

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München**

**Klinikum rechts der Isar**

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

**Der PI3K Signalweg kontrolliert das S-Phase Kinase  
assoziierte Protein 2-Gen via E2F1 in Pankreastumorzellen**

Maximilian Reichert

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. G. Schneider  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Ebert  
3. apl. Prof. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 15.09.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.2009 angenommen

Maximilian Reichert

**Der PI3K Signalweg kontrolliert das S-Phase Kinase  
assoziierte Protein 2-Gen via E2F1 in Pankreastumorzellen**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Das Pankreaskarzinom	8
1.2 Der PI3K-AKT Signalweg	8
1.3 Das Retinoblastoma-Protein und die E2F-Transkriptionsfaktor-Familie	10
1.4 Das S-Phase Kinase assoziierte Protein 2 (SKP2)	11
1.5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>13</b>
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3 Kommerziell erhältliche Kits	15
2.1.4 Geräte	15
2.1.5 Lösungen und Puffer	16
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Small interfering RNA (siRNA)	18
2.1.8 PCR-Primer und Oligonukleotide	19
2.1.9 Luciferasereporter-Gen-Analyse	19
2.1.9 Zelllinien	19
<b>2.2 Experimentalmethoden</b>	<b>20</b>
2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Westernblot	22
2.2.3 BrdU-Inkorporations-Assay	23
2.2.4 Luciferasereporter-Gen Assay	24
2.2.5 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	24
2.2.6 Genexpressionsanalyse mit Microarrays	27
2.2.7 Echt-Zeit RT-PCR	29
2.2.8 FACS-Analyse	30
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Die Blockade des PI3K Signalwegs vermindert Proliferation sowie G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen</b>	<b>31</b>
3.1.1 Der PI3K-Inhibitor Ly294002 reduziert die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen	31
3.1.2 Ly294002 hemmt die G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen	32

<b>3.2 Der PI3K Signalweg kontrolliert die Expression zentraler Regulatoren der G1-S-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen</b>	<b>33</b>
3.2.1 Genexpressionsanalyse nach PI3K-Inhibition	33
3.2.2 Proteinexpression wichtiger Zellzyklusregulatoren	34
<b>3.3 Der PI3K Signalweg kontrolliert die Transkription des SKP2 Gens</b>	<b>35</b>
<b>3.4 AKT1 kontrolliert SKP2 auf mRNA und Proteinebene</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Der PI3K-AKT1 Signalweg reguliert die Bindung von E2F1 an den SKP2 Genpromotor</b>	<b>39</b>
3.5.1 Die E2F1-Bindung an den proximalen SKP2 Promotor ist nach Inhibition der PI3K vermindert	39
3.5.2 Der SKP2 Promotor wird direkt von E2F1 reguliert	41
<b>3.6 E2F1 steuert die G1-S-Phasenprogression</b>	<b>43</b>
<b>3.7 Der PI3K/E2F1 Signalweg in verschiedenen Tumorentitäten</b>	<b>44</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1 Der PI3K/AKT Signalweg kontrolliert Proliferation und G1-Phasenprogression	46
4.2 Der PI3K/AKT Signalweg ist über E2F1 mit dem SKP2 Genpromotor verknüpft	47
4.3 E2F1 verbindet den PI3K/AKT Signalweg mit dem Zellzyklus	48
4.4 Der PI3K/E2F1 Signalweg in verschiedenen Tumorentitäten	50
4.5 Ausblicke	50
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>52</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis	52
6.2 Tabellenverzeichnis	52
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>58</b>
<b>Danksagung</b>	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère	mRNA	messenger-RNA
AKT	Vgl. PKB	mTOR	Mammalian target of rapamycin
Ak	Antikörper	NF-κB	Nuclear Factor-κB
APC	Anaphase-promoting complex	nm	Nanometer
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
ATP	Adenosintriphosphat	p.a.	pro analysis (zur Analyse)
BSA	Bovines Serumalbumin	PDAC	Pankreatisch duktales Adenokarzinom
cDNA	komplementäre DNA	PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
cRNA	komplementäre RNA	PBS	Phosphat Buffered Saline
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CKI	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor	pDNA	plasmid DNA
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	PKB	Proteinkinase B
DNA	Desoxyribonucleid acid	PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert in Chromosom 10
DNase	Desoxyribonuclease	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DPC4	Deleted in pancreatic cancer 4 (SMAD4)	Rb	Retinoblastoma Protein
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate	RNA	Ribonucleid Acid

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RNase	Ribonuclease
et al.	et alii (und andere).	rpm	Rotations Per Minute
FACS	Fluorescence activated cell sorting	RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)	RTK	Rezeptorthyrosinkinase
Foxm1	forkhead box M1	SCF	Skp1-Cullin-F-box Protein
FoxO	forkhead box, Subgruppe O	Ser	Serin
g	Gramm (ng, µg, mg)	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	siRNA	Small interfering RNA
G-Phase	Gap-Phase	Skp1	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 1
GPKR	G-Proteingekoppelter Rezeptor	Skp2	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2
GSK3 beta	Glycogen synthase kinase 3 beta	SP1	Specificity protein 1
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	S-Phase	Synthese-Phase
IL	Interleukin	TBE	TRIS-Borat-EDTA
INK4	Inhibitor der Cdk4	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IP	Immunpräzipitation	Thr	Threonin
IRS-1	Insulin Rezeptorsubstrat 1	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
kD	Kilodalton	TP53	Tumorsuppressorprotein 53
l	Liter (µl, ml)	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ly294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one	V	Volt

M	Molar ( $\mu\text{M}$ , mM)		v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
Miz 1	Myc-interacting zinc finger protein 1		w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
M-Phase	Mitose-Phase			

**Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis**

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

In den USA stellen Krebserkrankungen die Haupttodesursache in der Bevölkerung unter 85 Jahren dar. Hierbei ist das Pankreaskarzinom einer der aggressivsten Tumore überhaupt. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um den histologischen Subtyp eines pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC). Der Grund für die hohe Letalität dieser Tumorerkrankung ist ein meist sehr fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose, so dass nur circa 5% der Erkrankten die folgenden fünf Jahre überleben. Sogar bei resektablen Tumorstadien ist, aufgrund der frühen Mikrometastasierung, die Fünfjahresüberlebensrate mit unter 20% sehr schlecht (Jemal et al., 2007). Selbst diese Zahlen erscheinen angesichts einer finnischen Studie, in der eine Gesamt-Fünfjahresüberlebensrate von 0,2% postuliert wird, noch optimistisch (Carpelan-Holmstrom et al., 2005).

Morphologisch verläuft die Karzinogenese des PDAC über präkanzeröse Vorläuferläsionen, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN 1 bis 3)(Hruban et al., 2000). Bereits in diesen präkanzerösen Läsionen werden genetische Aberrationen beschrieben. Zu den frühen genetischen Veränderungen gehört die Mutation des Onkogens *KRAS*. In späteren Läsionen lassen sich Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *INK4A*, *TP53* und *DPC4/SMAD4* nachweisen. Bereits die PanIN Läsionen weisen einen erhöhten Proliferationsindex auf und die gestörte Zellzyklusregulation ist ein Charakteristikum des Pankreaskarzinoms (Schneider et al., 2007; Schneider & Schmid, 2003).

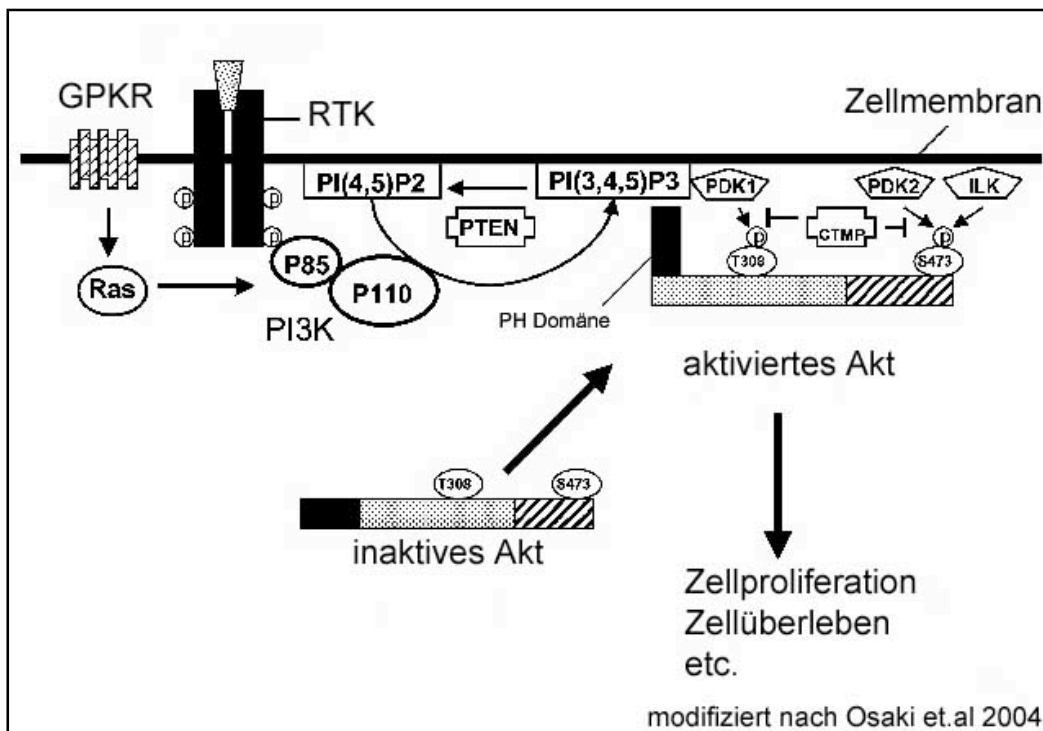
## 1.2 Der PI3K-AKT Signalweg

Der PI3K Signalweg wird durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK), G-proteingekoppelte Rezeptoren (GPKR) oder onkogenes *KRAS* aktiviert. PI3K überführt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, wohingegen PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert im Chromosom 10) diese Reaktion rückgängig machen kann. AKT transloziert zur Zellmembran und interagiert mit Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. Dabei wird AKT von



verschiedenen Kinasen an den Residuen Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert und aktiviert (siehe Abbildung 1)(Osaki et al., 2004).

Der PI3K-AKT Signalweg reguliert über direkte oder indirekte Kontrolle von verschiedenen Transkriptionsfaktoren maßgeblich Zellwachstum und Zellüberleben (Bader et al., 2005). Obwohl keine Mutation im AKT1 Gen im Pankreaskarzinom beschrieben sind, ist der PI3K-AKT Signalweg in Pankreaskarzinomzellen konstitutiv aktiviert (Schlieman et al., 2003). Wie es zu der Aktivierung des PI3K Signalwegs in Pankreaskarzinomzellen kommt, ist noch immer unklar. Eine Herunterregulation von PTEN mit konsekutiver Aktivierung des Signalwegs wurde in PDAC Zellen beschrieben (Asano et al., 2004). Daneben wurde postuliert, dass eine bisher noch unbekannte Rezeptortyrosinkinase eine wichtige Rolle in der PI3K Aktivierung spielt, da das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) essentiell an der Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges beteiligt ist (Asano et al., 2005). Die Transkriptionsfaktoren c-myc und NFkappaB stellen in Pankreaskarzinomzellen wichtige Zielstrukturen stromabwärts des PI3K Signalwegs dar (Asano et al., 2004; Liptay et al., 2003; Shah et al., 2001).



**Abbildung 1:** Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs (Osaki et al., 2004)

Darüber hinaus trägt der PI3K-AKT Signalweg zur Ausbildung von Resistenzen in der Chemotherapie und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen bei (Arlt et al., 2003; Bondar et al., 2002; Fahy et al., 2003; Ng et al., 2000; Perugini et al., 2000).

### **1.3 Das Retinoblastoma-Protein und die E2F-Transkriptionsfaktor-Familie**

Das Retinoblastoma-Protein RB ist ein sehr gut untersuchter Regulator der G1-S-Phasenprogression (Du & Pogoriler, 2006). Die Fähigkeit des Retinoblastoma-Proteins den Zellzyklus negativ zu regulieren besteht darin, den Transkriptionsfaktor E2F1 zu binden und somit die für die S-Phase nötige Transkription bestimmter Gene zu unterbinden. Die Aktivität von RB selbst wird über die konzertierte Aktion G1-Phasen Cycline (Cyclin D, Cyclin E), Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK) und Cyclin-abhängiger Kinasen-Inhibitoren, wie p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, reguliert. In pankreatischen duktaalen Adenokarzinomzellen liegt eine funktionelle Inaktivierung von RB vor (Rozenblum et al., 1997; Schneider et al., 2005).

Die E2F Transkriptionsfaktor-Familie zählt acht Mitglieder (E2F1-8). Um an DNA zu binden, müssen sie ein Heterodimer mit einem Dimerisierungs Partner (DP1-, DP2-) Protein bilden. Die Vertreter E2F1-E2F5 besitzen sowohl Aktivierungs- als auch Reprimierungsdomänen. Allgemein gelten jedoch E2F1-3 als aktivierende Vertreter der E2F-Familie, wohingegen E2F4, E2F5 und E2F6 Repressoren darstellen. Die erst kürzlich identifizierten E2F7 und E2F8 können DNA auch ohne Dimerisierung mit DP-Proteinen binden (Rowland & Bernards, 2006). Neben der Zellzyklus-Progression steuert die E2F-Familie Apoptose und vermittelt die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden. Darüber hinaus ist die E2F-Familie an der Karzinogenese zahlreicher menschlicher Tumore beteiligt (Tsantoulis & Gorgoulis, 2005). Die Funktion der E2F Transkriptionsfaktor-Familie in PDAC Zellen ist hingegen nur unzureichend untersucht. Eine Überexpression von E2F1 im Pankreaskarzinom wurde bereits beschrieben und eine Korrelation von E2F1 mit Proliferationsmarkern legt eine wachstumsfördernde Wirkung von E2F1 im Pankreaskarzinom nahe (Yamazaki et al., 2003).

## **1.4 Das S-Phase Kinase assoziierte Protein 2 (SKP2)**

Die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Degradation spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Zellzyklusregulatoren (Nakayama et al., 2000). Dabei kommt es zur Polyubiquitinierung des Proteinsubstrats über eine E3 Ubiquitin-Ligase und zur konsekutiven Degradation im 26S Proteasomkomplex. Das F-Box Protein S-Phase Kinase assoziierte Protein 2 (SKP2) ist eine Rezeptorkomponente des SCF (Skp1-Cullin-F-box Protein) Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der unter anderem mit dem CKI (Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor) p27<sup>Kip1</sup> interagiert und zu dessen Ubiquitin-abhängigen Degradation führt. Durch die Proteolyse von p27<sup>Kip1</sup> kommt es zu einer maximalen Aktivierung des CyclinE-Cdk2 Komplexes, der seinerseits Rb phosphoryliert. Durch diese Hyperphosphorylierung wird E2F1 aus dem Komplex mit Rb entlassen und kann so die Transkription verschiedener Gene die für den G1/S-Phasenübergang benötigt werden, induzieren (Nakayama et al., 2001).

Die Überexpression des Onkogens SKP2 ist bei einer großen Zahl menschlicher Tumore beschrieben. Dazu zählen Prostata-Karzinome, orale Plattenepithel-Karzinome, Mamma-Karzinome, Lymphome, kleinzellige Bronchialkarzinome und kolorektale Karzinome (Nakayama & Nakayama, 2006). Interessanterweise wurde auch eine hohe SKP2-Expression in PDAC Zellen beobachtet und dieser gilt als unabhängiger Vorhersagewert für das Patientenüberleben (Andreu et al., 2005; Einama et al., 2006). Die SKP2 Expression wird sowohl über einen proteosomalen Abbau als auch über eine transkriptionelle Aktivierung reguliert. Die transkriptionelle Regulation ist hierbei jedoch unzureichend untersucht. Eine Regulation von SKP2 durch den Notch-Signalweg, den CD28-Signalweg, den NFkappaB-Signalweg, den Forkhead box M1 (Foxm1)–Transkriptionsfaktor und den SP1-Transkriptionsfaktor konnte jedoch bereits gezeigt werden (Appleman et al., 2006; Huang & Hung, 2006; Sarmiento et al., 2005; Schneider et al., 2006; Wang et al., 2005).

Obwohl SKP2 transkriptionell von der Phosphoinositol-3-OH-Kinase (PI3K) reguliert wird, sind die molekularen Mechanismen, die diesen Signalweg mit dem SKP2-Gen verbinden, noch immer unklar (Andreu et al., 2005; Mamillapalli et al., 2001).

### ***1.5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit***

Auch wenn die molekularen Mechanismen, die den PI3K Signaltransduktionsweg mit dem Zellzyklus verbinden, noch nicht im Detail verstanden werden, gilt als gesichert, dass der PI3K Signalweg den G1-S-Phasen Übergang in Pankreaskarzinomzellen kontrolliert (Perugini et al., 2000; Takeda et al., 2004).

In dieser Arbeit soll das komplexe genetische Programm untersucht werden, das für die PI3K/AKT-abhängige G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen verantwortlich ist.

Zudem sollte die molekulare Verbindung des SKP2 Gens mit dem PI3K/AKT Signalweg untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Agarose	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Albumin, Bovine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, Deutschland
Blotting Grade – Blocker – Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-MEM Medium	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
D-PBS	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
FuGene6	Roche, Mannheim, Deutschland
Glycine	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ly294002	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
Natriumzitrat Dihydrat	
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim, Deutschland
Oligofectamin™	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM®	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Passiv Lyse Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland

Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	EMD Biosciences, San Diego, CA; USA
Precision Plus Protein™ Standards All Blue	Bio-Rad, München, Deutschland
Proteinase K	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Salmon Sperm DNA Protein G/A Agarose	Upstate, New York, U.S.A.
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio; USA
Streptavidin, Alexa Fluor® 680 conjugate	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
tRNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, entionisiert	DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 2: Chemikalien**

Folgende Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Ethanol, Methanol, Salzsäure, Natronlauge, Isopropanol, Eisessig, Glycerin (Glycerol).

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Whatman-Papier	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	TPP® AG, Trasadingen, Schweiz

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

### 2.1.3 Kommerziell erhältliche Kits

Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Set	Affymetrix
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Luciferase Assay System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix mit MgCl <sub>2</sub> Kit	Sigma
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems

**Tabelle 4: Kommerziell erhältliche Kits**

### 2.1.4 Geräte

Agarosegel-Elektrophoreseapparatur	Hoefler
Bakterienschüttler Certomat	Termoshake
Elektroblot-Kammer für Western-Blot	Biometra
Elektrophoreseapparaturen	Hoefler/Pharmacia
ELISA-Reader	SLT Spectra
Entwicklermaschine	Amersham Bioscience
Heizblöcke	Eppendorf
Homogenisator	Polytron PT 3100, Kinematica AG
Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Imagemaster	QuantityOne, BioRad
Luminometer Mumat LB 9501	Berthold
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Odyssey Infrared Imaging System	Licor
Photometer	NanoTrop NP-10, Peqlab
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner
Spannungsgeräte	Hoefler/Pharmacia
Sterilbank	Heraeus

Taqman	ABI Prism, 7700 Sequence Dector
Thermocycler	Biometra
Ultraschallgerät	Bandelin electronic Sonopuls
Waagen/Feinwaage	Sartorius
Westernblottapparatur	Biometra
Zellkultur Inkubatoren	Heraeus
Zentrifugen	Heraeus, Eppendorf

**Tabelle 5: Geräte**

## 2.1.5 Lösungen und Puffer

### Puffer für Westernblot

Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
Laufpuffer (10fach)	35mM SDS, 0,25M TRIS/HCl, 2M Glycin
Transferpuffer	39mM Glycin, 48 mM TRIS/HCl, 0,037 % (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol, pH 8,3
PBS (10fach)	1,4M NaCl, 27mM KCl, 40mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 18mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	0,35M SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,3M TRIS/HCl, 0,7mM Bromphenolblau Na-Salz, 5% (w/v) Mercaptoethanol, pH6,8
IP-Puffer	50mM HEPES (pH 7,9), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) Glycerin
Waschpuffer	1x PBS, 0,1% (v/v) NP40
Stripping-Puffer (Odyssey)	25mM Glycin, 1-2% (w/v) SDS, pH2

**Tabelle 6: Puffer für Westernblot**

### Puffer für FACS-Analyse

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

**Tabelle 7: Puffer für FACS-Analyse**



## Puffer für Chromatinimmunpräzipitation

L1-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA pH8,0 2mM, NP-40 0,1% (v/v), Glycerol 10% (v/v)
L2-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA 5mM, SDS 1% (w/v)
Dilutions-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA 0,5mM, NP-40 0,5% (v/v), NaCl 200mM
Elutions-Puffer	Tris pH 8,0 10mM, EDTA 1mM, SDS 1% (w/v)
Hochsalz-Puffer	Tris pH 8,0 20mM, EDTA 2mM, NP-40 1% (v/v), NaCl 500mM, SDS 0,1% (w/v)
Niedrigsalz-Puffer (1xTE, pH 8,0)	Tris pH 8,0 10mM, EDTA 1mM
LiCl-Puffer	Tris pH 8,0 20mM, EDTA 1mM, NP-40 0,5% (v/v), LiCl 250mM, Na-deoxycholat 0,5% (w/v)

**Tabelle 8: Puffer für ChIP**

## 2.1.6 Antikörper

### Antikörper für Chromatinimmunpräzipitation

AK	Typ	Wirt
AcH3 Anti-acetyl-Histone H3	Upstate	Kaninchen
AcH4 Anti-acetyl-Histone H4	Upstate	Kaninchen
E2F-1	Santa Cruz C-20	Kaninchen
Pol II	Santa Cruz N-20	Kaninchen

**Tabelle 9: Antikörper für ChIP**

## Antikörper für Western-Blot

AK	Typ	Wirt
Beta-Aktin	Sigma-Aldrich	Maus
CDC25a	Santa Cruz	Maus
CDK2	BD Biosciences	Maus
Cyclin A	Santa Cruz	Kaninchen
Cyclin D1	Merck	Maus
Cyclin D2	BD Biosciences	Maus
Cyclin E	Santa Cruz N-20	Maus
E2F-1	Santa Cruz C-20	Kaninchen
p21 <sup>Cip1</sup>	Santa Cruz	Maus
Skp2	Zymed	Maus

**Tabelle 10: Antikörper für Western-Blot**

### 2.1.7 Small interfering RNA (siRNA)

Die folgenden siRNAs wurden von der Firma Ambion synthetisiert.

siRNA	siRNA-Zielsequenz (Matrizenstrang)
scramble duplex I (SDI)	AAC AGT CGC GTT TGC GAC TGG
AKT1	AAG CTG GAG AAC CTC ATG CTG
E2F1	AAG TCA CGC TAT GAG ACC TCA

**Tabelle 11: siRNA-Sequenzen**

## 2.1.8 PCR-Primer und Oligonukleotide

Die folgenden Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert.

### Primer für die Echt-Zeit PCR

CyclinD1	CycD1 F	5'- GCC GAG AAG CTG TGC ATC TAC -3'
	CycD1 R	5'- GTT CAA TGA AAT CGT GCG GG -3
Skp2	Skp2 F	5'- TGG GAA TCT TTT CCT GTC TG -3'
	Skp2 R	5'- GAA CAC TGA GAC AGT ATG CC -3
Cyclophilin	Cyclo F	5'- ATG GTC AAC CCC ACC GTG T -3'
	Cyclo R	5'- TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC -3

Tabelle 12: Primersequenzen für Echt-Zeit PCR

### Oligonukleotide für ChIP-PCR

GAPDH	GAPDH F	5'- AGC TCA GGC CTC AAG ACC TT -3'
	GAPDH R	5'- AAG AAG ATG CGG CTG ACT GT -3
Skp2	Skp2 F	5'- CTC CCC GCC TAC CCC GTG G -3'
	Skp2 R	5'- CAG ACC CGC TAA GCC TAG CAA CG -3'

Tabelle 13: Oligonukleotidsequenzen für ChIP-PCR

### Primer zur Klonierung von Skp2

Skp2	Skp2 F	5'-CCCGCTCGAGCCCCCTTCCCTCTTCCACTGTTTTTC-3'
	Skp2 R	5'-CCCGCTCGAGCCATTTTCATGCTCTTCCCCTTTTTGCAATC-3

Tabelle 14: Primer zur Klonierung von Skp2

## 2.1.9 Luciferasereporteragen-Analyse

**Vektoren:** pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen), pGL3basic und pGL3(Promega), pCMV-E2F1, pE2F1-TA-Luc

### 2.1.9 Zelllinien

Es wurden ausschließlich humane Karzinomzelllinien verwendet. Die Zellen wurden bezogen bei ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA; USA) (LGC Promochem, Wesel, Deutschland).

Die Kultivierung von MiaPaCa2-, HTC116- und SW480-Zellen erfolgte in DMEM Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung.

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in DMEM Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS, 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin und 1% nicht essentielle Aminosäuren bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung.

Die Kultivierung von DanG Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% (w/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung.

## **2.2 Experimentalmethoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur**

Die Zellen wurden mit den angegebenen Medien in Brutschränken kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen in Sterilwerkbänken. Regelmäßig wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und passergiert. Zur Passage und Aussaat der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin abgelöst und vereinzelt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet.

#### **2.2.1.2 Chemische Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase**

Als spezifischer chemischer Inhibitor der PI3K wurde Ly294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) verwendet. Dieser wurde nach Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei –20°C gelagert. Zur Behandlung der Zellen wurde eine 25µM Verdünnung mit dem entsprechenden Medium hergestellt, das alte Medium von den Zellen abgesaugt und durch die Verdünnung ersetzt. Diese wurde für 24 Stunden auf den Zellen belassen.

### **2.2.1.3 siRNA Transfektion**

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Bei der Aussaat der Zellen wurde auf eine geringe Zelldichte geachtet, um damit die Effizienz des Knock-downs durch die siRNA zu optimieren. In 96-Wellplatten wurden 2000 Zellen pro Well, in 12-Wellplatten 40000 Zellen pro Well und in 6-Wellplatten 50000 Zellen pro Well ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit Medium ohne FCS gewaschen, um sämtliche Serumrückstände zu entfernen. Anschließend wurden bei 96-Wellplatten 80µl, bei 12-Wellplatten 400µl und bei 6-Wellplatten 800µl serumfreies Medium vorgelegt.

Die Transfektion von siRNAs in die Zellen erfolgte mit Oligofectamin™ nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden pro Well 200nM siRNA eingesetzt. Oligofectamin™ wurde mit Opti-MEM® 5 Minuten vorinkubiert und dann zu dem Ansatz aus siRNA und Opti-MEM® zugegeben. Nach erneuten 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Die Transfektion wurde nach 4 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank durch Medium mit 20% (v/v) FCS gestoppt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium der transfizierten Zellen durch frisches mit 10% (v/v) FCS ersetzt. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zu Ganzzellextrakten verarbeitet.

### **2.2.1.4 Ganzzellextrakte**

Für die Gewinnung von Ganzzellextrakten wurden die Zellen vor der Ernte mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde IP-Puffer (mit 0,5 mM PMFS, 1mM DTT und ggf. mit 1:100 verdünntem Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II) auf die Zellen gegeben und anschließend mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinbestimmung erfolgte durch die Methode nach Bradford (1976). Dazu wurden in eine Mikrotiterplatte je Well 300µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Farbstoffkonzentrates pipettiert. Die Standardreihe wurde aus Rinderalbumin erstellt. Die Absorbtion der Farbreaktion wurde im Mikroplatten Absorptionsphotometer Anthos 2001 bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt und konnte daraufhin mit Hilfe der Standardreihe in die Proteinkonzentration umgerechnet werden.

Anschließend wurde in allen Proben, durch Verdünnung mit Lysepuffer, eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und in Laemmli aufgenommen. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden die Extrakte bei -80°C aufbewahrt.

## 2.2.2 Westernblot

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.** Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus Ganzzellextrakten erfolgte durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei wurden, je nach Molekulargewicht der Proteine, Trenngele zwischen 7,5% bis 15% Acrylamid verwendet:

	Trenngele					Sammelgel
	7,5%	9%	10%	12%	15%	4%
ddH <sub>2</sub> O	2,45 ml	2,35 ml	2,05 ml	1,7 ml	1,25 ml	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 µl
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

**Tabelle 15: Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel**

(Mengen beziehen sich auf 5,5 x 8,5 x 0,075 cm Gele)

Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet. Die Polymerisation startete nach Zugabe von APS und TEMED. Die fertige Trenngellösung wurde in eine Hoefer™ Dual Gel Caster gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 20 Minuten Polymerisation konnte das Isopropanol entfernt und mit Sammelgellösung überschichtet werden, in welches der Probenkamm eingeführt wurde. Nach Entfernen des Kammes wurden die Probenaschen mit Laufpuffer gewaschen. Die Ganzzellextrakte wurden vor dem Auftragen erhitzt (5 Minuten, 95°C) und bei einer konstanten Spannung zwischen 120-160V in einer Gel-Laufapparatur Hoefer™ SE 250 bzw. SE260 aufgetrennt.

**Blotten.** Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe einer Semi-Dry-Blottapparat auf eine Immobilon-P PVDF Membran übertragen. Dazu wurde das Trenngel für 5 Minuten in Transferpuffer gelegt. Die Membran wurde zuerst in Methanol aktiviert, dann in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Transferpuffer gelegt. Das Blotten erfolgte je nach Proteingröße zwischen 20-45 Minuten bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

**Immundetektion.** Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockingpuffer (5% Magermilchpulver in Waschpuffer) für 45 Minuten geblockt. Anschließend wurde der erste Antikörper in 3ml Blockingpuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Behandlung mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran in Waschpuffer (3x 10 Minuten) gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper verwendet. Die 60 minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Verdünnung 1:2000 in Blockingpuffer) erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Membran wurde daraufhin wieder, wie oben beschrieben, lichtgeschützt gewaschen. Anschließend konnte die Intensität der Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen 700nm bzw. 800nm mit dem Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System gescannt werden.

**Strippen.** Nach erfolgter Antikörperreaktion können diese wieder von der Membran abgewaschen werden (Strippen), um mit einem anderen Antikörper eine Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran durchzuführen. Dazu wurde die Membran bei Raumtemperatur 20 Minuten in Stripping-Puffer geschüttelt, kurz in Waschpuffer gewaschen und anschließend wieder für 45 Minuten in Blockingpuffer geschwenkt. Daraufhin erfolgte die Immundetektion, wie oben beschrieben.

### 2.2.3 BrdU-Inkorporations-Assay

Die Messung der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporation wurde mit Hilfe des Colorimetric BrdU-Assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU [colorimetric], Roche) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden für die Behandlung mit dem spezifischen chemischen PI3K Inhibitor Ly294002 4000 Zellen pro Well und für die Transfektion mit siRNA 2000 Zellen pro Well ausgesät und nach 24h bzw. 48h entsprechend behandelt. Die Messung des inkorporierten BrdU erfolgte im

Mikroplatten Absorptionsphotometer Anthos 2001 bei einer Wellenlänge von 450nm. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.

#### **2.2.4 Luciferasereportergeren Assay**

Die 5'-regulatorische Einheit des humanen SKP2 Gens wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die oben beschriebenen Primer verwendet. Die daraus resultierten Fragmente wurden in pCR4Blunt-TOPO kloniert. Der SmaI-Verdau erzeugte Fragmente mit einer Länge von 1217bp, die blunt-ended in, mittels SmaI-Verdau eröffneten pGL3basic, kloniert wurden. Das Reportergeren-Konstrukt wurde als SKP2-975/+224Luc bezeichnet und wiederum mit NheI/PfIIF1 verdaut. Die Religation erzeugte das SKP2-273/+244Luc Reportergeren-Konstrukt. Der E2F1 Expressionsvektor pCMV-E2F1 wurde von Dr. B. Eymin, pE2F1-TA-Luc von Dr. B. Yung der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Der pGL3 Promotor diene als Kontrolle.

24 Stunden vor der Transfektion wurden in 12-Wellplatten 40000 Zellen pro Well ausgesät. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und pro Well 1ml Medium vorgegeben. Die Transfektion des Plasmides erfolgte mit FuGene6 gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wurden pro Well 500ng pDNA eingesetzt. Bei Kotransfektionen wurde der DNA-Gehalt mit einem pcDNA3 Vektor (Invitrogen) konstant gehalten. Der Ansatz aus serumfreien Medium, FuGene6 und Plasmid-DNA, wurde 20 Minuten vorinkubiert, bevor pro Well je 100µl zugegeben wurden.

Anschließend wurden die behandelten Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 15 Minuten in Lysepuffer gelöst und geerntet. Nach 20 Minuten auf Eis wurde das Lysat 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Aktivität der Luciferase wurde mit einem Luciferase Assay System am LB 9501 Luminometer bestimmt. Die Versuche wurden im Triplikat durchgeführt.

#### **2.2.5 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Die Interaktion zwischen Proteinen und DNA soll mit Hilfe der ChIP untersucht werden. Durch sequentielle Anwendung von Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern und einer PCR lässt sich das funktionelle Zusammenspiel zwischen



Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Elementen der DNA darstellen. Der experimentelle Ablauf dieser Methode entspricht im Wesentlichen dem Protokoll von (Paro, 2000).

**Prinzip.** Formaldehyd wurde in einer Endkonzentration von 1% auf die Zellen gegeben. Nach Diffusion des Formaldehyds in den Zellkern kommt es zur kovalenten Bindung zwischen Protein und DNA (Crosslinking) sowie von Proteinen untereinander. Die so fixierten Zellen wurden gewaschen und anschließend sonifiziert. Es entstanden DNA-Fragmente einer definierten durchschnittlichen Größe von ungefähr 500bp. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und das verbleibende Chromatin wurde für die nachfolgende Immunpräzipitation eingesetzt. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden relevante Epitope von DNA-gebundenen Proteinen erkannt. Danach wurden diese Immunkomplexe mit Protein-G/A-Agarose-Beads angereichert. Es folgte eine Eluierung von den Beads und das reverse Crosslinking, bei der die DNA von den Proteinen befreit und aufgereinigt wird. Diese DNA wurde in einer PCR-Analyse mit Hilfe bestimmter Primer-Paare amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese detektiert. Parallel zu jeder ChIP wurde ein Teil der lysierten DNA, die nicht den Schritt der Immunpräzipitation durchlaufen hatte, aufgearbeitet und als Normalisierungsstandard (Input) verwendet.

**Durchführung.** Die Zellaussaat erfolgte in Sechslöchplatten mit 50000 Zellen pro Well. Formaldehyd wurde mit einer Endkonzentration von 1% auf die Zellen gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1,25 M Glycin zugeben und erneut fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, mit gekühltem PBS gewaschen und erneut abgesaugt. Nun wurde gekühltes PBS auf die Zellen gegeben (80µl auf ein Six-Well). Die Zellen wurden abgekratzt, in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1600rpm und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde in 500µl L1-Puffer aufgenommen und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Das resuspendierte Pellet wurde daraufhin drei Mal mit einer Spritze (25G) aufgezogen und erneut bei 3000rpm und 4°C für zwei Minuten durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand, der dem Zytoplasma entspricht, wurde verworfen. Das Kernmaterial wurde in 700µl L2-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Nun erfolgte der Aufschluss durch Sonifikation. Jede Probe wurde fünf Mal für 30 Sekunden bei einer Leistung von 60 % (Ultraschallgerät der Firma Bandelin electronic Sonopuls; Netzspannung: 230V, Stromaufnahme: 0,4A, Leistung: 70W,

Frequenz: -20kHz) behandelt. Nach dem Aufschluss wurden die Proben für zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Die einzelnen Proben wurden jeweils mit einer Chromatinmenge von 50µg bei einem Volumen von 500µl (Verdünnung mit Dilutionspuffer) auf eine Konzentration von 100µg/ml eingestellt. Gleichzeitig wurde ein Teil des Chromatins für die Input-Kontrolle mit einer Konzentration von 10µg/ml (Verdünnung mit Elutionspuffer) und einem Volumen von 550µl verwendet. Die Input-Probe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert. Zur Probe wurden 120 µl mit Dilutionspuffer verdünnte Agarose A/G gegeben und bei 4°C auf einem Rotor für zwei bis vier Stunden inkubiert.

Danach wurde das Chromatin-Agarose-Gemisch bei 800rpm und 4°C für eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3-5 µg Antikörper zur Probe gegeben. Die Proben inkubierte man bei 4°C auf Rotor über Nacht. Am nächsten Tag wurde erneut 120µl verdünnte Agarose A/G zur Probe zugegeben und bei 4°C auf dem Rotor für zwei bis vier Stunden belassen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 800rpm wurde der Überstand verworfen. Die Beads wurden in je 700µl der Waschpuffer für fünf Minuten bei 4°C gewaschen. Dabei erfolgten je drei Waschschritte mit jedem der drei Waschpuffer (Niedrigsalz-, LiCl- und Hochsalz-Puffer). Nach jedem Waschschritt wurden die Proben bei 800rpm und 4°C für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschritt wurden 300µl Elutionspuffer zur Probe gegeben und für 15-30 Minuten bei 65°C im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben bei 5000rpm und 4°C für zwei Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde sowohl zu den Proben als auch zu den Input-Proben 30µl NaCl gegeben und über Nacht bei 65°C im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe 2µl Proteinase K (200mg/ml) gegeben und zwei Stunden bei 45°C zum Verdau belassen. Danach wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße in Phase-Lock-Gel Tubes (2ml) überführt. Zu jeder Probe wurden 600µl Phenol/Chloroform pipettiert, kurz gevortext und bei 14 000rpm und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 530 µl abgenommen, in ein neues Phase-Lock-Gel Tube (2ml) überführt und ein gleicher Anteil Chloroform zugegeben. Um eine erneute Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben wie zuvor gevortext und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden nun 470µl abgenommen, in ein Reaktionsgefäß gegeben und einer Ethanol-Fällung unterzogen. Hierfür wurde ein

Anteil von 10% NaAC pH 5,2 1ml Ethanol (100%) und 2µl tRNA (Carrier) addiert. Die Reaktionsgefäße wurden mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert und danach bei 14000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Pellet in 300µl Ethanol (70%) aufgenommen und für eine Stunde bei 14000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde, nachdem es getrocknet war, in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht gelöst.

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit spezifischen Primern für die jeweiligen Promotorsequenzen unter Verwendung des REDTaq ReadyMix PCR Reaction kit. Ein Zwanzigstel des präzipitierten Chromatins wurde für jede PCR-Reaktion eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte in einem PCR-Gerät nach folgendem Programm:

Pause bei 80°C, 2 min bei 94°C, 45 sek bei 94°C, 45 sek bei 60-64°C (je nach Primerpaar-Annealingtemperatur), 45 sek bei 72°C, 10 min bei 72°C und Pause bei 4°C. Um Linearität zu gewährleisten wurden 34-38 Zyklen durchgeführt.

Anschließend wurde die Bindung der Proteine an den jeweiligen Promotorstellen anhand Agarosegelelektrophorese analysiert.

## **2.2.6 Genexpressionsanalyse mit Microarrays**

DanG Zellen wurden mit 25µM Ly294002 behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Duplikate der gesamten RNA wurden mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert und cRNA umgeschrieben. Die cRNA wurde markiert und gemäß dem Affymetrix Standardprotokoll auf das Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Set hybridisiert. Die Expressionsdaten wurden mit der Microarray Suite 5.0 Software analysiert.

**RNA Isolierung.** Für die Durchführung der Expressionsanalyse musste als Erstes die RNA aus den Kontroll- und den behandelten Zellen isoliert werden. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm etwa 60-70% konfluent ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Ly294002 behandelt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Zellernte. Mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kits wurde die Gesamt-RNA nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Medium wurde dazu von den Zellen abgesaugt und diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt in der Zellkulturschale mit 600 µl RLT Puffer

(mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT Puffer) pro Schale lysiert und mit einem Zellschaber abgekratzt. Das Zelllysate wurde zum Homogenisieren in eine QIAshredder Spinsäule gegeben und für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Zu dem homogenisierten Zelllysate wurde je 600 µl 70%iger Ethanol zugegeben, um die selektive Bindung der RNA an der RNeasy Silicagel-Membran zu optimieren. Danach wurde jeweils 700 µl des Zelllysates auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 13600rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt wiederholt, bis kein Zelllysate mehr vorhanden war. Zunächst wurde die an der Membran gebundene RNA gewaschen, indem auf die Säulen je 350 µl RW1 Puffer gegeben und 15 Sekunden bei 13600 rpm zentrifugiert wurde. Die RNA wurde anschließend noch mit DNase behandelt, um auch kleinste Reste von DNA zu entfernen. Nach Angaben des Herstellers wurde dazu das QIAGEN RNase-Free DNase Set verwendet. Dazu wurde auf jede Membran 80 µl DNase-I-Mischung (10 µl DNase-I-Stammlösung und 70 µl RDD Puffer) pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNase wieder mit RW1 Puffer (siehe oben) abgewaschen. Es folgten zwei Waschrritte mit jeweils 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation bei 13600 rpm für zuerst 15 Sekunden und dann 2 Minuten. Daraufhin wurde die Säule zum Trocknen der Membran nochmals für 1 Min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Zum Eluieren der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben und nach kurzer Inkubation für 1 Minute bei 13600 rpm zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

**Konzentrationsbestimmung der RNA.** Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden die RNA Proben 1:20 mit Wasser verdünnt und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption bestimmt.

**Prozessierung.** Die isolierte RNA wurde zunächst gemäß dem vorgegebenen Protokoll in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente anschließend als Vorlage für eine in vitro Transkription zur Synthese biotinmarkierter cRNA. Die cRNA wurde fragmentiert und auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgebrauchten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch die Bildung eines Phycoerythrin gekoppelten Streptavidin-Antikörperkomplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des GenArray Scanner 3000 gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional.

## 2.2.7 Echt-Zeit RT-PCR

Die RNA der humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die isolierte RNA (1 µg) wurde in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion unter Verwendung von TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

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

**Tabelle 16: RT-PCR Pipettieransatz**

Die RT-PCR 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.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte unter der Verwendung von spezifischen Primern mittels Real Time PCR (TaqMan, PE Applied Biosystems). Als Kontrolle diente parallel amplifizierte Cyclophilin-cDNA. Zur Detektion der cDNA Menge wurde der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (PE Applied Biosystems) eingesetzt.

Die Echt-Zeit PCR Bedingungen waren: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, dann Beginn des 40-fachen Zyklus von 1 min 95°C, 15 sec bei 60°C.

Die relative Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung des Verhältnisses der Zielnukleinsäure zu der Anzahl von endogenen Referenztranskripten von Cyclophilin. Das endogene Referenzgen und das Zielgen wurden aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert. Dadurch konnte anschließend ein auf das

housekeeping-Referenzgen bezogener Wert des Zielgens, mit Werten aus anderen Nukleinsäureproben verglichen werden.

### **2.2.8 FACS-Analyse**

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte mit Hilfe der FACS-Technik. Das Anfärben der DNA einer einzelnen Zelle innerhalb einer Population ermöglicht eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen in einzelne Zellen. Die DNA wird hierbei mit der interagierenden und fluoreszierenden Substanz Propidiumiodid gefärbt und bei einer definierten Intensität detektiert. Durch diese Methode, die auf der Messung des DNA Gehalts basiert, kann ein haploider oder diploider Chromosomensatz, der damit die G1-Phase oder die G2-/M-Phase repräsentieren, unterschieden werden. Diejenigen Zellen, die gerade ihren Chromosomensatz replizieren, sich also in der S-Phase befinden, zeigen eine Intensität in einem Bereich zwischen der in G1- und G2-/M-Phase.

Die Zellen wurden hierzu in Sechsllochplatten mit je 50000 Zellen ausgesät und wie bereits beschrieben mit dem PI3K-Inhibitor Ly294002 bzw. mit AKT1-spezifischer siRNA behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mittels Trypsin von der Platte gelöst und in 600µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension bei 1,8rpm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, erneut PBS hinzu gegeben und die Prozedur wiederholt. Nach diesem Waschschrift wurde das Zellpellet in 300µl Propidiumiodid-Färbepuffer aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Zuletzt erfolgte die Fixierung mit Formaldehyd (Endkonzentration: 1%).

Die Auswertung am BD FACSCalibur™-Durchflusszytometer erfolgte mit der Software CellQuestPro. In der graphischen Darstellung wurde die Propidiumiodidintensität gegenüber einer definierten Zellzahl aufgetragen. In dieser Darstellung zeigt sich ein bestimmtes Verteilungsmuster der Zellen, die dann den einzelnen Phasen des Zellzyklus prozentual zugeordnet werden können.

## 3 Ergebnisse

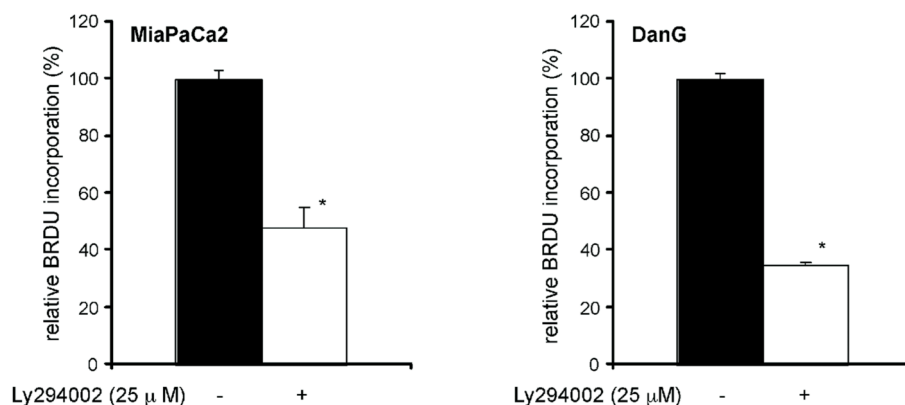
### 3.1 Die Blockade des PI3K Signalwegs vermindert Proliferation sowie G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen

Um den Einfluss des PI3K Signalweges auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurde der spezifische PI3K-Inhibitor Ly294002 verwendet.

#### 3.1.1 Der PI3K-Inhibitor Ly294002 reduziert die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen

Zur Abschätzung des Proliferationsverhaltens von PDAC Zellen nach PI3K Inhibition führte man BrdU-Inkorporations-Assays durch. Dazu wurden die beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und DanG mit Ly294002 behandelt. Nach 24 Stunden wurde die BrdU Aufnahme gemessen. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zeigte sich nach Hemmung der PI3K in MiaPaCa2 Zellen eine Reduktion der BrdU Inkorporation auf 48% und in DanG Zellen auf 35%.

Damit kann in beiden Zelllinien durch PI3K Inhibition eine deutliche Reduktion der Proliferation bewirkt werden (Abbildung 2).

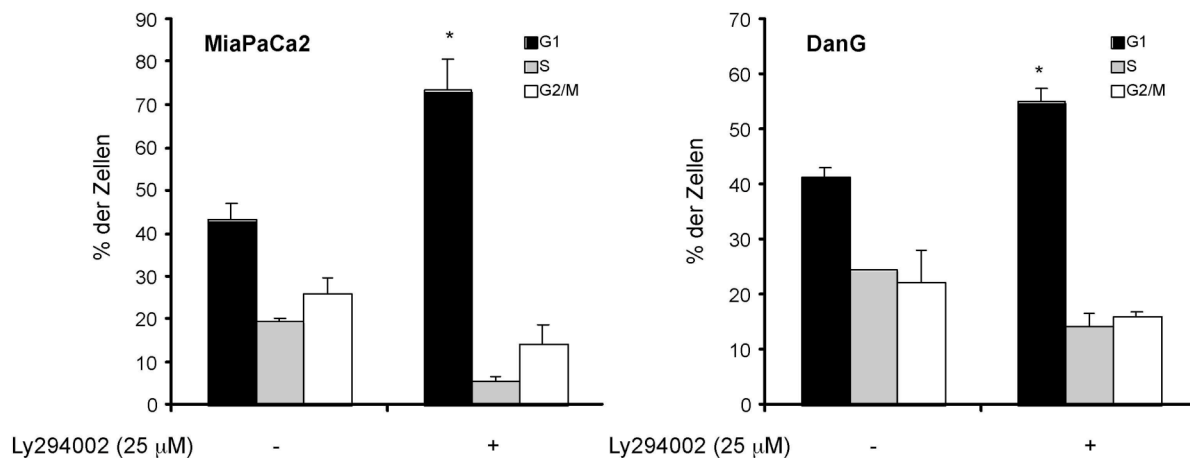


**Abbildung 2: PI3K-Hemmung vermindert Proliferation in PDAC Zellen.** BrdU Inkorporations-Assay von MiaPaCa2 und DanG Zellen 24h nach Zugabe von 25μM Ly294002 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, \*) P < 0,001.

### 3.1.2 Ly294002 hemmt die G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen

Um die verminderte Proliferation der Zellen nach Hemmung der PI3K einer bestimmten Phase im Zellzyklus zuordnen zu können, wurden die Zellen mittels FACS nach Propidiumiodidfärbung analysiert. Der Anteil an MiaPaCa2 Zellen in der G1-Phase stieg nach 24-stündiger Ly294002 Behandlung von 43,3% auf 73,5% an. Daneben verringerte sich der Anteil an MiaPaCa2 Zellen sowohl in der S-Phase (19,6% auf 5,6%) als auch in G2- und M-Phase (26% auf 14,2%)(Abbildung 3).

In DanG Zellen vergrößerte sich der Anteil der Zellen in der G1-Phase durch die Ly294002 Behandlung von 41,4% auf 55,1%. Gleichzeitig konnte man ein verminderte Zahl von Zellen in der S- (24,5% auf 14,5%) sowie G2-/M-Phase (22,4% auf 16,4%) beobachten (Abbildung 3).



**Abbildung 3: PI3K-Hemmung vermindert G1-Phasen Progression in PDAC Zellen.** FACS-Analyse des Zellzyklus. MiaPaCa2 und DanG Zellen wurden 24h mit 25 $\mu$ M Ly294002 behandelt, mit Propidiumiodid gefärbt und FACS analysiert. Der Anteil von Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase ist jeweils angegeben. \*) P < 0,001 verglichen mit den Kontrollen.



## 3.2 Der PI3K Signalweg kontrolliert die Expression zentraler Regulatoren der G1-S-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen

### 3.2.1 Genexpressionsanalyse nach PI3K-Inhibition

Um verantwortliche Gene für den beobachteten G1-Phasenarrest nach PI3K Inhibition zu identifizieren, wurde eine Transkriptomanalyse in DanG Zellen durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen für 24 Stunden mit 25  $\mu$ M Ly294002 behandelt.

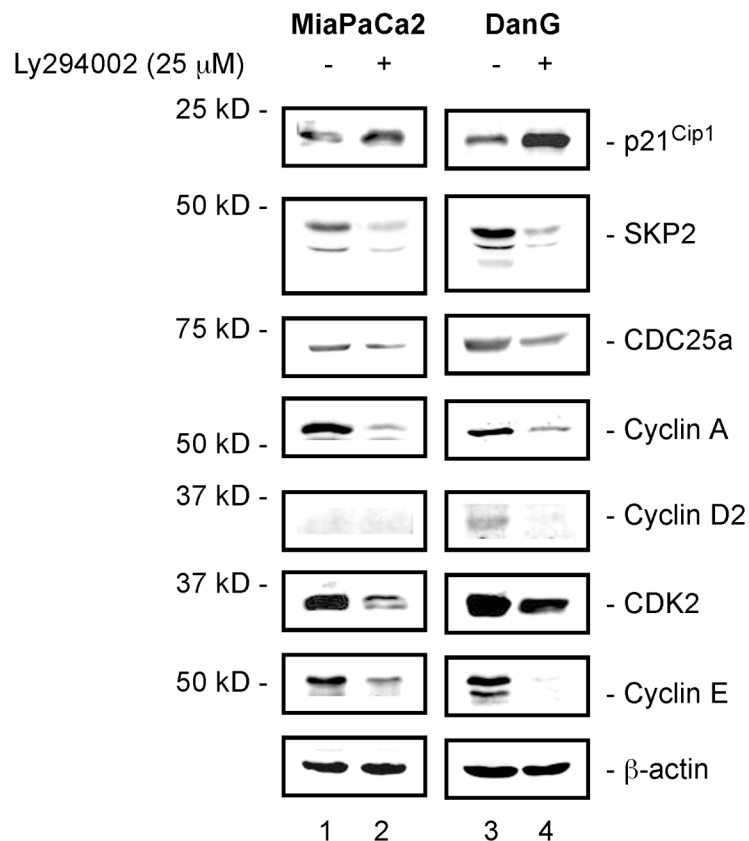
Tabelle 16 zeigt Gene, die mehr als 2,5-fach reguliert waren und von denen eine wichtige Funktion in der G1-S-Phasenprogression bekannt war. Das einzige zellzyklusrelevante Gen, das eine vermehrte Expression nach Ly294002 Behandlung von DanG Zellen zeigte, war das  $p21^{CIP1}$  Gen. Die Gene *SKP2*, *CDC25a*, *CyclinD2*, *CDK2* und *CyclinE* waren herunterreguliert (Tabelle 17).

G1-S Phase Regulatoren, die nach Ly294002 signifikant hochreguliert waren		
Gensymbol	RefSeq Transcript ID	fache Zunahme
$p21^{CIP1}$	NM_000389	4,2
G1-S Phase Regulatoren, die nach Ly294002 signifikant herunterreguliert waren		
Gensymbol	RefSeq Transcript ID	fache Abnahme
SKP2	NM_005983/ NM_032637	8,1
CDC25a	NM_001789/ NM_201567	7,2
Cyclin A	NM_001237	4,2
Cyclin D2	NM_001759	3,9
CDK2	NM_001790/ NM_052827	3,0
Cyclin E2	NM_004702/ NM_057735/ NM_057749	2,8

Tabelle 17: Genexpressionsprofil nach PI3K Inhibition

### 3.2.2 Proteinexpression wichtiger Zellzyklusregulatoren

Die in Tabelle 17 beschriebenen Expressionsveränderungen wurden auf Proteinebene mittels Westernblot-Analysen validiert. Wie der Abbildung 5 zu entnehmen ist, zeigt sich auch auf Proteinebene eine Verminderung der SKP2, CDC25A, CyclinA, CDK2 und CyclinE Expression nach Hemmung der PI3K in MiaPaCa2 und DanG Zellen. Für CyclinD2 zeigte sich in DanG Zellen nach Ly294002 Behandlung eine verminderte Expression. In MiaPaCa2 Zellen konnte das CyclinD2 Protein nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte nach Ly294002 Behandlung ein verminderter CyclinD1 Proteingehalt in beiden Zelllinien detektiert werden. Das einzige, im Microarray hoch regulierte Gen, p21<sup>CIP1</sup>, war erwartungsgemäß auch auf Proteinebene vermehrt nachzuweisen (Abbildung 4).

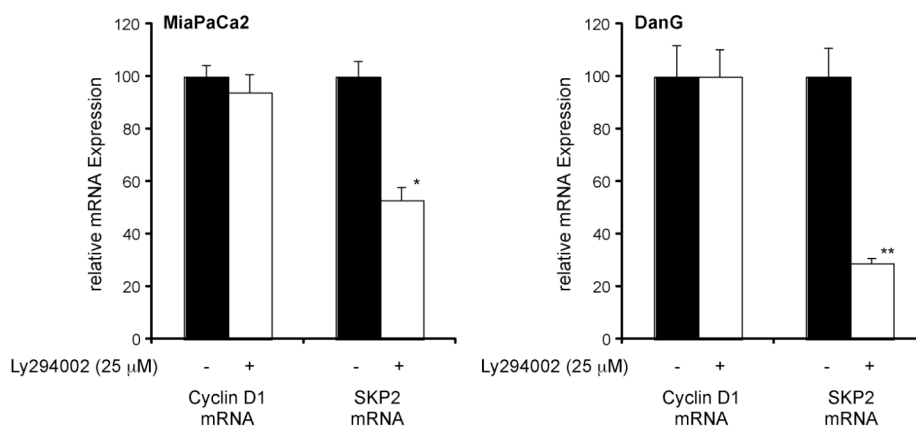


**Abbildung 4: PI3K kontrolliert die Proteinexpression wichtiger G1-S-Phase-Regulatoren.** Westernblot-Analyse der SKP2, CDC25a, Cyclin A, Cyclin D2, CDK2, Cyclin E und Cyclin D1 Expression in MiaPaCa2 Zellen (Spur 1 und 2) und DanG Zellen (Spur 3 und 4), 24h nach Behandlung mit 25μM Ly294002. Die Membran wurde gestriped und mit β-Aktin behandelt, um gleiche Proteinbeladung sicherzustellen.

### 3.3 Der PI3K Signalweg kontrolliert die Transkription des SKP2 Gens

Das SKP2 Gen zeigte mit einer 8,1-fachen verminderten Expression die stärkste Abhängigkeit vom PI3K Signalweg. Die molekularen Mechanismen, die den PI3K Signalweg mit dem SKP2 Gen verbinden, sind jedoch noch ungeklärt. Daher wurde die Regulation von SKP2 im Weiteren untersucht.

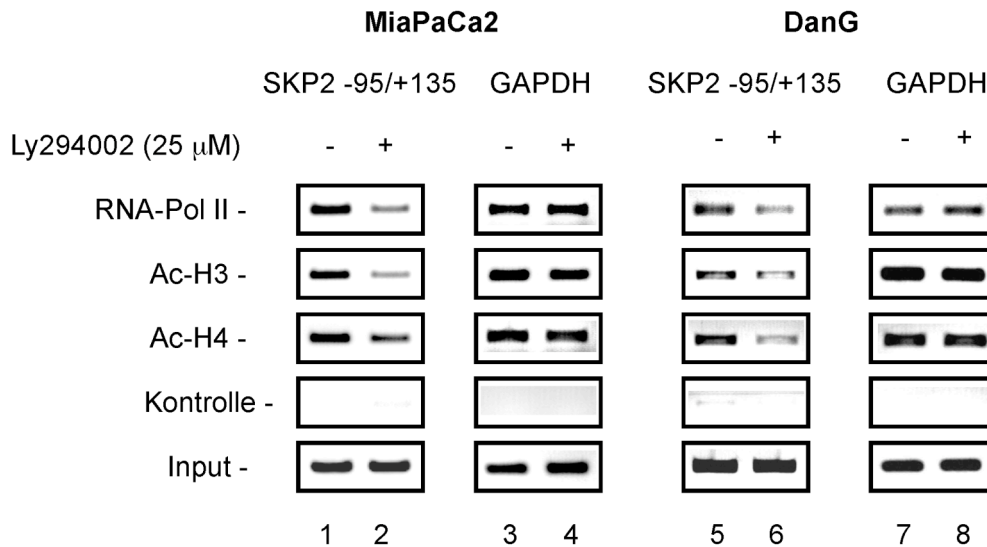
Zunächst wurden die Microarray Daten mittels quantitativer RT-PCR validiert. In MiaPaCa2 Zellen zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutliche Reduktion der SKP2 mRNA auf 52,9%. In DanG Zellen war die SKP2 mRNA-Menge 24 Stunden nach Ly294002 Behandlung auf 28,9% vermindert. Im Vergleich dazu war die CyclinD1 mRNA Expression nach PI3K-Inhibition nicht oder nur marginal in den beiden Zelllinien vermindert (Abbildung 5).



**Abbildung 5: PI3K kontrolliert die SKP2 mRNA Expression.** Quantitative Analyse der Cyclin D1 und SKP2 mRNA Expression. Nach Behandlung von MiaPaCa2 und DanG Zellen mit 25µM Ly294002 (weiße Säule) über 24h oder dem Vehikel (schwarze Säule) wurde die RNA isoliert und die mRNA-Menge wurde mittels Real-Time PCR quantifiziert und gegenüber der Cyclophilinmenge normalisiert. \*) P < 0,002 verglichen mit den Kontrollen; \*\*) P < 0,001 verglichen mit den Kontrollen.

Um die transkriptionelle Regulation von SKP2 nach PI3K Inhibition genauer zu untersuchen wurden ChIP Assays durchgeführt. Sowohl in MiaPaCa2 als auch in DanG Zellen war nach Ly294002 Behandlung deutlich weniger RNA Polymerase II am proximalen SKP2 Promotor gebunden. Am proximalen GAPDH Promotor, der als Kontrolle diente, konnte keine Veränderung der RNA-Polymerase II-Bindung nach PI3K-Inhibition beobachtet werden. Darüber hinaus war nach Zugabe von Ly294002 die Bindung von acetyliertem Histon H3 und H4 am proximalen SKP2 Promotor in

MiaPaCa2 und DanG Zellen vermindert. Die Bindung von acetyliertem Histon am GAPDH Promotor war wiederum unverändert in beiden Zelllinien (Abbildung 6).

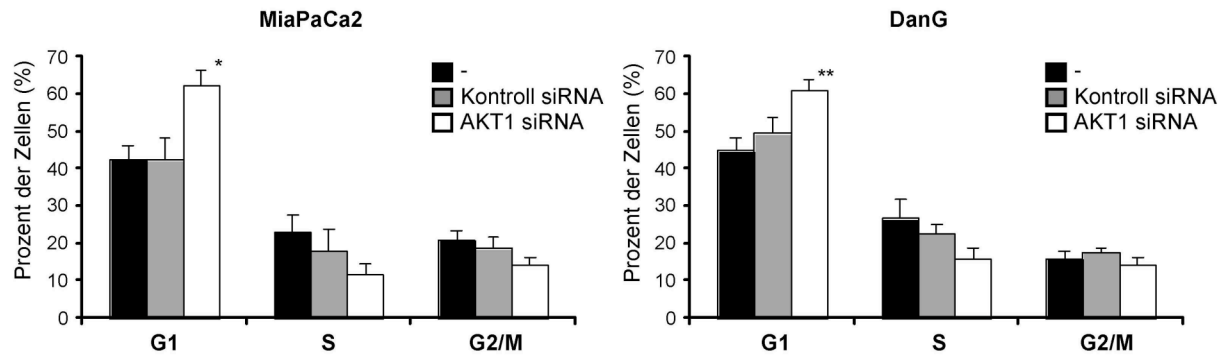


**Abbildung 6: PI3K kontrolliert die SKP2 Transkription.** Chromatinimmunpräzipitationsanalyse des SKP2 Gens. Chromatin von MiaPaCa2 und DanG Zellen, die 24 Stunden mit 25 $\mu$ M Ly294002 behandelt wurden oder als Kontrolle unbehandelt blieben, wurden mit einem Polymerase II-spezifischen Antikörper, einem Anti-Acetyl-Histon H3, einem Anti-Acetyl-Histon H4 oder zur Kontrolle mit einem  $\beta$ -Aktin Antikörper immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA oder 10% des Chromatin-Inputs wurden mit genspezifischen Primern für den SKP2 oder GAPDH Promotor amplifiziert.

### 3.4 AKT1 kontrolliert SKP2 auf mRNA und Proteinebene

Um die Spezifität der Ergebnisse, die eine Ly294002 Behandlung beider Zelllinien lieferten, zu überprüfen, wurden MiaPaCa2 und DanG Zellen mit AKT1-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Der AKT1-Knockdown wurde mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 8).

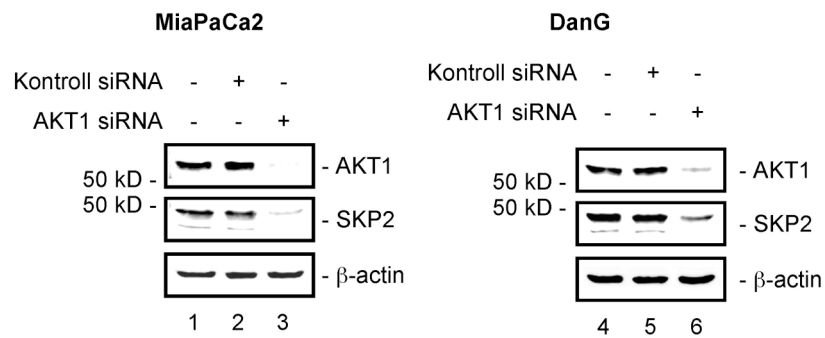
Die BrdU Aufnahme war in mit AKT1 siRNA transfizierten Zellen vermindert (Daten nicht gezeigt). Die FACS-Analysen zeigten abermals, dass die beobachtete Hemmung der Proliferation durch eine Akkumulation von Zellen in der G1-Phase bedingt war. Die Fraktion von in der G1-Phase befindlichen Zellen stieg von 42% auf 62% in MiaPaCa2 und von 45% auf 61% in DanG Zellen 48 Stunden nach Transfektion der AKT1 siRNA an (Abbildung 7).



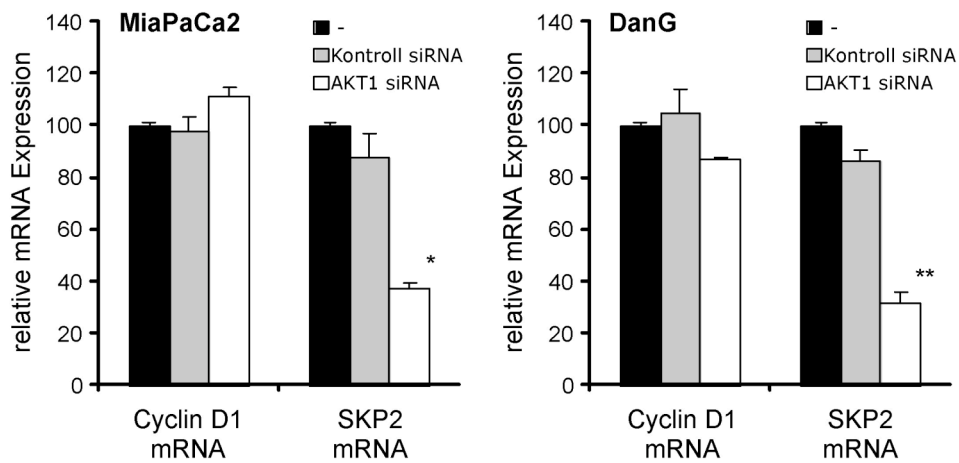
**Abbildung 7: AKT1 Knockdown inhibiert die G1-Phasenprogression von PDAC Zellen.** FACS-Analyse des Zellzyklus. MiaPaCa2 und DanG Zellen wurden mit AKT1-spezifischer siRNA transfiziert. Die Zellen wurden mit PI gefärbt und 48h nach Transfektion mittels FACS analysiert. \*) P = 0,029 verglichen mit den Kontrollen. \*\*) P < 0,001 verglichen mit den Kontrollen.

Der Knockdown von AKT1 führte in MiaPaCa2 und DanG Zellen zu einer deutlichen Verminderung der SKP2 Proteinmengen (Abbildung 9a). Auch auf mRNA-Ebene war die SKP2 mRNA auf 37,8% in MiaPaCa2 und auf 31,5% in DanG Zellen 48 Stunden nach AKT1 siRNA-Transfektion reduziert. Als Kontrolle wurde die Cyclin D1 mRNA-Expression untersucht. Diese blieb nach dem Knockdown von AKT1 unverändert (Abbildung 8b).

A)



B)



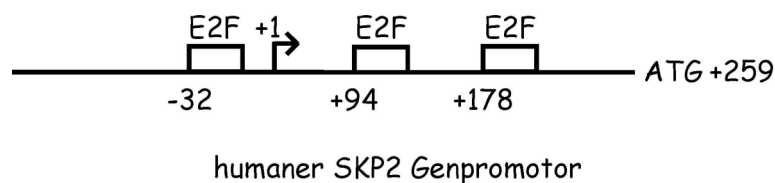
**Abbildung 8: AKT1 Knockdown inhibiert SKP2 Expression in PDAC Zellen.** A) Westernblot-Analyse der AKT1 und SKP2 Proteinmenge 48h nach Transfektion von MiaPaCa2 und DanG Zellen mit einer AKT1-spezifischen siRNA. B) Quantitative SKP2 und Cyclin D1 mRNA Expressionsanalyse. Die gesamte RNA wurde 48h nach Transfektion von MiaPaCa2 und DanG Zellen mit einer AKT1-spezifischen siRNA isoliert. Die mRNA Menge wurde mittels Real-time PCR quantifiziert und gegenüber der Cyclophilinmenge normalisiert. \*)  $P < 0,001$  verglichen mit den Kontrollen. \*\*)  $P = 0,004$  verglichen mit den Kontrollen.

Zusammenfassend bestätigten die durch die Verwendung von AKT1 spezifischer siRNA erhaltener Erkenntnisse die Ergebnisse, die eine Ly294002 Behandlung von MiaPaCa2 und DanG Zellen lieferten.

### 3.5 Der PI3K-AKT1 Signalweg reguliert die Bindung von E2F1 an den SKP2 Genpromotor

#### 3.5.1 Die E2F1-Bindung an den proximalen SKP2 Promotor ist nach Inhibition der PI3K vermindert

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass SKP2 durch E2F1 reguliert wird (Zhang & Wang, 2006). Der proximale humane SKP2 Promotor ist durch drei E2F1 Bindungsstellen charakterisiert (Abbildung 9).

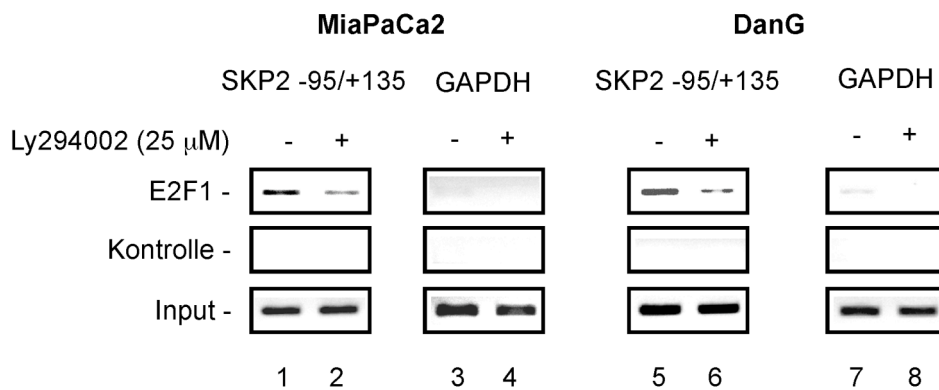


**Abbildung 9: Humaner SKP2 Genpromotor**

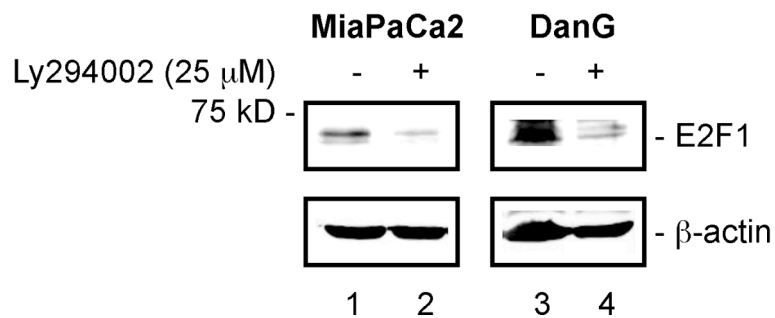
Um die Rolle von E2F1 in der transkriptionellen Regulation von SKP2 nach PI3K Hemmung zu untersuchen, wurden erneut ChIP Assays angewendet. Dabei wurde die Bindung von E2F1 am proximalen SKP2 Promotor 24 Stunden nach Ly294002 Behandlung semiquantitativ gemessen. Es zeigte sich in beiden Zelllinien eine verminderte Bindung von E2F1 am SKP2 Promotor (Abbildung 10a).

Inwiefern die reduzierte Bindung von E2F1 am proximalen SKP2 Promotor durch ein vermindertes E2F1-Protein verursacht wurde, sollte mittels Westernblot-Analysen untersucht werden. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der E2F1 Proteinmenge in MiaPaCa2 und DanG Zellen 24 Stunden nach Ly294002 Behandlung (Abbildung 10b).

A)



B)

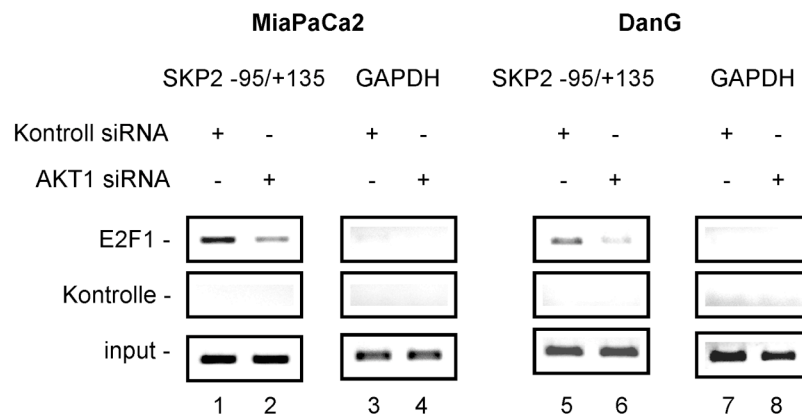


**Abbildung 10: PI3K kontrolliert SKP2 via E2F1.** A) Chromatin Immunpräzipitationsanalyse des SKP2-Gens. Chromatin von MiaPaCa2 und DanG Zellen wurde jeweils 24h mit 25 $\mu$ M Ly294002 behandelt oder als unbehandelte Kontrolle belassen. Die Immunpräzipitation wurde mit einem E2F1-spezifischen Antikörper bzw. einem  $\beta$ -Aktin Antikörper zur Kontrolle durchgeführt. Die präzipitierte DNA bzw. 10% des Chromatin-Inputs wurde mit gen-spezifischen Primern des SKP2- oder GAPDH-Promotors amplifiziert. B) Western-Blot der E2F1-Expression in MiaPaCa2 (Spur 1 und 2) und DanG Zellen (Spur 3 und 4) 24h nach Behandlung der Zellen mit 25 $\mu$ M Ly294002. Die Beladung gleicher Proteinmengen wurde mit  $\beta$ -Aktin überprüft.

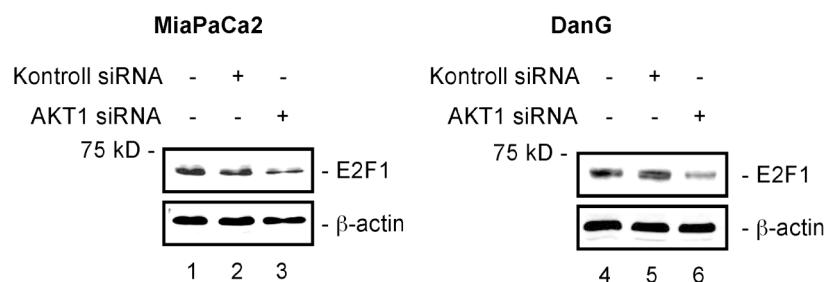
Um die Ergebnisse zu untermauern, wurden in beiden Zelllinien erneut ein Knockdown von AKT1 durchgeführt. Auch hier konnte 48 Stunden nach Transfektion eine verminderte E2F1-Bindung am proximalen SKP2 Promotor beobachtet werden (Abbildung 11a). Weiterhin zeigte sich eine reduzierte E2F1 Proteinexpression nach AKT1 Knockdown in MiaPaCa2 und DanG Zellen (Abbildung 11b).



**A)**



**B)**



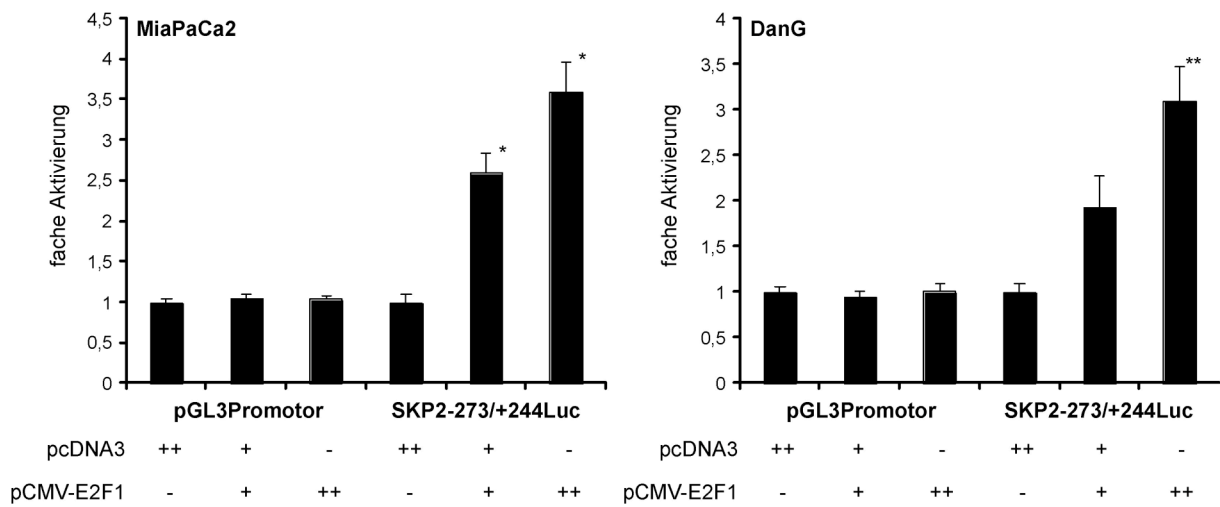
**Abbildung 11: AKT1 kontrolliert SKP2 via E2F1.** A) Chromatin Immunpräzitationsanalyse des SKP2-Gens. Chromatin von MiaPaCa2 und DanG Zellen wurde jeweils mit einer AKT1-spezifischen siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Immunpräzitation wurde mit einem E2F1-spezifischen Antikörper bzw. einem  $\beta$ -Aktin Antikörper als Negativkontrolle 48h nach Transfektion durchgeführt. Die präzipitierte DNA bzw. 10% des Chromatin-Inputs wurde mit Gen-spezifischen Primern des SKP2- oder GAPDH-Promotors amplifiziert. B) Western-Blot der E2F1-Expression in MiaPaCa2 (Spur 1 und 2) und DanG Zellen (Spur 3 und 4) 48h nach Transfektion der Zellen ohne siRNA, mit einer Kontrolle oder mit AKT1-spezifischer siRNA. Die Beladung gleicher Proteinmengen wurde mit  $\beta$ -Aktin überprüft.

### 3.5.2 Der SKP2 Promotor wird direkt von E2F1 reguliert

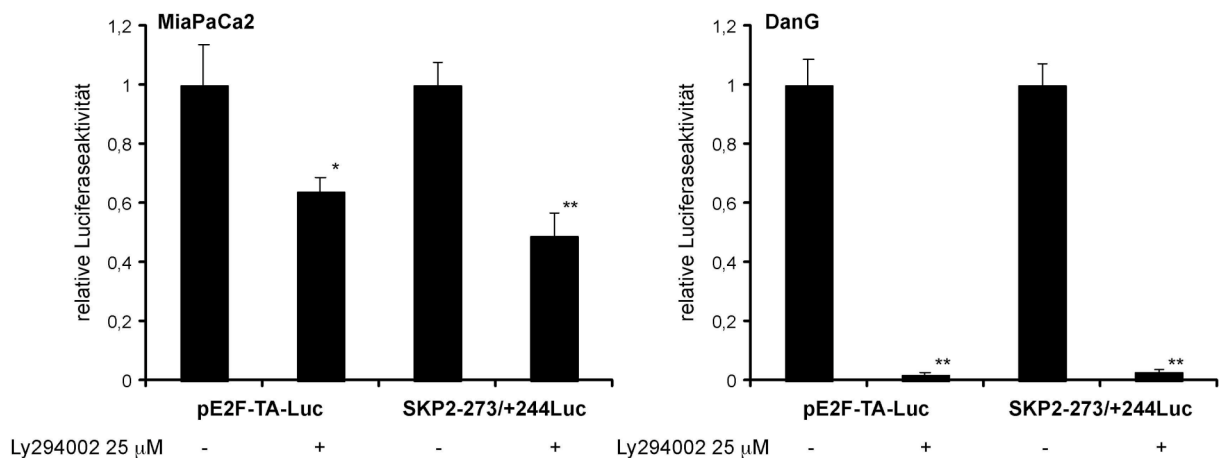
Der Nachweis einer direkten Regulation des SKP2 Promotors durch E2F1 in Pankreaskarzinomzellen sollte mittels Luziferase Reporterassays erbracht werden. Hierzu wurde ein Teil der Zellen mit einem pGL3 Promotor Kontrollvektor und ein anderer Teil mit dem SKP2 -273/+244 Reportergenkonstrukt transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen in einer ansteigenden Konzentration eines E2F1-Expressionsplasmids ko-transfiziert. Die transfizierte Plasmid-DNA-Menge wurde durch Verwendung von pcDNA3 konstant gehalten. Sowohl in MiaPaCa2 als auch in

DanG Zellen zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung des SKP2 -243/+244 Reporterengenkonstrukts durch die Kotransfektion (Abbildung 12a). Weiterhin wurde die E2F-abhängige transkriptionelle Aktivität durch Verwendung eines E2F-Reporterengenkonstrukts untersucht. Hierbei zeigte sich eine Herunterregulation der E2F-abhängigen transkriptionellen Aktivität auf 64% in MiaPaCa2 und auf 2% in DanG Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nach einer 24-stündigen Ly294002 Behandlung.

A)



B)



**Abbildung 12: PI3K kontrolliert SKP2 via E2F1.** A) 500ng der pGL3 Promotorkontrolle bzw. des SKP2-273/+244Luc Vektors wurde mit 100ng (+) oder 200ng (++) des pCMV-E2F1 Expressionsvektors in MiaPaCa2 und DanG Zellen kotransfiziert. Die DNA-Menge wurde mittels pcDNA konstant gehalten. Die Luziferaseaktivität wurde 24h nach Transfektion bestimmt. \*) P < 0,001 gegenüber den Kontrollen. \*\*) P = 0,002 gegenüber den Kontrollen. B) 500ng des pE2F-TA-Luc bzw. des SKP2-273/+244Luc Vektors wurden in MiaPaCa2 und DanG Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit 25μM Ly294002 behandelt oder blieben als Kontrollen unbehandelt. Die Luziferaseaktivität wurde 24h nach Ly294002 Behandlung gemessen. \*) P = 0,003 gegenüber den Kontrollen. \*\*) P < 0,001 gegenüber den Kontrollen.

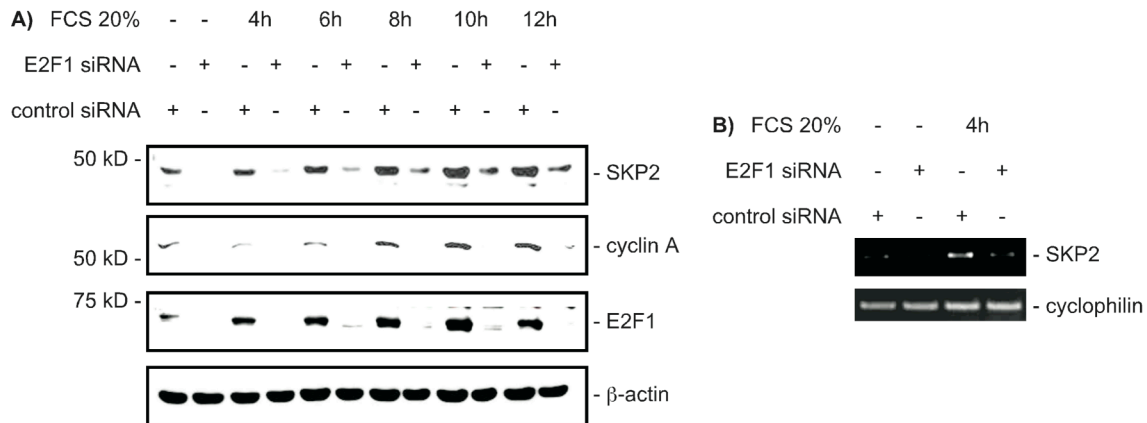
Entsprechend der Herunterregulation der E2F-abhängigen transkriptionellen Aktivität zeigte sich eine verminderte SKP2 Promotoraktivität nach Zugabe von Ly294002. Die SKP2 Promotoraktivität war in Ly294002 behandelten MiaPaCa2 Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle auf 49% reduziert. In DanG Zellen war die SKP2 Promotoraktivität auf 3% vermindert (Abbildung 12b).

### **3.6 E2F1 steuert die G1-S-Phasenprogression**

Um die Rolle von E2F1 als Aktivator von SKP2 zu validieren, wurden MiaPaCa2 Zellen mittels Serumentzug in der G0/1-Phase arretiert. Anschließend wurde die FCS-induzierte G0-S-Phasen-Progression im Westernblot detektiert.

Der Westernblot zeigte bei den unbehandelten Zellen eine Zunahme der SKP2 Proteinmenge im fortschreitenden Zellzyklus. Eine ähnliche Akkumulation von SKP2 Protein blieb in den mit E2F1 siRNA transfizierten Zellen aus. Daneben unterbleibt, gemessen an der Cyclin A Expression, der S-Phaseneintritt (Abbildung 13a).

Um die Rolle der Transkription gegenüber posttranslationaler Phänomene zu untersuchen, wurde das Serumentzugsexperiment auf mRNA-Ebene mit Hilfe einer semiquantitativen PCR-Analyse wiederholt. Im unstimulierten Zustand konnte sowohl in unbehandelten als auch in den transfizierten Zellen keine Skp2-mRNA nachgewiesen werden. Vier Stunden nach Stimulation konnte in den unbehandelten Zellen eine deutliche Anhäufung von Skp2 mRNA nachgewiesen werden. Diese Anhäufung der Skp2-mRNA blieb nach Knockdown von E2F1 aus (Abbildung 13b).



**Abbildung 13: E2F1 steuert die G1-S-Phasenprogression.** A) Western-Blot Analyse im Stimulationsversuch von MiaPaCa2 Zellen 48h nach Transfektion einer E2F1-spezifischen siRNA oder einer Kontroll-siRNA. MiaPaCa2 Zellen wurden 4h, 6h, 8h, 10h bzw. 12h mit FCS 20% stimuliert oder blieben unstimuliert (-). Die Beladung gleicher Proteinmengen wurde mit β-Aktin überprüft. B) Semiquantitative PCR-Analyse der isolierten RNA von MiaPaCa2 Zellen nach Behandlung mit E2F1-spezifischer siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA. Es wurde das PCR-Produkt un behandelter Zellen (Spur 1 und 2) und das PCR-Produkt der Zellen vier Stunden nach Stimulation (Spur 3 und 4) nebeneinander aufgetragen.

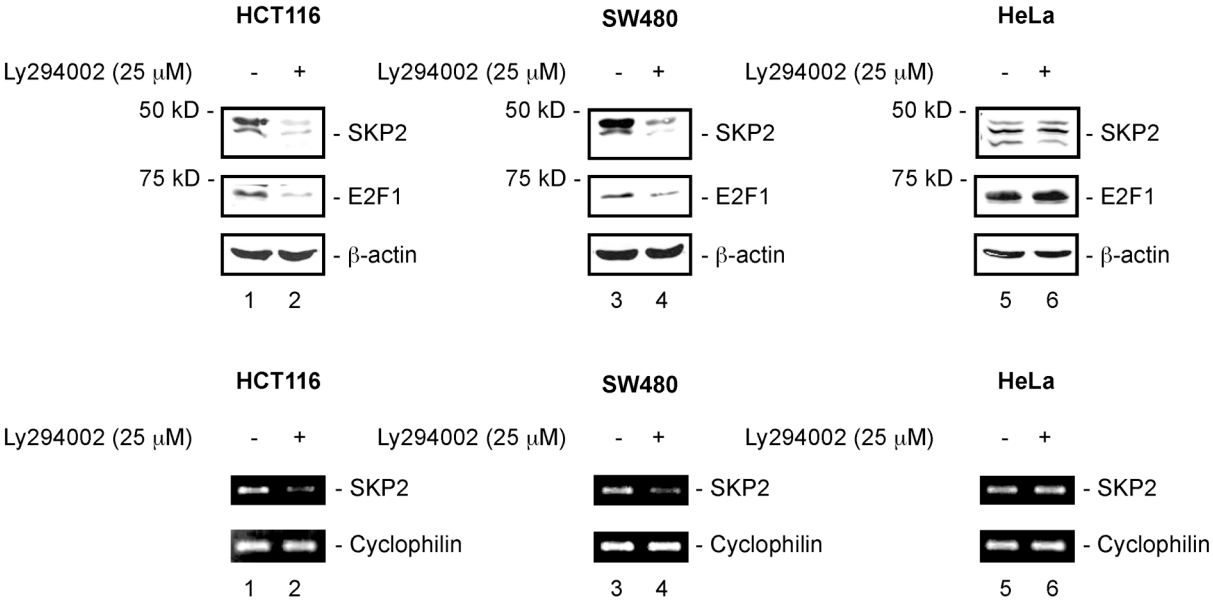
### 3.7 Der PI3K/E2F1 Signalweg in verschiedenen Tumorentitäten

Um eine Allgemeingültigkeit der erbrachten Ergebnisse für die Tumorbologie aufzuzeigen, wurden die Schlüsselexperimente in drei weiteren humanen Zelllinien anderer Tumorentitäten durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480 sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa verwendet.

Zunächst analysierte man die Proteinexpression von Skp2 und E2F1 nach PI3K Inhibition. Analog zu den Experimenten mit den Pankreaskarzinomzelllinien behandelte man hierfür die Zellen für 24 Stunden mit Ly294002. Der Western-Blot zeigte eine deutlich verminderte Proteinmenge von Skp2 und E2F1 nach PI3K Hemmung in beiden Kolonkarzinomzelllinien. In HeLa Zellen blieb die Expression der untersuchten Proteine vor und nach PI3K Inhibition unverändert.

Daraufhin wurde die Skp2 mRNA Expression nach PI3K Inhibition mittels semiquantitativer PCR untersucht. Auch auf mRNA Ebene konnte vermindertes Skp2 Expression in HCT116 und SW480 Zellen nachgewiesen werden. Keine Änderung der Skp2 mRNA Expression nach Ly294002 Behandlung zeigte sich hingegen in

HeLa Zellen. Als Kontrolle diente hierbei die mRNA Expression von Cyclophilin (Abbildung 14).



**Abbildung 14: PI3K/Akt Signalweg kontrolliert SKP2 in Kolonkarzinomzellen.** Western-Blot der SKP2- und E2F1-Expression in HCT116 (Spur 1 und 2), SW480 (Spur 3 und 4) und HeLa (Spur 5 und 6) Zellen 24h nach Behandlung mit 25μM Ly294002. Die Beladung gleicher Proteinmengen wurde mit β-Aktin überprüft. B) Semiquantitative SKP2 mRNA Expressionsanalyse. 24h nach Behandlung der HCT116 (Spur 1 und 2), SW480 (Spur 3 und 4) und HeLa (Spur 5 und 6) Zellen mit 25μM Ly294002 wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels semiquantitativer PCR analysiert. Die Cyclophilin mRNA diente dabei als Kontrolle.

## 4 Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas zeichnet sich durch eine infauste Prognose aus. Mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von unter 5% zählt das Pankreaskarzinom zu einem der aggressivsten Tumore (Jemal et al., 2007). Ursächlich hierfür ist vor allem die frühe systemische Dissemination und eine weitgehende Therapieresistenz des Tumors.

### **4.1 Der PI3K/AKT Signalweg kontrolliert Proliferation und G1-Phasenprogression**

Die PI3K wird schon seit längerem mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Die Lipidkinase PI3K generiert Second messengers, die ihrerseits wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Motilität und Morphologie steuern (Bader et al., 2005). Der wohl am besten untersuchte Effektor der PI3K ist die Serin-Threonin Kinase AKT. Der PI3K/AKT Signalweg ist in PDAC konstitutiv aktiv und steuert auch hier die Proliferation (Schlieman et al., 2003). Der Einfluss des PI3K/AKT Signalwegs auf die Proliferation konnte auch in dieser Arbeit reproduziert werden. Weiterhin zeigte sich, dass die verminderte Proliferation auf einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus beruht. Die Rolle des PI3K/AKT Signalwegs bei der G1-Phasenprogression in Pankreaskarzinomzellen wurde jedoch bisher nicht im Detail untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass der PI3K/AKT Signalweg die G1-Phasenprogression kontrolliert, indem er ein komplexes genetisches Programm reguliert, das zahlreiche Schlüsselgene des G1-S-Phasenübergangs beinhaltet. Bei diesen Schlüsselgenen handelt es sich um  $p21^{Cip1}$ , SKP2, CDC25a, CyclinA, Cdk2 und CyclinE. In Genexpressionsanalysen konnte die deutlichste Herunterregulation nach PI3K Hemmung bei SKP2 beobachtet werden.

Das einzige Gen, das nach PI3K Inhibition hochreguliert war, ist der Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor  $p21^{Cip1}$ . Eine Verbindung des PI3K/AKT Signalwegs mit  $p21^{Cip1}$  über den Transkriptionsfaktor Foxo ist beschrieben worden (Seoane 2004). Monomere Foxo Transkriptionsfaktoren binden über stark konservierte Domänen an DNA. Die Aktivität der Foxo Proteine wird über posttranslationelle Modifikationen, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinierung, gesteuert. Diese

Modifikationen kontrollieren die zelluläre Lokalisation des Transkriptionsfaktors. So ist zytoplasmatisches Foxo Protein transkriptionell inaktiv, wohingegen nukleäres Foxo Protein über eine gesteigerte Expression von p21<sup>Cip1</sup> zu einem G1-Phasenarrest führt. Die Phosphorylierung Foxos durch AKT initiiert den nukleären Export und beendet so die transkriptionelle Aktivität (Bader et al., 2005).

Auffallend war bei der Untersuchung von Zellzyklusgenen, die über den PI3K-Signalweg auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, dass nach Hemmung der PI3K zwar die CyclinD1 Proteinmenge vermindert war, jedoch keine Regulation von CyclinD1 auf mRNA-Ebene stattfand. Eine Erklärung hierfür ist, dass die CyclinD1 Proteinexpression über proteasomale Degradation von einem PI3K/AKT/Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3beta)-abhängigen Signalweg reguliert werden können (Cohen & Frame, 2001). Weiterhin kontrolliert ein PI3K/AKT/mTOR Signalweg die CyclinD1 Translation (Bader et al., 2005; Muise-Helmericks et al., 1998). Ob nun die CyclinD1 Proteinmenge nach Inhibition der PI3K in PDAC Zellen über den GSK3beta- oder mTOR-Signalweg gesteuert wird, bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch wurde kürzlich die translationelle Kontrolle von CyclinD1 in Pankreaskarzinomzellen gezeigt. Die deutlichere Herunterregulation von CyclinD1 nach PI3K-Hemmung in MiaPaCa2-Zellen könnte die größeren Effekte auf den Zellzyklus in dieser Zelllinie erklären.

#### ***4.2 Der PI3K/AKT Signalweg ist über E2F1 mit dem SKP2 Genpromotor verknüpft***

Das SKP2 Gen wird innerhalb des Zellzyklus periodisch exprimiert. In der G0- und bis zur Mitte der G1-Phase ist die Proteinmenge vermindert, steigt daraufhin am Ende der G1-Phase an und bleibt die S-Phase über auf diesem Niveau (Wirbelauer et al., 2000; Zhang et al., 1995). SKP2 wird sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene reguliert, bevor es dann in der frühen G1-Phase von dem Anaphase-promoting complex/Cyclosome containing cdh1 (APC/CcDh<sup>1</sup>) degradiert wird (Bashir et al., 2004; Wei et al., 2004). Neben der SKP2 Proteindegradation wird SKP2 transkriptionell reguliert. Weiterhin stellt der SKP2 Genpromotor ein Bindeglied zahlreicher wichtiger Signalwege und Transkriptionsfaktoren, wie dem Notch-Signalweg, dem CD28-Signalweg, dem NFkappaB-Signalweg, dem Forkhead box

M1 (Foxm1)–Transkriptionsfaktor und dem SP1-Transkriptionsfaktor, mit der Zellzyklusmaschinerie dar (Appleman et al., 2006; Huang & Hung, 2006; Sarmiento et al., 2005; Schneider et al., 2006; Wang et al., 2005). Der PI3K/AKT Signalweg reguliert die SKP2 Transkription in verschiedensten Zellsystemen (Andreu et al., 2005; Mamillapalli et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in PDAC Zellen der PI3K/AKT Signalweg über die Kontrolle eines cis-agierenden Elements am proximalen humanen SKP2 Genpromotor mit der SKP2 Transkription verkettet ist. Der proximale SKP2 Promotor wird über E2F1 aktiviert und die E2F1-Bindung wird durch PI3K-Hemmung vermindert. Diese Ergebnisse konnten kürzlich auch andere Autoren beobachten. So zeigen zum Beispiel Zhang und Wang, dass der proximale SKP2 Promotor zwischen +65 und +149 im ersten Exon des SKP2 Gens für die Transaktivierung durch E2F1 notwendig ist (Zhang & Wang, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PI3K/AKT Signalkaskade für die hormonelle Induktion der SKP2 mRNA in 3T3-L1 Präadipozyten nötig ist. Hierbei setzt das PI3K Signal am proximalen murinen SKP2 Promotor an, der eine E2F-Bindungsstelle enthält (Auld et al., 2006). Die stärkere Reduktion von E2F1 Proteinexpression nach PI3K-Hemmung in DanG Zellen könnte einen größeren Einfluss auf die SKP2 Transkription in dieser Zelllinie erklären.

#### ***4.3 E2F1 verbindet den PI3K/AKT Signalweg mit dem Zellzyklus***

Der PI3K Signalweg induziert Proliferation, indem er zahlreiche Transkriptionsfaktoren reguliert. Obwohl die Aktivität von FOXO, NFkappaB, MIZ1, p53, AP1, c-Myc,  $\beta$ -catenin und HIF1 $\alpha$  vom PI3K Signalweg beeinflusst wird, ist über die genaue Funktion dieser Proteine in der PI3K-abhängigen Onkogenese wenig bekannt (Bader et al., 2005). Auch der IL2 Signalweg ist in T-Lymphozyten über eine PI3K regulierte transkriptionelle Aktivität von E2F mit der Zellzyklusmaschinerie verknüpft. Zudem führt eine aktive PI3-Kinase zu einer Aktivierung von E2F in lymphoblastischen Zelllinien (Brennan et al., 1997; Brennan et al., 2002). Dementsprechend konnte man eine verminderte E2F1 Proteinexpression nach PI3K-Hemmung in PDAC Zellen beobachten, was die verminderte transkriptionelle Aktivität von E2F erklärt. Da E2F1 durch einen SKP2-abhängigen Signalweg degradiert werden kann, erscheint die Herunterregulation beider Moleküle



überraschend und weist auf eine Unterbrechung des regulatorischen Feedback-Loop zwischen E2F1 und SKP2 in PDAC Zellen hin (Marti et al., 1999).

Der Transkriptionsfaktor E2F1 trägt zur Regulation von verschiedenen Genen, die am G1-S-Phasenübergang beteiligt sind, entscheidend bei. Durch die Überexpression von E2F1 kann in ruhenden Zellen der S-Phasen Eintritt induziert werden (Johnson et al., 1993). Darüber hinaus ist auch der Einfluss von E2F1 auf die Karzinogenese in der Literatur etabliert (Tsantoulis & Gorgoulis, 2005). Yamazaki et al. zeigen, dass die E2F1 Expression positiv mit dem Differenzierungsgrad pankreatischer duktaler Adenokarzinome korreliert und Patienten mit hoch exprimierten E2F1 ein verkürztes Überleben aufweisen (Yamazaki et al., 2003).

Alle Zellzyklusgene, die nach PI3K-Inhibition reguliert waren, sind interessanterweise bereits etablierte Zielgene von E2F1 oder weisen E2F-Bindungsstellen in der 5' regulatorischen Region auf (Brooks et al., 1996; Iavarone & Massagué, 1999; Ohtani et al., 1995; Schulze et al., 1995; Shiffman et al., 1996; Zhang & Wang, 2006). So zeigen Iavarone und Massagué, dass Cdc25A, eine Tyrosin Phosphatase, die G1-Phasen Cyclin-abhängige Kinasen aktiviert und neben SKP2 die stärkste Abhängigkeit nach PI3K Inhibition zeigte, nach Behandlung mit dem Antimitogen TGF-beta über E2F reprimiert wird (Iavarone & Massagué, 1999). Auch die CyclinA Expression wird nach LY294002 Behandlung deutlich vermindert. CyclinA, dessen Induktion am G1/S-Phasen Übergang stattfindet, weist ebenfalls eine E2F1-Bindungsstelle auf. Eine Bindung von E2F1 am CyclinA Promotor aktiviert die Transkription von CyclinA, wohingegen eine solche Induktion durch eine mutierte E2F-Bindungsstelle verhindert werden kann (Schulze et al., 1995). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch für CyclinE und E2F1 gezeigt werden (Ohtani et al., 1995). Funktionelle Analysen humaner CyclinD2 und Cdk2 Promotoren zeigen ebenfalls E2F-Bindestellen (Brooks et al., 1996; Shiffman et al., 1996). Passend hierzu konnte in dem Serumentzug-Experiment die zentrale Funktion von E2F1 am G1/S-Phasenübergang herausgestellt werden.

Aus diesem Grund kann man durch die Identifikation des PI3K/E2F1 Signalweges nicht nur die Regulation von SKP2 erklären, sondern sicherlich auch das komplexe genetische Programm, das die PI3K mit dem Zellzyklus in PDAC Zellen verbindet.

#### **4.4 Der PI3K/E2F1 Signalweg in verschiedenen Tumorentitäten**

Wie bereits für das PDAC ausgeführt wurde, ist die E2F Transkriptionsfaktorfamilie auch an der Pathogenese anderer Tumoren beteiligt. Am besten ist dabei die Rolle des zuerst entdeckten Familienmitglieds, E2F1, untersucht. So wurden für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome erhöhte E2F1-Proteinmengen im Vergleich zu normalen Geweben beschrieben. Zudem korreliert das erhöhte E2F1 Niveau positiv mit dem Tumorwachstumsindex (Gorgoulis et al., 2002). Ähnliches konnte kürzlich auch für Mammakarzinome und Malignome der Schilddrüse (Onda et al., 2004) gezeigt werden.

Inwiefern allerdings E2F1 über den PI3K/AKT Signalweg reguliert wird, ist nur unzureichend untersucht. In dieser Arbeit konnte nun der Hinweis erbracht werden, dass der PI3K/E2F1 Signalweg ein in mehreren Tumorentitäten verbreiteter Signaltransduktionsmechanismus ist. Denn obwohl sich in HeLa Zellen nach PI3K-Hemmung keine Herunterregulation der SKP2 und E2F1 Proteinmenge und der SKP2 mRNA Expression zeigte, ist der Signalweg in den beiden Kolonkarzinomzelllinien HCT116 und SW480, ähnlich wie in PDAC Zelllinien, aktiviert.

#### **4.5 Ausblicke**

Die infauste Prognose des PDAC wird unter anderem von der weitgehenden Resistenz gegenüber etablierten Therapien bestimmt. Trotz enormer wissenschaftlicher Fortschritte in der Aufklärung der Pathogenese der PDAC konnte die Prognose der Erkrankung kaum verbessert werden (Schneider et al., 2005).

Der PI3K/AKT Signalweg stellt nun aus mehreren Gründen ein attraktives Ziel für zukünftige Tumorintervention dar. Zum einen werden durch diesen Signalweg potentiell tumorsuppressive Proteine, wie Foxo, Bad und GSK3, negativ reguliert. Andererseits wird, wie in dieser Arbeit für SKP2 gezeigt werden konnte, die Transkription von Onkogenen gesteigert. Darüberhinaus stellen Kinasen, wie die PI3K, die mit am besten zugänglichen intrazellulären Zielstrukturen für die pharmakotherapeutische Intervention dar. Weiterhin ist eine überschießende Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs für eine Vielzahl von Tumoren beschrieben. Eine mögliche therapeutische Intervention kann somit breite Anwendung finden.

## 5 Zusammenfassung

Der PI3K/AKT Signalweg kontrolliert fundamentale Prozesse der Tumorzellbiologie, wie Proliferation, Zellüberleben und trägt entscheidend zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei. Der PI3K/AKT Weg ist in PDAC Zellen konstitutiv aktiviert. Die molekularen Mechanismen, die diesen Signalweg mit der Zellzyklusmaschinerie verknüpfen, wurden bisher noch nicht eingehend untersucht. Durch Verwendung des PI3K-Inhibitors Ly294002 und AKT1-spezifischer siRNA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PI3-Kinase Proliferation und G1-S-Phasenübergang von PDAC Zellen reguliert. Mittels Genexpressionsanalysen wurden zahlreiche wichtige Regulatoren der G1-S-Phasenprogression, darunter p21<sup>CIP1</sup>, SKP2, CDC25a, CyclinA, CyclinD2, Cdk2 und CyclinE, die von der PI3K kontrolliert werden, identifiziert. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass das F-box protein S-phase kinase associated protein 2 (SKP2), ein Onkogen, das in PDAC hochreguliert ist, über den PI3K/AKT Signalweg transkriptionell reguliert wird. Auf molekularer Ebene wird SKP2 von der PI3K, durch Regulation der E2F1 Bindung am proximalen SKP2 Genpromotor, kontrolliert.

Diese komplexe und starke Verknüpfung des PI3K/Akt Signalwegs mit dem Zellzyklus identifiziert diesen Signalweg als mögliches Ziel therapeutischer Intervention in PDAC.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs (Osaki et al., 2004) .....	9
Abbildung 2: PI3K-Hemmung vermindert Proliferation in PDAC Zellen .....	31
Abbildung 3: PI3K-Hemmung vermindert G1-Phasen Progression in PDAC Zellen .	32
Abbildung 4: PI3K kontrolliert die Proteinexpression wichtiger G1-S-Phase-Regulatoren .....	34
Abbildung 5: PI3K kontrolliert die SKP2 mRNA Expression.....	35
Abbildung 6: PI3K kontrolliert die SKP2 Transkription .....	36
Abbildung 7: AKT1 Knockdown inhibiert die G1-Phasenprogression von PDAC Zellen .....	37
Abbildung 8: AKT1 Knockdown inhibiert SKP2 Expression in PDAC Zellen.....	38
Abbildung 9: Humaner SKP2 Genpromotor .....	39
Abbildung 10: PI3K kontrolliert SKP2 via E2F1 .....	40
Abbildung 11: AKT1 kontrolliert SKP2 via E2F1 .....	41
Abbildung 12: PI3K kontrolliert SKP2 via E2F1 .....	42
Abbildung 13: E2F1 steuert die G1-S-Phasenprogression .....	44
Abbildung 14: PI3K/Akt Signalweg kontrolliert SKP2 in Kolonkarzinomzellen .....	45

### 6.2 *Tabellenverzeichnis*

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis .....	7
Tabelle 2: Chemikalien .....	14
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 4: Kommerziell erhältliche Kits .....	15
Tabelle 5: Geräte .....	16
Tabelle 6: Puffer für Westernblot .....	16

Tabelle 7: Puffer für FACS-Analyse .....	16
Tabelle 8: Puffer für CHIP .....	17
Tabelle 9: Antikörper für CHIP .....	17
Tabelle 10: Antikörper für Western-Blot .....	18
Tabelle 11: siRNA-Sequenzen .....	18
Tabelle 12: Primersequenzen für Echt-Zeit PCR .....	19
Tabelle 13: Oligonukleotidsequenzen für CHIP-PCR .....	19
Tabelle 14: Primer zur Klonierung von Skp2 .....	19
Tabelle 15: Polyacrylamid Trenngele und Sammelgel .....	22
Tabelle 16: RT-PCR Pipettieransatz .....	29
Tabelle 17: Genexpressionsprofil nach PI3K Inhibition .....	33

## 7 Literaturverzeichnis

- Andreu, E.J., Lledo, E., Poch, E., Ivorra, C., Albero, M.P., Martinez-Climent, J.A., Montiel-Duarte, C., Rifon, J., Perez-Calvo, J., Arbona, C., Prosper, F. & Perez-Roger, I. (2005). BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res*, **65**, 3264-72.
- Appleman, L.J., Chernova, I., Li, L. & Boussiotis, V.A. (2006). CD28 Costimulation Mediates Transcription of SKP2 and CKS1, the Substrate Recognition Components of SCFSkp2 Ubiquitin Ligase that Leads p27kip1 to Degradation. *Cell Cycle*, **5**.
- Arlt, A., Gehrz, A., Muerkoster, S., Vorndamm, J., Kruse, M.L., Folsch, U.R. & Schafer, H. (2003). Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene*, **22**, 3243-51.
- Asano, T., Yao, Y., Shin, S., McCubrey, J., Abbruzzese, J.L. & Reddy, S.A. (2005). Insulin receptor substrate is a mediator of phosphoinositide 3-kinase activation in quiescent pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 9164-8.
- Asano, T., Yao, Y., Zhu, J., Li, D., Abbruzzese, J.L. & Reddy, S.A. (2004). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, **23**, 8571-80.
- Auld, C.A., Caccia, C.D. & Morrison, R.F. (2006). Hormonal induction of adipogenesis induces Skp2 expression through PI3K and MAPK pathways. *J Cell Biochem*.
- Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. & Vogt, P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*, **5**, 921-9.
- Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D. & Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature*, **428**, 190-3.
- Bondar, V.M., Sweeney-Gotsch, B., Andreeff, M., Mills, G.B. & McConkey, D.J. (2002). Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, **1**, 989-97.
- Brennan, P., Babbage, J.W., Burgering, B.M., Groner, B., Reif, K. & Cantrell, D.A. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity*, **7**, 679-89.
- Brennan, P., Mehl, A.M., Jones, M. & Rowe, M. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene*, **21**, 1263-71.
- Brooks, A.R., Shiffman, D., Chan, C.S., Brooks, E.E. & Milner, P.G. (1996). Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J Biol Chem*, **271**, 9090-9.

- Carpelan-Holmstrom, M., Nordling, S., Pukkala, E., Sankila, R., Luttges, J., Kloppel, G. & Haglund, C. (2005). Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut*, **54**, 385-7.
- Cohen, P. & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 769-76.
- Du, W. & Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, **25**, 5190-200.
- Einama, T., Kagata, Y., Tsuda, H., Morita, D., Ogata, S., Ueda, S., Takigawa, T., Kawarabayashi, N., Fukatsu, K., Sugiura, Y., Matsubara, O. & Hatsuse, K. (2006). 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**, 376-81.
- Fahy, B.N., Schlieman, M., Virudachalam, S. & Bold, R.J. (2003). AKT inhibition is associated with chemosensitisation in the pancreatic cancer cell line MIA-PaCa-2. *Br J Cancer*, **89**, 391-7.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletas, D., Asimacopoulos, P.J., Agnatis, N., Kittas, C., Papavassiliou, A.G. (2002). Transcription factor E2F1 acts as growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*, **198**, 142-56.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J. & Kern, S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, **6**, 2969-72.
- Huang, Y.C. & Hung, W.C. (2006). 1,25-dihydroxyvitamin D(3) transcriptionally represses p45(Skp2) expression via the Sp1 sites in human prostate cancer cells. *J Cell Physiol*, **209**, 363-9.
- Iavarone, A. & Massague, J. (1999). E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*, **19**, 916-22.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. & Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, **57**, 43-66.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. & Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, **365**, 349-52.
- Liptay, S., Weber, C.K., Ludwig, L., Wagner, M., Adler, G. & Schmid, R.M. (2003). Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, **105**, 735-46.
- Mamillapalli, R., Gavrilo, N., Mihaylova, V.T., Tsvetkov, L.M., Wu, H., Zhang, H. & Sun, H. (2001). PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKP2). *Curr Biol*, **11**, 263-7.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M. & Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol*, **1**, 14-9.

- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsichlis, P.N. & Rosen, N. (1998). Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 29864-72.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y.A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M., Nakayama, K. & Hatakeyama, S. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J*, **19**, 2069-81.
- Nakayama, K.I., Hatakeyama, S. & Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 853-60.
- Nakayama, K.I. & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 369-81.
- Ng, S.S.W., Tsao, M.S., Chow, S. & Hedley, D.W. (2000). Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, **60**, 5451-5.
- Ohtani, K., DeGregori, J. & Nevins, J.R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12146-50.
- Onda, M., Nagai, H., Yoshida, A., Miyamoto, S., Asaka, S., Akaishi, J., Takatsu, K., Nagahama, M., Ito, K., Shimizu, K., Emi, M. (2004). Up-regulation of transcriptional factor E2F1 in papillary and anaplastic thyroid cancers. *J Hum Genet*, **49**, 312-8
- Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-76.
- Paro, R. (2000). Chromatin regulation. Formatting genetic text. *Nature*, **406**, 579-80.
- Perugini, R.A., McDade, T.P., Vittimberga, F.J., Jr. & Callery, M.P. (2000). Pancreatic cancer cell proliferation is phosphatidylinositol 3-kinase dependent. *J Surg Res*, **90**, 39-44.
- Rowland, B.D. & Bernards, R. (2006). Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*, **127**, 871-4.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J. & Kern, S.E. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, **57**, 1731-4.
- Sarmiento, L.M., Huang, H., Limon, A., Gordon, W., Fernandes, J., Tavares, M.J., Miele, L., Cardoso, A.A., Classon, M. & Carlesso, N. (2005). Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation. *J Exp Med*, **202**, 157-68.
- Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamoj, R., Beckett, L. & Bold, R.J. (2003). Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer*, **89**, 2110-5.
- Schneider, G., Saur, D. & Schmid, R. (2007). Pancreatic cancer — Molecular alterations. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, **Volume 6**, **Number 2**, pp. 102-106(5).



- Schneider, G., Saur, D., Siveke, J.T., Fritsch, R., Greten, F.R. & Schmid, R.M. (2006). IKK $\alpha$  controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1-to S-phase progression. *Embo J*, **25**, 3801-12.
- Schneider, G. & Schmid, R.M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer*, **2**, 15.
- Schneider, G., Siveke, J.T., Eckel, F. & Schmid, R.M. (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, **128**, 1606-25.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P. & Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11264-8.
- Shah, S.A., Potter, M.W., Hedeshian, M.H., Kim, R.D., Chari, R.S. & Callery, M.P. (2001). PI-3' kinase and NF- $\kappa$ B cross-signaling in human pancreatic cancer cells. *J Gastrointest Surg*, **5**, 603-12; discussion 612-3.
- Shiffman, D., Brooks, E.E., Brooks, A.R., Chan, C.S. & Milner, P.G. (1996). Characterization of the human cyclin-dependent kinase 2 gene. Promoter analysis and gene structure. *J Biol Chem*, **271**, 12199-204.
- Takeda, A., Osaki, M., Adachi, K., Honjo, S. & Ito, H. (2004). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas*, **28**, 353-8.
- Tsantoulis, P.K. & Gorgoulis, V.G. (2005). Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 2403-14.
- Wang, I.C., Chen, Y.J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M.L., Park, H.J., Tan, Y., Ackerson, T. & Costa, R.H. (2005). Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol*, **25**, 10875-94.
- Wei, W., Ayad, N.G., Wan, Y., Zhang, G.J., Kirschner, M.W. & Kaelin, W.G., Jr. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*, **428**, 194-8.
- Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F. & Krek, W. (2000). The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *Embo J*, **19**, 5362-75.
- Yamazaki, K., Yajima, T., Nagao, T., Shinkawa, H., Kondo, F., Hanami, K., Asoh, A., Sugano, I. & Ishida, Y. (2003). Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract*, **199**, 23-8.
- Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K. & Beach, D. (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*, **82**, 915-25.
- Zhang, L. & Wang, C. (2006). F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene*, **25**, 2615-27.

# Curriculum vitae

## Persönliche Angaben

**Maximilian Reichert**, geb. 07.07.1980 in Altötting

**Anschrift:** Heßstraße 96 in 80797 München

**Eltern:** Herr Maximilian Reichert, Steuerberater und Rechtsbeistand;  
Frau Helga Reichert, geborene Kaltenmarkt, IT- und Organisationsberatung;

### **Geschwister:**

Miriam Halbritter, 35 Jahre, Qualitätskontrolle in der Textilbranche;  
Stefanie Reichert, 29 Jahre, Assistenzärztin der Pädiatrie im Kreiskrankenhaus Traunstein;  
Johanna Reichert, 21 Jahre, Studentin im Fach Veterinärmedizin;

## Schulbildung

1986-1987	Grundschule Mühldorf
1987-1989	Grundschule Laufen
1989-1990	Grundschule Mühldorf
1990-1991	Hauptschule Mühldorf
1991-2000	Ruperti-Gymnasium Mühldorf
Juni 2000	Abitur

## Studium

April 2001	Immatrikulation an der Universität Heidelberg im Fach Humanmedizin
August / September 2003	Physikum
Oktober 2003	Immatrikulation an der TU München im Fach Humanmedizin
Mai 2008	Voraussichtlicher Zeitpunkt der Approbation

**Tätigkeiten während des Studiums:**

**Zusätzliche Scheine:** Rehabilitationsmedizin

Grundlagen der Humangenetik (inklusive Praktikum)

Zweiwöchiger **Anatomie-Vorpräparanten-Kurs** (den besten Anatomieabsolventen vorbehalten) mit Erfolg abgeschlossen

WS 2002/2003

**Anstellung am anatomischen Institut Heidelberg**

SS 2003

und Ausübung der Tätigkeit als Vorpräparant für ein Jahr

**Famulaturen:**

**März 2004:** 4 Wochen Chirurgie im Klinikum Innenstadt in München

**Oktober 2004:** 4 Wochen Kardiologie im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in München

**März 2005:** 4 Wochen Gastroenterologie im Klinikum Rechts der Isar in München

**Oktober 2005:** 4 Wochen Allgemeinmedizin in einer Allgemeinarztpraxis in Mühldorf

**Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Klinikum Rechts der Isar**

**Posterpräsentation auf dem 61. Jahrestag der DGVS in Hannover**

**Praktisches Jahr:**

**1. Tertial:** Neurologie, Klinikum rechts der Isar

**2. Tertial:** Gastroenterologie, II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar

**3. Tertial:** voraussichtlich Viszeralchirurgie, Klinikum rechts der Isar

**Doktorarbeit:**

**Thema:** Der PI3K Signalweg kontrolliert das S-Phase Kinase assoziierte Protein 2-Gen via E2F1 in Pankreastumorzellen

II. Medizinische Klinik

Klinikum Rechts der Isar

TU München

AG PD Dr. Günter Schneider

**Publikationen:**

Reichert, M., D. Saur, et al. (2007). "Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells." *Cancer Res* 67(9): 4149-56.

Schneider, G., M. Reichert, et al. (2007). "HDAC3 is linked to cell cycle machinery in MiaPaCa2 cells by regulating transcription of *skp2*." *Cell Prolif* 40(4): 522-31.

Kolb, S., R. Fritsch, et al. (2007). "HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells." *Cancer Res* 67(10): 4679-86.

Hamacher, R., D. Saur, et al. (2007). "Casein kinase II inhibition induces apoptosis in pancreatic cancer cells." *Oncol Rep* 18(3): 695-701.

Reichert et al., *Z Gastroenterol* 2006; 44: 806-807 Georg Thieme Verlag

## Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während meiner Arbeit im Labor und beim Verfassen meiner Dissertation unterstützt haben.

Herzlich gedankt sei Herrn Prof. Dr. med. Roland M. Schmid für die Möglichkeit in seiner Klinik wissenschaftlich arbeiten zu können. Auch möchte ich mich für seine stete Unterstützung und für die Möglichkeit der Kongressteilnahme bedanken.

Besonders bedanken möchte mich bei Herrn PD Dr. med. Günter Schneider für die Überlassung dieser Promotionsarbeit und Betreuung meiner thematischen Fragestellung. Darüber hinaus vermittelte er mir mit außergewöhnlichen Engagement die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und stand mir jederzeit mit seinem enormen Wissensschatz zur Seite.

Frau Konstanze Geiger gilt besonders großer Dank, da ohne ihre Hilfe bei den notwendigen Arbeitstechniken sowie bei der Versuchsplanung diese Arbeit schlicht nicht möglich gewesen wäre. Besonders bedanken möchte ich mich für ihre Geduld bei der Vermittlung strukturierten Arbeitens im Labor, wovon ich noch immer profitiere.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Birgit Kohnke-Ertel, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bei den übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Labor möchte ich mich für ihre freundschaftliche Unterstützung bedanken.

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