von
Pankreaskarzinomzellen.“

Sprachkenntnisse

- Englisch - fließend in Wort und Schrift
Französisch - fließend in Wort und Schrift
Türkisch - erweiterte Grundkenntnisse

Danksagung

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

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Roland M. Schmid für die Möglichkeit in seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Günter Schneider bedanken, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir diese Promotionsarbeit überlassen hat. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, vermittelte mir die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens, und sein enormes Wissen sowie seine Erfahrung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Rainer Hamacher, der mir mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft beim Erlernen der verschiedenen Methoden, der Auswertung und der Interpretation der Ergebnisse zu Seite stand.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die ausdauernde Unterstützung von Frau Petra Fritsche, Frau Annika Henrich und Frau Sandra Diersch, durch die es mir möglich wurde auch komplizierte Methodik zu erlernen und zu verstehen.

Für die stete Unterstützung bedanke ich bei Frau Birgit Kohnke-Ertel und Frau Kerstin Hoffmann. Frau Tatjana Netz möchte ich für ihre lehrreiche Einweisung in die Arbeitsweise im Labor danken, durch die mir einige Pannen erspart geblieben sind. Aber auch alle anderen Mitarbeiter des Labors hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme und lieferten mir immer neue Tipps und Tricks für deren Lösung.

Abschließend gilt der Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung und ihren Rückhalt das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben.