Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Prof. Dr. G. Adler

Induktion von Hitzeschockproteinen beim Pankreaskarzinom

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

Theresa Schuster
Heidenheim

2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. C. Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Griesshammer
Tag der Promotion:	Donnerstag, 19. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1 HITZESCHOCKPROTEINE 1
1.2 NUCLEAR FACTOR KAPPA B 1
1.3 RAS 3
1.4 DAS PANKREASKARZINOM 3
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 4

2. MATERIAL UND METHODEN 5

2.1 MATERIAL 5
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 5
2.1.2 Eukaryontische Zelllinien 7
2.1.3 Gewebeschnitte 7
2.1.4 Antikörper 8
2.1.5 Plasmide, Tracer 9
2.1.6 Apparaturen 10
2.2 METHODEN 11
2.2.1 Kultivierung der Zelllinien 11
2.2.2 Kryokonservierung der Zellen 12
2.2.3 Auftauen der Zellen 12
2.2.4 Inkubation der Zellen mit NF-κB Inhibitoren 12
2.2.5 Stimulation der Zellen mit TPA und Induktion mit Doxycyclin 12
2.2.6 Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot Analysen 13
2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 13
2.2.8 Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren 15
2.2.9 Immundetektion von Proteinen durch spezifische Antikörper 15
2.2.10 Transfektion der Zellen 16
2.2.11 Luciferase Assay, Dual-Luciferase Assay 16
2.2.12 Isolierung von mRNA 17
2.2.13 Northern Blotting 18

2.2.14 Hybridisierung von Northern-Blots 19
2.2.15 Doppel – Immunfluoreszenz 19
2.2.16 verwendete Statistik 20

3. ERGEBNISSE 21

3.1 HSP 70 EXPRESSION UNTER HITZEEXPOSITION 21
3.2 HITZESCHOCKPROTEINE UNTER NF-KB INHIBITOREN 22
3.3 EXPRESSION VON HSP 70 UNTER NF-KB INHIBITION UND HITZESTIMULATION 30
3.4 EINFLUSS VON DOMINANT NEGATIVEN IκB- KINASEN (IKKS) AUF DIE HSP 70 EXPRESSION 32
3.5 HSP 70 EXPRESSION UNTER RAS 39
3.6 EINFLUSS VON RAS IN KOMBINATION MIT INHIBITING KAPPA B KINASEN (IKKS) AUF DIE HSP 70 EXPRESSION 47
3.7 EXPRESSION VON HSP 70 IN MIAPACA RTTA ZELLEN 49
3.8 DETEKTION VON HSP 70 EXPRESSION MITTELS NORTHERN BLOT 51
3.9 HSP 70 UND PIκBα DOPPEL-IMMUNFLUORESZENZ 53

4. DISKUSSION 55

5. ZUSAMMENFASSUNG 62

6. LITERATURVERZEICHNIS 64

7. DANKSAGUNG 73

8. LEBENSLAUF 74

9. ANHANG 75

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American type culture collection
bidest.	bidestilliert
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celcius
cDNA	mRNA complementary DNA, copy-DNA
Ci	Curie
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid
dCTP	desoxyribo-Cytidin-Tri-Phosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
Doxy	Doxycyclin
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK	extracellular-signal regulated kinase, MAPK mitogen activated protein kinase
FCS	fetal calf serum
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour = Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure = Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horse radish peroxidase
HSP	Hitzeschockproteine
Ig	Immunglobulin
Igκ	Immunglobulin κ light chain
IKK	IκB kinase
IKK-KD	kinase dead IKK
IKK-EE	konstitutiv aktives IKK
IKK-Wt	Wildtyp IKK
IκB	Inhibitor of kappa B

IκB A32A36	NF-κB Inhibitor
Il-1β	Interleukin-1β
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	kinase dead
kDa	Kilodalton
luc	firefly luciferase gene
LY-294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-kinase
mA	Milliampere
MAP	mitogen activated protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgCl_2$-$6H_2O$	Magnesiumchlorid-hexahydrat
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
Myc	myelocytomatosis oncogene
n	Anzahl
NAC	N-acetyl-L-cycteine
neg.	negativ
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes
NP 40	ethylphenyl-polyehtyliene glycol
p38	Protein 38
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBI	bidirectional promoter
PBS	phosphat buffered saline
PDTC	Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate
pERK	Phospho-ERK
PI-3 kinase	Phosphatidylinositol-3 kinase
prom.	Promotor
PVDF	Polyvinyldifluorid

Raf	rapidly growing fibrosarcoma
Raf-BxB DD	konstitutiv aktives Raf
Ras	Rat sarcoma
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	(Roswell Park Memorial Institute) Medium mit L-Glutamin
rtTA	reverse Tetracylcline-controlled transactivator
SAPK	= JNK = stress-activated phospho-kinases
SDS	sodium dodecylsulfat
SSC	sodium-sodiumcitrat
TBS	tris buffered saline
TBST	TBS mit Tween
TEMED	N, N, N‘, N‘-Tetramethylethylenediamine
TGF	transforming growth factor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tween	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
U	units = Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	volume per volume
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume

1. Einleitung

1.1 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSPs) sind evolutionsgeschichtlich konservierte Moleküle, die in pro- und eukaryonten Zellen vorkommen. Erstmals entdeckt wurde ihre Expression durch Hitzeexposition in Zellen von Drosophila melanogaster, wodurch sie auch ihren Namen erhielten (Ritossa 1962, Tissières et al. 1974). Neben der klassischen Induktion durch Hitze kommt noch eine Vielzahl von anderen physikalischen und biochemischen Stressoren in Frage, beispielsweise Gammastrahlung, Infektionen, Wachstumsfaktoren, hormonelle Stimuli, verschiedene Chemikalien, Medikamente, Hypoxie und Glukoseentzug (Lindquist und Craig 1988, Santoro 2000). Unter solchem zellulärem Stress können sie als Protektoren fungieren, indem sie zellulläre Proteine binden und sie so vor Denaturierung schützen (Hartl 1996, Smith et al. 1998). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass viele Hitzeschockproteine konstitutiv expremiert werden. Auch unter Ruhebedingungen haben Hitzeschockproteine als sogenannte Chaperone (Gouvernantenproteine) eine Fülle von Funktionen in der Proteinbiosynthese, in Translokation, Transport und Degradation von zellulären Eiweißstoffen (Hightower 1991, Minowada und Welch 1995).

Nach ihrer Molekülgröße sind sechs Hauptfamilien der Hitzeschockproteine klassifiziert: großmolekulare HSPs von 100-110 kDa, die HSP 90 Familie von 83-90 kDa, die HSP 70 Familie von 66-78 kDa, die HSP 60 Familie von 55-64 kDa, die HSP 40 Familie von 35-54 kDa und die kleinen HSPs von 8-34k Da (Leppä und Sistonen, 1997). Die am besten untersuchten Hitzeschockproteine sind die der HSP 70 Familie (Minowada und Welch 1995, Bukau und Horwich 1998, Kiang und Tsokos 1998, Hartl und Hayer-Hartl 2002).

Hitzeschockproteine haben zusätzlich Funktionen in der Karzinogenese von Tumoren der Mamma (Jameel et al. 1992 und Ciocca et al. 1993), bei akuter Leukämie (Yuhu et al. 1992), kolorektalen Tumoren (Morimoto et al. 1991) oder dem Pankreaskarzinom (Gress et al. 1994). Es gibt Hinweise, dass HSPs für das Überleben von Karzinomzellen wichtig sind (Nylandsted et al. 2000). Ihre mögliche Funktion ist die Modulation des apoptotischen Zelltodes (Garrido et al. 2001).

1.2 Nuclear Factor kappa B

Nuclear Factor-κB (NF-κB) gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, welche bei Zellproliferation, Immun- und Stressantwort und inflammatorischen Reaktionen eine

wichtige Funktion haben (Baldwin 1996, Ghosh und Karin 2002, Li und Verma 2002, Silverman und Maniatis 2001).

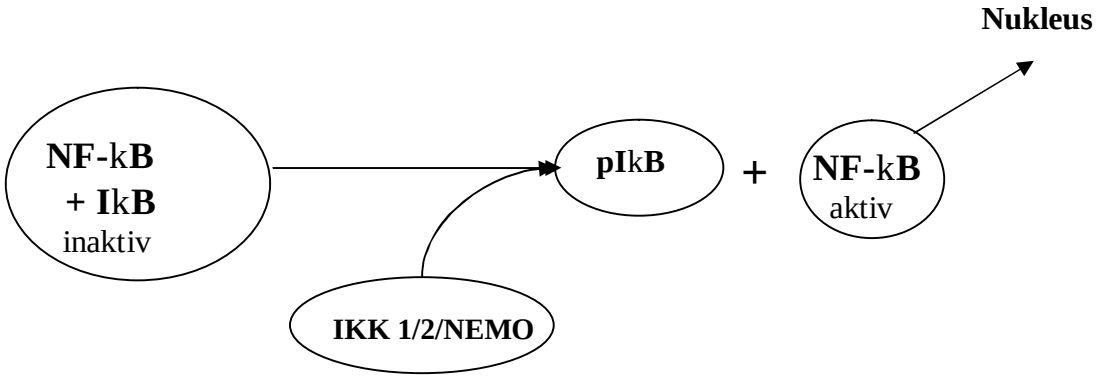


Abb. 1: **Schematische Darstellung des klassischen Aktivierungsweges von NF-kB**

Bei der klassischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB wird die an IκB gebundene inaktive Form durch IKK 1, IKK 2 oder auch IKK γ (NEMO) aktiviert und kann dann im Nukleus zur Transkription von Zielgenen führen.

NF-kB κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **IkB** Inhibitor of κB, **NEMO** NF-κB essential modulator

In Säugerzellen besteht die NF-κB Familie aus fünf unterschiedlichen Rel-Proteinen, welche verschiedene hetero- und homodimere Komplexe bilden. Diese werden in ruhenden Zellen durch Bindung an inhibitorische Moleküle, genannt Inhibitors of kappa B (IκBs), im Zytosol inaktiv gehalten (Ghosh et al. 1998). Verschiedenste Stimuli, wie zum Beispiel proinflammatorische Zytokine (TNF-α, Il-1β u.a.), bakterielle Lipopolysaccharide oder virale Infektion vermitteln die Phosphorylierung der IκB Proteine. IκB-Proteine werden durch IκB-kinase (IKK) phosphoryliert. IKK ist ein Kinasekomplex (700-900 kDa), der aus zwei katalytischen Untereinheiten IKK 1 und IKK 2 (oder IKKα und IKKβ) und aus einer regulierenden Untereinheit IKKγ oder NEMO besteht (Isreal 2000, Karin 1999, Mercurio et al. 1999, Yamaoka et al. 1998, Rothwarf et al. 1998). Die erfolgte Phosphorylierung von IκB stellt einen Trigger für die Degradation von inhibitorischen IκBs dar, was wiederum zur Freisetzung der NF-κB Dimere führt, die dann im Nukleus akkumulieren. Dort binden sie an das sogenannte κB-Element und aktivieren so die Transkription ihrer Zielgene (Karin und Ben-Neriah 2000, Miyamoto und Verma 1995). Zu diesen Genen zählen solche, die für proinflammatorische Zytokine und Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und anti-apoptotische Proteine kodieren (Karin und Ben-Neriah

2000). Abbildung eins zeigt diese Kaskade, die als klassischer Aktivierungsweg bezeichnet wird. Ursprünglich vor allem in der Immunologie von Interesse, wird NF-κB zunehmend auch mit verschiedenen Aspekten der Karzinogenese in Verbindung gebracht, zum Beispiel mit der Kontrolle der Apoptose, des Zellzyklus, der Differenzierung und Zellmigration. Erhöhte NF-κB Aktivität ist in einer Vielzahl maligner Tumoren zu finden, so auch im Pankreaskarzinom (Wang et al. 1999, Ludwig et al. 2001, Dejardin et al. 1999).

1.3 Ras

Die Ras-Familie der GTP-bindenden Proteine nimmt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung ein (Satoh et al. 1992, Boguski und McCormick 1993, McCormick 1994, Joneson und Bar-Sagi 1997). Mutationen in Ras-Allelen werden in vielen humanen Tumoren gefunden und Ras-Gene zeigen die häufigsten Genmutationen in humanen Tumoren (Barbacid 1987, Hunter 1997). Die höchsten Inzidenzen für Ras-Genmutationen wurden im Pankreaskarzinom nachgewiesen. Biochemisch führen sie zu verstärkter GTP-Bindung und damit zu übermässiger Aktivierung der mitogen-activeted protein kinase (MAP) Signalkaskade (Bos 1989). Drei MAP Kinasen sind identifiziert, die extracellular signal-regulated kinases (EKRs), die c-Jun N-terminal/stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs) und die p38 Kinasen.
Zusätzlich können NF-κB Zielgene durch onkogene Formen von Ras aktiviert werden (Finco und Baldwin 1993, Galang et al. 1994). NF-κB selbst gilt dabei als ein wichtiges Ziel der Ras-aktivierten Signaltransduktion (Finco et al. 1997).

1.4 Das Pankreaskarzinom

2006 waren in den USA 2 % aller neu diagnostizierten Krebserkrankungen Pankreaskarzinome und 6 % aller krebsbedingten Todesfälle dem Pankreaskarzinom zuzuschreiben (Jemal et al. 2006). Es geht zu über 90 Prozent aus exokrinem Pankreas hervor und mehr als 80 Prozent sind duktalen Ursprungs. Wegen seiner vergleichsweise symptomarmen Anfangsstadien, der meist späten Diagnosestellung und eingeschränkten Therapieoptionen ist die Prognose schlecht. So sind bei Diagnosestellung nur noch 8 % aller Pankreaskarzinome in einem lokalisierten Stadium, 26 % sind bereits regional metastasiert und 52 % weisen Fernmetastasierung auf (Jemal et al. 2006). Chemotherapeutische Ansätze mit Gemcitabine zeigen ein Ansprechen in lediglich 12-27 Prozent der Fälle (Burris et al. 1997, Rothenberg et al. 1996). Dementsprechend hat sich in den USA die Fünf-Jahres-Überlebensrate von 5 % 2006 im Vergleich zu den Zahlen seit 1974 nicht gebessert (Jemal et al. 2006).

Wie oben erwähnt findet sich eine Überexpression von Hitzeschockproteinen und NF-κB-Aktivierung im Pankreaskarzinom, so dass ein Zusammenspiel möglich erscheint.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Überexprimierung von Hitzeschockproteinen und Aktivierung von NF-κB und Ras speziell im Pankreaskarzinom lässt vermuten, dass sie in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms eine wichtige Stellung einnehmen (Gress et al. 1994, Ogata et al. 2000, Wang et al. 1999, Ludwig et al. 2001, Dejardin et al. 1999 und Bos 1989). Ziel der Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen den Signaltransduktionskaskaden von NF-κB bzw. Ras und der Induktion von Hitzeschockproteinen in Pankreaskarzinomzellen in vitro aufzuzeigen. Verwendet werden dazu Pankreaskarzinomzellen der Maus (TD 1 und TD 2) und humane Pankreaskarzinomzellen (MiaPaCa, Panc-1 und MiaPaCa rtTA). Abschließend werden dann noch humane Pankreaskarzinom-Paraffinschnitte verwendet, um die Situation in vivo zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Blotmembran Polyvinyliden Difluorid	Millipore GmbH, Eschborn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cell Culture Lysis Reagent 5x	Promega, Madison, WI
Chromatographiepapier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Complete-Mini Proteasen Inhibitoren Cocktail	Roche, Mannheim
Cryo Tube Vials	Nalge Nunc International, Denmark
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison, WI
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Eppendorf-Reaktionsgefäß 1,7 ml	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Falcon Röhrchen	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Filmmaterial	Hyperfilm™ECL™, Amersham International, Buckinghamshire, England
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schnell, Dassel
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Formamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Seromed Biochrom KG, Berlin
GB002 (Whatmanpapier NB)	Merck, Bruchsal
Geneticin, G 418	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Gewebekulturplatten 10 cm	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycine	AppliChem GmbH, Darmstadt

HEPES	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hybond N+	Amersham Pharmacia Freiburg
LY-294002	Calbiochem Merck, Darmstadt
Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI
$MgCl_2$-$6H_2O$	Merck, Darmstadt
Megaprime DANN Labelling System	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver blotting grade	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
N-acetyl-L-cysteine	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumdesoxycholate	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Nonidet 40 Fluka	Buchs, Schweiz
Passive Lysis 5x Buffer	Promega, Madison, WI
PDTC Ammonium-pyrrolidinedithio-carbamate	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS)	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Seromed Biochrom KG, Berlin
Pipetten für Zellkultur	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Prehybridisation solution 2x concentrate buffered with SSC	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Rainbow coloured protein molecular weight marker	New England Biolabs
Reaktionsgefäß für Luciferase Assay, 5ml	Sarstedt Inc., Newton
RNeasy Midi Kit	Quiagen, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, Paisley, Schottland
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
SDS ultra pure, Na-dodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Serological Pipet 1, 2, 5, 10 ml	Becton Dickinson Labware, USA
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA

TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Transfast Transfection Reagent	Promega, Madison, WI
Tris	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
tRNA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Zellschaber	Sarstedt Inc., Newton

2.1.2 Eukaryontische Zelllinien

Tabelle 1: verwendete eukaryontische Zelllinien

ATCC American type culture collection, **TGF** a transforming growth factor alpha, **P53** Protein53, **rtTA** reverse Tetracycline-controlled transactivator

Name	Zelltyp	Bezugsquelle
MiaPaCa	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie (Referenz: Yunis, 1977)	ATCC Number: CRL-1420
Panc-1	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie (Referenz: Lieber et al., 1975)	ATCC Number: CRL-1469
TD 1	Murine Pankreaskarzinomzelllinie (TGF α, P53 Maus)	PD Dr. C. Weber, Universität Ulm
TD 2	Murine Pankreaskarzinomzelllinie (TGF α, P53 Maus)	PD Dr. C. Weber, Universität Ulm
MiaPaCa rtTA	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie, induzierbar	PD Dr. C. Weber, Universität Ulm

In Tabelle 1 sind die verwendeten Zelllinien aufgeführt. Es handelt sich dabei um eukaryonte Zellen aus Pankreaskarzinomen der Maus und des Menschen.

2.1.3 Gewebeschnitte

Tabelle 2: verwendete Gewebeschnitte

	Herkunft	Einbettung	Bezugsquelle
Normales Pankreas	Human	Paraffingewebe	Prof. Dr. Gress, Universität Ulm
Pankreaskarzinom	Human	Paraffingewebe	Prof. Dr. Gress, Universität Ulm

In Tabelle 2 sind die verwendeten Gewebeschnitte erwähnt. Verwendet wurden jeweils in Paraffin eingebettes normales humanes Pankreasgewebe und Gewebeschnitte von humanem Pankreaskarzinom

2.1.4 Antikörper

Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper

Name	Typ	Verdünnung	Hersteller, Best.-Nr.
Anti-**HSP 27** (Hitzeschockprotein 27)	Monoklonal, mouse	1:1000	Stressgene # SPA-800
Anti-**HSP 70** (Hitzeschockprotein 70)	Monoklonal, mouse	1:1000	Stressgene # SPA-810
Anti-**HSP 90** (Hitzeschockprotein 90)	Monoklonal, mouse	1:1000	Stressgene # SPA-830
Anit-**IκBα** (Inhibitor of kappa B alpha)	Polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz # B 2503
Anti-**IKK 1/2** (IκB kinase 1/2)	Polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz # sc 7607
Anti-**pERK 1 und 2** (phospho extracellular-signal regulated kinase)	Polyklonal, rabbit	1:1000	New England BioLabs # 9101S
Anti-**ERK1** (extracellular-signal regulated kinase 1)	Polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz # C-16, SC-93
Anti-**ERK 2** (extracellular-signal regulated kinase 2)	Polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz # C-14, SC-154

Tabelle 4: verwendete sekundäre Antikörper
IgG Immunglobulin G

Name	Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti mouse **IgG**	Konjugiert mit Horseradishperoxidase	1:3000	Amersham Pharmacia Biotech
Anti rabbit **IgG**	Konjugiert mit Horseradishperoxidase	1:3000	Amersham Pharmacia Biotech

Tabelle 3 zeigt die eingesetzten primären Antikörper und in Tabelle 4 sind die angewendeten sekundären Antikörper genannt.

2.1.5 Plasmide, Tracer

Tabelle 5: **verwendete Plasmide und Tracer mit Angabe der Bezugsquelle**

DNA desoxyribonucleid acid, **HSP** Hitzeschockprotein, **Luci** Luciferase, **Ig**k Immunglobulin kappa light chain, **IKK** IκB kinase, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **EE** konstitutiv aktiv, **Ras** Rat sarcoma, **(Raf)BxB** konstitutiv aktives Raf, **Raf** rapidly growing fibrosarcoma, **DD** konstivutiv aktiv, **PBI** bidirectional promoter, **luc** firefly luciferase, **cDNA** copy-DNA

Plasmid	Bezugsquelle
pc DNA	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
HSP 70 Luci	Dr. Wang, University of Wisconsin, Madison, USA
Igκ Luci	Prof. Dr. R. Schmid, Universität München
IKK 1 Wt	Prof. A. Israel, Inst. Pasteur, Paris, Frankreich
IKK 1 KD	Prof. M. Karin, University of California, San Diego, USA
IKK 1 EE	Prof. M. Karin, University of California, San Diego, USA
IKK 2 Wt	Prof. A. Israel, Inst. Pasteur, Paris, Frankreich
IKK 2 KD	Prof. M. Karin, University of California, San Diego, USA
IKK 2 EE (myc)	Prof. M. Karin, University of California, San Diego, USA
IKK 2 EE (flag)	Prof. M. Karin, University of California, San Diego, USA
Ras N 17	Prof. Dr. Wittighofer, MPI Dortmund
Ras G 12 V	Prof. Dr. Wittighofer, MPI Dortmund
(Raf)BxB DD	PD Dr. C. Weber, Universität Ulm
PBI luc	Dr. Bernd Baumann, Universität Ulm
PBI luc IKK 2 Wt	Dr. Bernd Baumann, Universität Ulm
PBI luc IKK 2 KD	Dr. Bernd Baumann, Universität Ulm
HSP 70 cDNA Sonde	Prof. Dr. Gress, Universität Ulm

Tabelle 5 listet die Plasmide und Tracer auf, welche in den Versuchen eingesetzt wurden.

2.1.6 Apparaturen

accu-jet Brand	Roth, Karlsruhe
Cell Counter	Wallac 1219 Rackbeta Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Cornex Röntgenfilmkassette	DuPont, Bad Homburg
Elektrophoreseapparatur	Miniprotean II Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Feinwaage	Precisa 40 SM-200A, Sartorius, Göttingen
Filmentwicklungsmaschine	Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Filmkassette	Rego
Heizblock	Thermomixer 5436, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf
Inkubator	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Axioskop, Zeiss, Jena
Lumat LB 9501	Bethold Technologies GmbH
Pipetten	pipetman, Gilson
Power-Supply	Bio-Rad PowerPac 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, Göttingen
Rollinkubator	Heraeus, Hanau
Semidry-Blot-Kammer	Fastblot B 33, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Spectrophotometer	Beckman UV-DU 640
Thermoblock	Peq lab
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf
UV-Stratalinker	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Zentrifuge	Sorvall R5-CB, Kendo Laboratory Products, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C und einer CO_2-Konzentration von sieben Prozent in Kultur gehalten. Die Zellen werden zweimal in der Woche subkultiviert. Nach Absaugen des Mediums werden die adhärenten Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in einem ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert bis sie sich von der Kulturschale lösen. Zum Beenden der Enzymreaktion wird Wachstumsmedium hinzugegeben und die Zellen werden verdünnt in Kulturschalen ausgesäht. Die Zellen wurden jeweils 16 Stunden vor weiterer Verwendung in serumfreiem Medium gehalten.

Kulturmedien:

- für MiaPaCa und Panc-1:	DMEM 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
- für MiaPaCa rtTA:	DMEM 10 % FCS, tetracyclinfrei 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 200 U/ml Geneticin
- für TD 1 und TD 2:	RPMI 10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
- für die Kryokonservierung:	FCS 10 % DMSO
- serumfreies Medium:	entsprechend, allerdings mit nur 0,5 % FCS

2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen werden abtrypsiniert, in Medium aufgenommen, fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, das Medium verworfen und das Pellet in einem ml Kryomedium aufgenommen. Die Zellen werden in Kryotubes überführt, über Nacht (12-18 h) bei minus 80 °C gelagert und können dann in flüssigem Stickstoff umgesetzt werden.

2.2.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden die Kryotubes im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die aufgetauten Zellen werden rasch in ein Falcon-Röhrchen mit zehn ml Medium überführt. Der Überstand nach Zentrifugation mit 1000 U/min für fünf Minuten wird abgesaugt und die Zellen im Pellet mit zehn ml Medium resuspendiert und auf eine Gewebekulturplatte ausgesät.

2.2.4 Inkubation der Zellen mit NF-κB Inhibitoren

Vor Inkubation mit verschiedenen NF-κB Inhibitoren werden die Zellen über Nacht (zwölf Stunden) mit serumfreiem Medium versetzt, um sie in der G_0-Phase des Zellzyklus zu halten. Die Stimulation erfolgt dann über Nacht (18 Stunden) mit fünf mM NAC, 20 mM NAC, zehn µM PDTC, 25 µM PDTC oder 20 µM LY bei 37 °C im Brutschrank. Die Substanzen wurden zuvor in den entsprechenden Konzentrationen in serumfreiem Kulturmedium gelöst, auf den physiologischen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 eingestellt und dann steril filtriert.

2.2.5 Stimulation der Zellen mit TPA und Induktion mit Doxycyclin

MiaPaCa rtTA- Zellen werden am Tag nach der Transfektion mit TPA stimuliert und mit Doxycyclin induziert. Dazu wird Doxycyclin in einer Konzentration von drei µl/ml (stock zwei mg/ml) am morgen hinzu gegeben und TPA in einer Konzentration von einem µM am abend. Die Zellen werden 48 Stunden später zu Proteinlysat für Western Blot Analysen weiterverarbeitet.

2.2.6 Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot Analysen

Die Vorgänge erfolgen auf Eis. Die Zellen werden zwei mal mit kaltem PBS (vier °C) gewaschen, in einem ml PBS mittels Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschalen entfernt und in ein vorgekühltes 1,7 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf dem Überkopfschütter im Kühlraum wird das Lysat für 20 Minuten bei 14000 U/min geklärt. Der Überstand wird 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben können so bei minus 20 °C gelagert werden.

Puffer:

- Lysepuffer:	25 mM HEPES, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 % NP 40
	0,25 % Natriumdesoxycholate
	10 % Glycerol
	10 mM $MgCl_2$
	1 mM EDTA
	ad 500 ml Aqua bidest (eine Tablette Complete-Mini-Proteasen-Inhibitor-Cocktail für 50 ml Lysepuffer)
- 2x Lämmli-Probenpuffer:	120 ml Tris-HCl, pH 6,8
	20 % (v/v) Glycerol
	6 % (w/v) SDS
	10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
	0,01 % (w/v) Bromphenol Blau
	ad 10 ml Aqua bidest.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung erfolgt nach dem Prinzip der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Lämmli 1979) unter Verwendung des Mini-Protean II Systems von Biorad.

Das Trenngel wird wie in Tabelle 6 angegeben gegossen und mit wassergesättigtem Butanol zur Glättung der Oberfläche überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wir das Butanol entfernt. Das Sammelgel wird auf das Trenngel pipettiert und

der Kamm für die Probentaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach Polymerisation des Gels werden die Proben und ein Größenmarker (rainbow colored protein molecular weight marker, Biorad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei I = 30 mA.

Puffer und Lösungen:

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
10x Laufpuffer:	121 mM Tris-HCl 288 mM SDS 75 mM Glycin
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung: (APS)	1 g Ammoniummperoxosulfat ad 10 ml Aqua bidest.
10 % (w/v) SDS:	1 g SDS ad 10 ml Aqua bidest.

Tabelle 6: Herstellung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel		Sammelgel
Acrylamidkonzentration	10 %	12 %	
H_2O (Aqua bidestilliert)	4,4 ml	3,4 ml	3,0 ml
Trenngel- bzw. Sammelgel- puffer	2,6 ml	2,6 ml	1,3 ml
30 % Acrylamid	3,3 ml	4,0 ml	750 µl
10 % SDS (sodium dodecylsulfat)	100 µl	100 µl	50 µl
10 % APS (Ammonium-peroxosulfat)	50 µl	50 µl	30 µl
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine)	10 µl	10 µl	10 µl

2.2.8 Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren

Durch Anlegen von Spannung werden die aufgetrennten Proteine des Gels auf eine proteinbindende PVDF-Membran im Semi-Dry-Verfahren überführt. Dazu werden auf die Anode zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, darüber legt man die zuvor in 100 Prozent Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran, das ebenfalls in Transferpuffer äquilibrierte Trenngel und wiederum zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Luftblaseneinschlüsse sind zu vermeiden. Bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA, für ein Gel in der Größe 8,5 x 5,5 cm, dauert der Blotvorgang 50 Minuten. Bei zwei Gelen ist die Stromstärke zu verdoppeln.

Puffer:

Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl
	250 mM Glycine
	20 % Methanol

2.2.9 Immundetektion von Proteinen durch spezifische Antikörper

Da jedes Protein ein für sich typisches Antigenmuster trägt, ist es möglich, ein Protein durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern zu detektieren. Zum Einsatz kommt ein Primär-Sekundärantikörper-System, wobei der Primärantikörper an ein oder mehrere Epitope (mono- oder polyklonal) des Proteins bindet und der Sekundärantiköper an den Primärantiköper. An den Sekundärantikörper ist Meerrettichperoxidase gekoppelt (HRP), welche nach Zugabe des entsprechenden Substrates ein Licht emittierendes Produkt erzeugt (Chemolumineszenz).

Die PVDF-Membran wird mit 50 ml Blockpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und bei vier °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 15 Minuten mit TBST entfernt ungebundene Erstantikörper. Die Membran wird für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und wiederum drei mal 15 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend kommt die Membran für eine Minute in ECL-Reagenz und wird in eine Filmkassette überführt. Auf einem hochempfindlichen Film (Hyperfilm™ECL™) werden die Signale detektiert.

Puffer:

TBST-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,6 137 mM NaCl 0,05 % Tween 20
5 % Blockpuffer:	2,5 g Skim-Milk-Powder ad 50 ml TBST-Puffer

2.2.10 Transfektion der Zellen

Um Aussagen über die HSP Promoteraktivität bei Modulation der NF-κB Signalwege machen zu können, werden die Zellen mit verschiedenen cDNA-Konstrukten transfiziert. Es werden je 0,2 x 10^6 Zellen pro well auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 0,5 – 1,5 µg der entsprechenden DNA gemäß Transfast-Transfektionsprotokoll (Promega) transfiziert.

2.2.11 Luciferase Assay, Dual-Luciferase Assay

Mit Hilfe von genetischen Reportern lassen sich Genexpressionen gut untersuchen. Als solcher Reporter dient Firefly Luciferase *(Photinus pyralis)*, ein monomeres Protein mit 61 kDa. Das Enzym setzt Beetle Luciferin in Oxyluciferin um, wobei Licht freigesetzt wird, welches mittels Luminometer gemessen werden kann.

Verwendet wird das Luciferase Assay System von Promega gemäß Herstellerprotokoll.

Die transfizierten Zellen werden mit vier °C PBS gewaschen, mit je 100 µl Luciferase Cell Culture Lysis Reagent versetzt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 rpm eine Minute abzentrifugiert. Pro Ansatz werden 50 µl des Luciferase Assay Reagent in ein PS-tube vorgelegt und je zehn µl des Überstandes hinzupippetiert. Im Luminometer wird die Luciferaseaktivität anhand des detektierten Lichtes gemessen und dient als Reporter für HSP 70- bzw. Igκ-Promoteraktivität.

Bei Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems lässt sich die Genauigkeit der Ergebnisse verbessern, da die Aktivität der Firefly Luciferase auf die simultan expremierte und gemessene konstitutiv aktive Renilla Luciferase normalisiert wird. Renilla Luciferase *(Renilla reniformis)* ist ein 36 kDa großes monomeres Protein, das Coelenterazine in Coelenteramide umsetzt, wobei Licht freigesetzt wird, welches ebenfalls im Luminometer messbar ist.

Vorgegangen wird hier nach dem Protokoll des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega.

Die transfizierten Zellen werden mit vier °C PBS gewaschen, mit je 100 µl Luciferase Cell Culture Lysis Reagent versetzt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 rpm eine Minute abzentrifugiert. Zu jeweils 50 µl Luciferin werden 20 µl Lysat gegeben und dann das Signal der Firefly Luciferase im Luminometer detektiert. Nach Zugabe von 50 µl Stop&Glo Reagenz wird das Signal der Renilla Luciferase gemessen. Die Normalisierung erfolgt durch Dividieren des Firefly-Messwertes durch den Renilla-Messwert.

2.2.12 Isolierung von mRNA

Generell muss beim Umgang mit RNA sichergestellt sein, dass verwendete Gerätschaften frei von RNase sind, damit eine RNA-Degradation vermieden wird. Bei Glas- und Keramikgegenständen kann dies durch vierstündiges Erhitzen auf 180 °C erreicht werden. Pipettenspitzen und verwendete Lösungen werden für 40 Minuten bei 125 °C autoklaviert. Durch das Tragen von Latexhandschuhen soll die Kontamination der Proben mit RNAsen über die Haut verhindert werden.

Für die Northern Blot Analyse der HSP 70 mRNA in Pankreaskarzinomzellen wird die RNA aus den Zellen mittels RNeasy MidiKit gemäß Herstellerprotokoll extrahiert. Prinzipiell werden dazu die Proben in Gegenwart eines denaturierenden, Guanidine-isothiocyanate (GITC) enthaltenden Puffers, der die Isolierung von intakter RNA durch Inaktivierung von RNasen sicherstellt, lysiert und homogenisiert. Zugefügtes Ethanol sorgt für adäquate Bedingungen für die Bindungen. Die Probe wird dann in eine RNeasy Säule eingefüllt, wo die Gesamt-RNA gebunden wird. Durch ein spezielles Salzpuffer System kann bis zu ein mg RNA, die größer als 200 Basen ist, an die RNeasy Gelmembran binden. Da die meiste RNA, die kleiner als 200 Nukleotide ist (ein Anteil von 15-20 Prozent der Gesamt-RNA), durch die Methode selektiv exkludiert wird, resultiert daraus eine Anreicherung an mRNA. Die in RNAse freiem Wasser eluierte RNA kann dann weiter verwendet werden. Die Konzentration der RNA wird im Spectrophotometer bestimmt. Weiterhin wird die RNA auf eine definierte Konzentration von einem µg Gesamt-RNA/µl eingestellt.

2.2.13 Northern Blotting

Durch Northern Blot Analysen können Transkriptmengen und Expressionsmuster der Gesamt-mRNA festgestellt werden. Dazu wird die gelelektrophoretisch aufgetrennte mRNA auf Nylonmembranen fixiert.

Je 20 µg der Gesamt-mRNA werden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 15 µl Formaldehypuffer resuspendiert, bei 95 °C denaturiert und mit fünf µl Ladepuffer/ Ethidiumbromid-Gemisch versehen. Einem einprozentigen Agarosegel wird ein Prozent 10x MOPS und Formaldehyd in einer Endkonzentration von 5,7 M zugesetzt. Als Laufpuffer wird 1x MOPS verwendet. Die RNA wird über eine Laufstrecke von 15 cm bei einer Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Northern Blotting erfolgt nach der Standard-Kapillarblot-Technik nach Sambrook und Mitarbeitern (1989). Bei diesem Verfahren wird die elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch Kapillarkräfte vom Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Markierung der 18S- und 28S-RNA-Banden auf der Membran kann die RNA durch kurzwelliges UV-Licht im so genannten Stratalinker kovalent an den feuchten Filter gebunden werden (cross linking). Die so hergestellten Membranen können im Trockenen beliebig lange gelagert werden und jederzeit für Northern Blot Hybridisierungen verwendet werden.

Puffer:

10x MOPS:	MOPS	4,2 g
	3 M Natriumacetat, pH 8,8	1,67 ml
	0,5 M EDTA	2 ml
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen,	
	auf 100 ml mit H_2O (RNAse-frei) auffüllen und durch	
	0,2 µm Filter steril filtrieren.	
Formaldehydpuffer:	Formamid (deionisiert)	500 µl
	Formaldehyd (deionisiert)	167 µl
	10x MOPS-Puffer	100 µl
	H_2O (RNAse-frei)	233 µl
Ladepuffer:	Probenpuffer für Agarosegel	100 µl
	Ethidiumbromid (10 mg/ml)	15 µl

2.2.14 Hybridisierung von Northern-Blots

Zur Evaluierung des HSP 70 Expressionsmusters der extrahierten Gesamt-mRNA wird der Northern Blot mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Die Sonden für die HSP 70 mRNA wurden von der AG Prof. Dr. Gress zur Verfügung gestellt. Für den Markierungsansatz wurden jeweils ca. 100 ng cDNA sowie 50 µCi dCTP pro Blot angesetzt.

Die Membran wird über Nacht in 15 ml Prehybridisation Solution buffered with SSC mit 112,5 µl denaturierter ssDNA (salmon sperm DNA) und 150 µl tRNA bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. 25 µg der Sonde werden mit 50 µCi dCTP unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Systems gelabelt, zum Prehyb-Mix zugegeben und über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die Membran wird mit 2x SSC und 0,1 Prozent SDS für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen, danach ebenfalls in 2x SSC und 0,1 Prozent SDS für 30 Minuten bei 68 °C und anschließend in 0,2x SSC und 0,1 Prozent SDS für 15 Minuten bei 68 °C inkubiert. Die Membran wird in Folie eingeschweißt und ein Film zur Detektion aufgelegt.

Puffer:

20x SSC:	NaCl	175,3 g
	NaCitrat	88,3 g
	pH auf 7,0 einstellen	
	auf 1 l mit RNAse-freiem H_2O auffüllen	

2.2.15 Doppel – Immunfluoreszenz

Das Pankreaskarzinom-Gewebe ist in Paraffin eingebettet und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Das Paraffingewebe wird entparaffinisiert, dabei zweimal je fünf Minuten mit Rotihistol versetzt und dann in eine absteigende Alkoholreihe von 100- prozentiger bis 50- prozentiger Verdünnung für jeweils zwei mal fünf Minuten eingelegt. Dann erfolgt eine Mikrowellenbehandlung von zwei mal fünf Minuten 750 W in 10 mM Natriumcitratpuffer zur Permeabilisierung. Die Schnitte werden im Wasserbad abgekühlt und anschließend mit 0,1 Prozent Tween20 in PBS fünf Minuten gewaschen. Geblockt wird für 30 Minuten in einer Feuchtkammer mit 1:30 Normalserum (goat) in PBS mit zweiprozentigem BSA. Die Primärantikörper HSP 70 und pIκBα werden der

Feuchtkammer in einer Verdünnung von 1:200 bei 4 °C über Nacht zugegeben. Die Negativkontrolle erfolgt mit Rabbit IgG. Dreimaliges Waschen mit PBS 1x / 0,1 Prozent Tween20 für jeweils fünf Minuten entfernt ungebundene Primärantikörper. Dann wird der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben. Verwendet werden die Chromogenkonjugate Alexa 488 (grün) für HSP 70 und Cy 3 für pIκBα . Abschließend wird wieder drei mal fünf Minuten mit PBS 1x / 0,1 Prozent Tween20 gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgt mit DAPI.

2.2.16 verwendete Statistik

In allen Versuchen wurden die Werte durch Mehrfachbestimmungen ermittelt ($n \geq 2$).
Aus den Rohdaten der Luciferase Assays und Dual-Luciferase Assays wurde für jeden Versuchsansatz das arithmetische Mittel (rechnerisch bestimmter Mittelwert) nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\bar{x}_{\mathrm{arithm}} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i = \frac{x_1 + x_2 + \cdots + x_n}{n}$$

und die Standartabweichung des arithmetischen Mittels nach der folgenden Formel berechnet:

$$s_{\overline{x}} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)} * \sum_{i}^{n}(x_i - \overline{x})^2}$$

Die Werte der Ansätze der Negativ-Kontrollen wurden dabei immer als 100 % gesetzt und die Werte der einzelnen Versuche in prozentualem Bezug dazu gesetzt.
Die Ergebnisse werden in den Abbildungen als Säulendiagramme visualisiert.

3. Ergebnisse

3.1 HSP 70 Expression unter Hitzeexposition

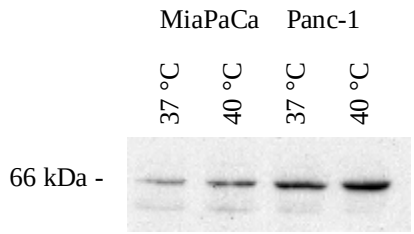


Abb. 2: **Expression von HSP 70 unter Hitze / Western Blot**

Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien *MiaPaCa* und *Panc-1* werden für jeweils eine Stunde bei 40 °C im Wasserbad erhitzt. Die Kontrollgruppe wird bei 37 °C im Inkubator belassen. Die Abbildung zwei zeigt das Ergebnis der 24 h später erfolgten Western Blot Analyse der Hitzeschockprotein (HSP) 70 Expression. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.

Bei beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa und Panc-1 lässt sich, wie Abbildung zwei zeigt, im Western Blot eine hohe basale HSP 70 Expression nachweisen. Nach einstündiger Inkubation der Zellen im Wasserbad bei 40 °C werden die Zellen 24 h später weiterverarbeitet. Die in der Folge mittels Western Blot detektierte HSP 70 Expression zeigt sich im Vergleich zur Basalexpression deutlich verstärkt.

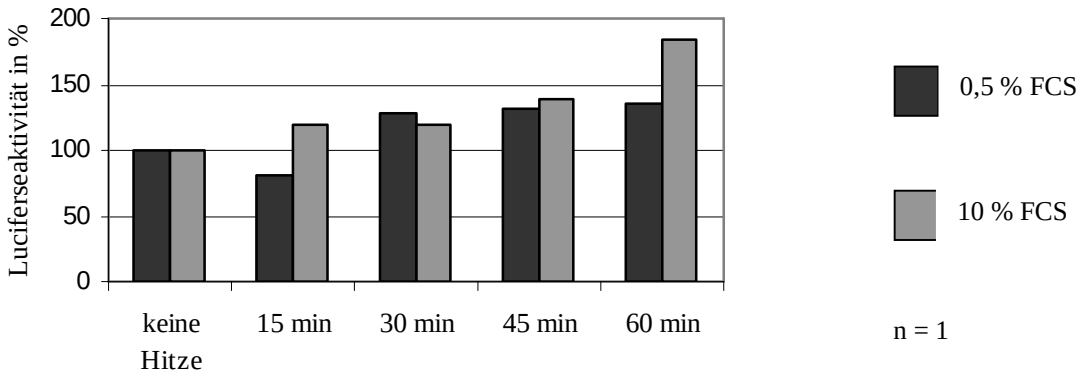


Abb. 3: **Promotoraktivität von HSP 70 unter Hitzeexposition / Luciferase Assay**

MiaPaCa Zellen werden mit 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) transfiziert, 24 h später im Wasserbad bei 40 °C für 15, 30, 45 oder 60 min inkubiert und wiederum 24 h später die HSP 70 Promotoraktivität mittels Luciferase Assay ermittelt. Einer Gruppe wird nach der

Hitzestimulation Serum (0,5 % FCS) entzogen, die andere im Vollserum (10 % FCS) belassen. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze sind jeweils in prozentualen Bezug zur Negativkontrolle (keine Hitze) gesetzt.
HSP Hitzeschockprotein, **prom.** Promotor, **FCS** fetal calf serum

Im Luciferase Assay beobachtet man bei humanen Pankreaskarzinomzellen (MiaPaCa) einen Anstieg der HSP 70 Promotoraktivität nach Inkubation im 40 °C Wasserbad. Bereits nach 30 Minuten Hitzeexposition steigt sowohl bei den Zellen in serumfreiem Medium als auch bei den Zellen im Vollserum die HSP 70 Promotoraktivität an und lässt sich bei noch längerer Hitzeexposition weiter steigern. Dargestellt ist dies in Abbildung drei.

3.2 Hitzeschockproteine unter NF-κB Inhibitoren

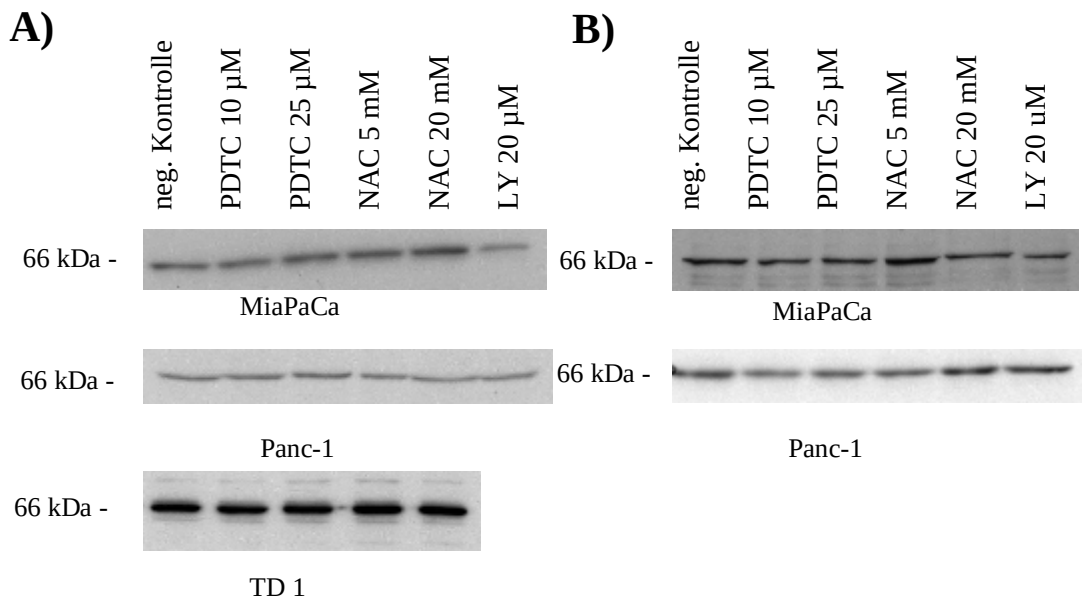


Abb. 4: **Expression von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse**
Humane Pankreaskarzinomzellen *(MiaPaCa / Panc-1*) und Pankreaskarzinomzellen der Maus (*TD 1*) werden über Nacht (18 Stunden) mit verschiedenen Konzentrationen von NF-κB Inhibitoren (PDTC, NAC, LY) inkubiert und im direkten Anschluss daran für eine Western Blot Analyse der HSP 70 Expression weiterverarbeitet. Die Zellen sind dabei A) in serumfreien bzw. B) in Vollmedium belassen worden. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.
HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **LY** 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride

Um den Einfluss von NF-κB auf die HSP 70 Expresion zu untersuchen, werden sowohl humane als auch Pankreaskarzinomzellen der Maus über 18 Stunden mit verschiedenen NF-κB- Inhibitoren inkubiert und dann direkt zur Western Blot Analyse weiterverarbeitet. Abbildung vier zeigt, dass weder die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa und Panc-1 noch die Pankreaskarzinomzellen der Maus (TD 1) eine Änderung der HSP 70 Expression erfahren nach Inkubation mit den NF-κB Inhibitoren PDTC, NAC oder LY. Auch die Verwendung von serumfreiem Medium hat keine Modulation der HSP 70 Expression zur Folge. Lediglich bei MiaPaCa Zellen im serumfreien Medium kann mit 20 µM LY ein Rückgang der HSP 70 Expression im Western Blot beobachtet werden. Auffällig ist jedoch bei allen Karzinomzellen die hohe Grundaktivität der HSP 70 Expression.

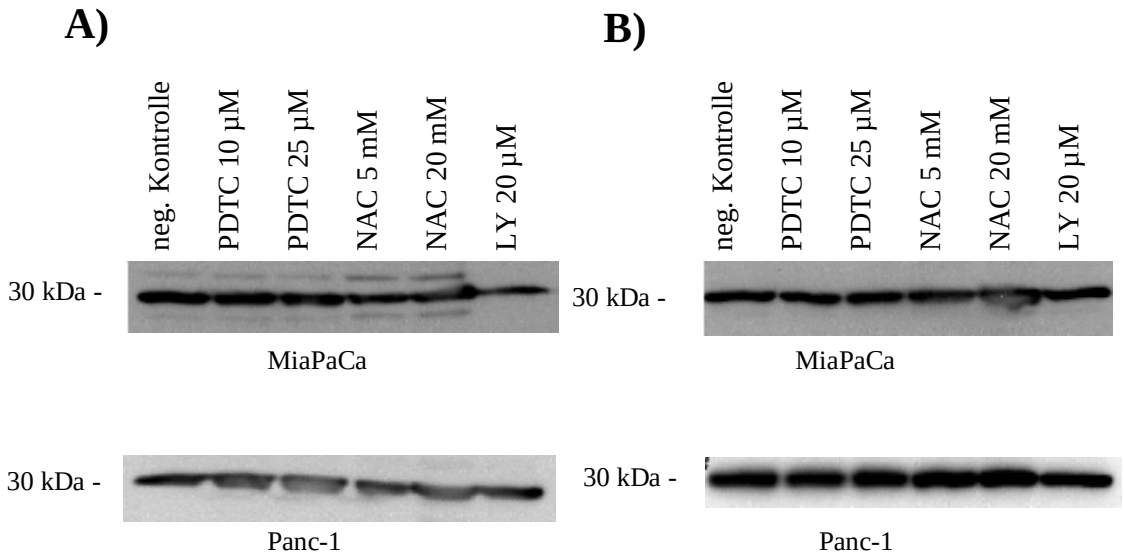


Abb. 5: **Expression von HSP 27 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse**

Humane Pankreaskarzinomzellen (*MiaPaCa / Panc-1*) werden über Nacht (18 Stunden) mit verschiedenen NF-κB Inhibitoren (PDTC, NAC, LY) inkubiert. Die Abbildung zeigt die anschließende Analyse der Hitzeschockprotein (HSP) 27 Expression mittels Western Blot. Die Zellen sind A) in serumfreies Medium überführt bzw. B) in Vollmedium belassen worden. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.

HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **LY** 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride

Nach dem gleichen Experiment wird durch Western Blot Analyse bei MiaPaCa und Panc-1 Zellen hohe basale Expressionsaktivität von HSP 27 gefunden, die in Abbildung fünf verdeutlicht wird. Die Inkubation mit verschiedenen NF-κB Inhibitoren ergibt jedoch keine Änderungen in der HSP 27 Expression. Weder in serumfreiem noch in Vollmedium ergibt die NF-κB Inhibitoren eine im Western Blot detektierbare Modulation der HSP 27 Expression.

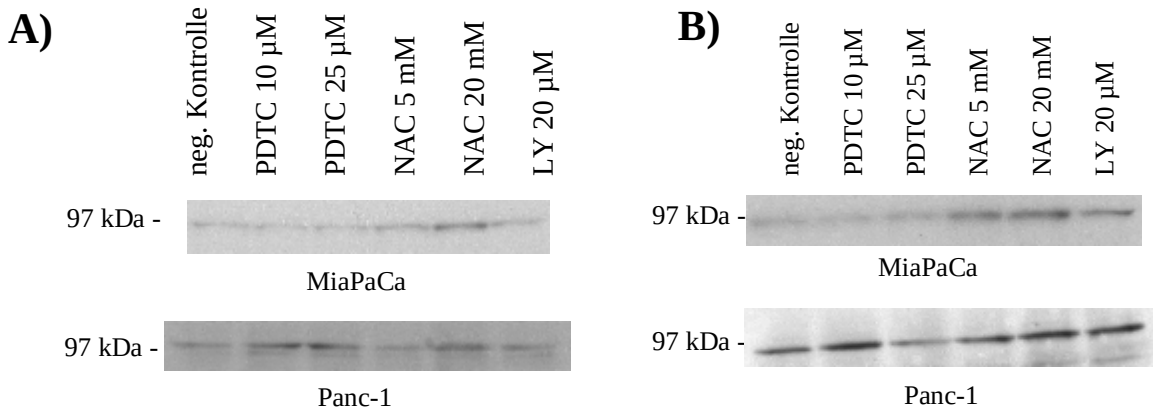


Abb. 6: **Expression von HSP 90 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse**
Humane Pankreaskarzinomzellen (*MiaPaCa* und *Panc-1*) werden über Nacht (18 Stunden) mit verschiedenen NF-κB Inhibitoren (PDTC, NAC, LY)inkubiert. Die Abbildung zeigt direkt danach die Western Blot Analyse der Hitzeschockprotein (HSP) 90 Expression der Zellen, welche A) in serumfreien bzw. B) in Vollmedium gehalten werden. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.
HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **LY** 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride

Im nochmals gleichen Versuchaufbau gibt Abbildung sechs die basale Expressionsaktivität von HSP 90 der beiden verwendeten humanen Pankreaskarzinomzellen wieder, welche wie bei HSP 27 und HSP 70 hoch ist. Wie auch schon bei den Proteinen HSP 27 und 70, ist in der Western Blot Analyse von HSP 90 nach Inkubation mit NF-κB Inhibitoren kein Rückgang der Expression zu sehen.

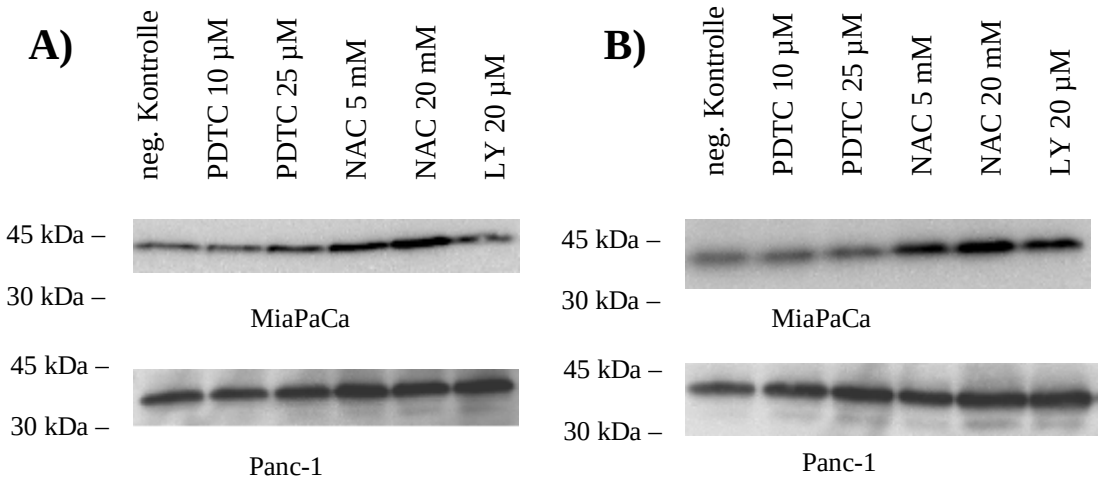


Abb. 7: **Expression von IκBα unter NF-κ B Inhibitoren / Western Blot Analyse**

Menschliche Pankreaskarzinomzellen (*MiaPaCa* und *Panc-1*) werden über Nacht (18 Stunden) mit den NF-κB-Inhibitoren PDTC, NAC, LY inkubiert und im direkten Anschluss eine Western Blot Analyse der IκBα Expression durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Western Blots der Zellen, die A) in serumfreiem Medium bzw. B) in Vollmedium geführt worden sind. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

IκBα Inhibitor of κBα, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **LY** 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride

Um nun den tatsächlichen Einfluss der NF-κB-Inhibitoren auf den Aktivierungsweg von NF-κB bei den verwendeten Zelllinien zu untersuchen, werden nach der 18-stündigen Inkubation Western Blot Analysen der IκBα Expression durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung sieben wieder. IκBα zeigt in der Western Blot Analyse eine deutliche basale Expression. Bei MiaPaCa und Panc-1 Zellen lässt sich diese durch Inkubation mit NAC steigern, was auf eine Inhibition von NF-κB hindeutet.

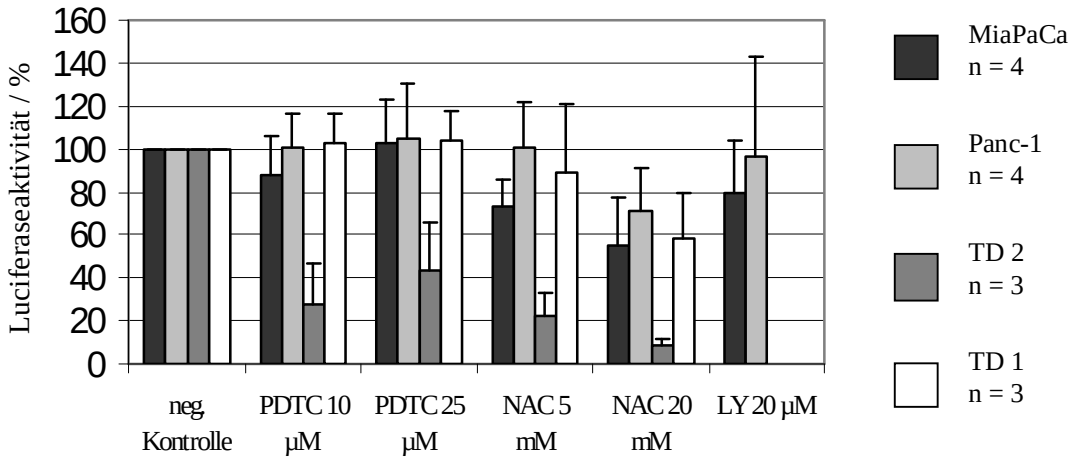


Abb. 8: **Promotoraktivität von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen wird über 24 h Serum entzogen und danach 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) in die Zellen transfiziert. Zwölf Stunden später erfolgt die Inkubation mit NF-κB Inhibitoren (PDTC, NAC, LY) über Nacht (18 Stunden). Dann werden die Zellen für den Luciferase Assay weiterverarbeitet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle.

HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **LY** 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride, **prom.** Promotor

Im Weiteren soll nach der Expression auf Proteinebene die Promotoraktivität von HSP 70 untersucht und in Abbildung acht dargestellt werden. Verwendet werden dazu neben den beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa und Panc-1 die aus einem Pankreaskarzinom der Maus stammenden Zelllinien TD1 und TD2. Die Zellen werden jeweils nach einem 24-stündigen Serumentzug mit 0,5 µg HSP 70 cDNA transfiziert (prom. Luciferase). Zwölf Stunden später erfolgt die 18-stündige Inkubation mit den NF-κB-Inhibitoren PDTC, NAC und LY. Bei TD 2 Zellen lässt sich die HSP 70 Promoteraktivität mittels NF-κB Inhibitoren gut reduzieren. Die anderen Zellreihen (MiaPaCa, Panc-1, TD 1) zeigen im Luciferase Assay bei Inkubation mit fünf mM NAC oder 20 µM LY eine leichte Reduktion der HSP 70 Promotoraktivität. Am deutlichsten ist der Effekt bei Verwendung von 20 mM NAC.

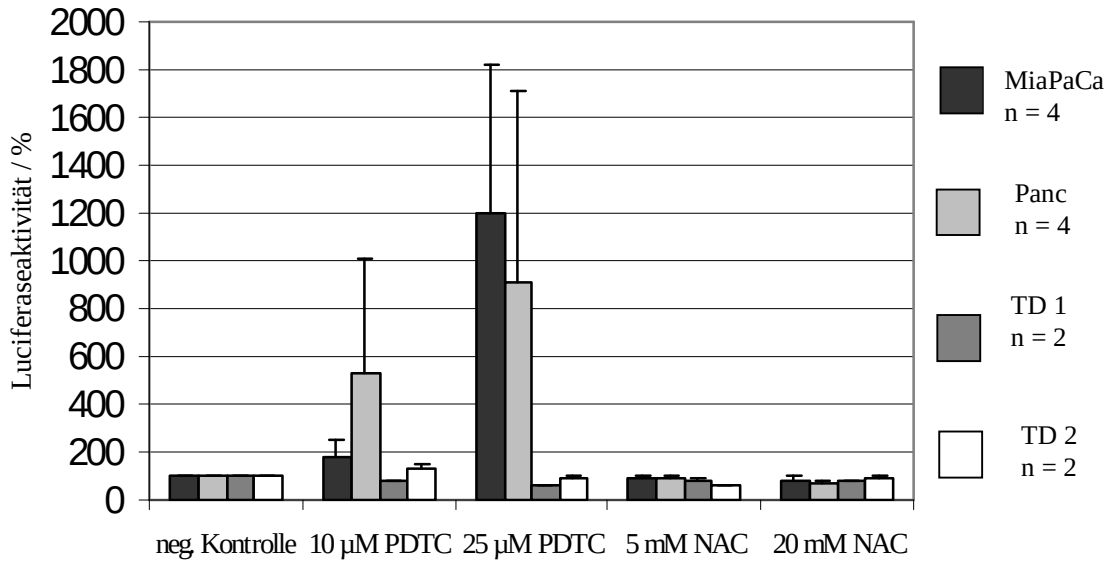


Abb. 9: **Promotoraktivität von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Dual-Luciferase Assay**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen wird Serum über 24 Stunden entzogen und 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) wird in die Zellen transfiziert. Zwölf Stunden später erfolgt die Inkubation mit NF-κB Inhibitoren (PDTC, NAC) über Nacht (18 Stunden). Dann werden die Zellen für den Dual-Luciferase Assay weiterverarbeitet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle.
HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **prom.** Promotor

Unter Verwendung des Dual-Luciferase Assay zeigt sich bei analogem Versuchaufbau in Abbildung neun bei TD 1 Zellen durchweg gute Reduktion der HSP 70 Promotoraktivität unter allen oben aufgeführten Inhibitoren. Auch für TD 2 Zellen ergeben sich Rückgänge der Aktivität je nach Inhibitor um zehn bis dreißig Prozent im Mittel. Bei MiaPaCa und Panc-1 Zellen nimmt bei Anwendung von fünf mM NAC und noch deutlicher bei 20 mM NAC die HSP 70 Promotoraktivität ab. Insgesamt ist die Standartabweichung bis auf die Werte von drei Gruppen mit einzelnen „Ausreißerwerten“ bei den Experimenten der einzelnen Zellreihen geringer ausgefallen als bei den selben Experimenten, die mit dem Luciferase Assay System gemacht werden.

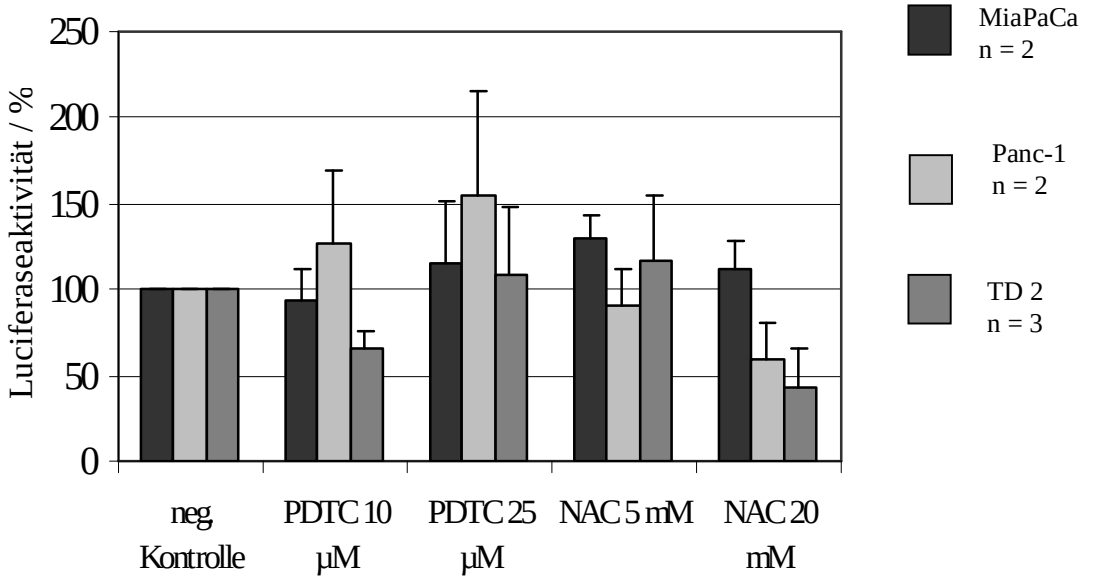


Abb. 10: **Promotoraktivität von Igκ unter NF-κB Inhibitoren / Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen wird Serum über 24 Stunden entzogen und 0,5 µg Igκ (prom. Luciferase) wird in die Zellen transfiziert. Zwölf Stunden später erfolgt die Inkubation mit NF-κB- Inhibitoren (PDTC, NAC) über Nacht (18 Stunden). Dann werden die Zellen für den Luciferase Assay weiterverarbeitet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle.

Igk Immunglobulin κ light chain, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **prom.** Promotor

Als nächstes soll in Abbildung zehn die Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von den NF-κB- Inhibitoren gezeigt werden. Dazu wird bei ansonsten gleicher Versuchsanordnung den Zellen Igκ transfiziert. Im Luciferase Assay für Igκ kann bei MiaPaCa Zellen lediglich bei der Gruppe mit zehn µM PDTC ein allenfalls dezenter Rückgang der Promotoraktivität verzeichnet werden. Bei Panc-1 Zellen steigt die Aktivität unter Verwendung von zehn µM und 25 µM PDTC und sinkt unter Verwendung von fünf mM und 20 mM NAC. 20 mM NAC und auch, weniger ausgeprägt zehn µM PDTC, bewirkten bei TD 2 Zellen eine Reduktion der Aktivität. Die anderen beiden Inhibitoren hingegen führen zu einer, wenn auch geringen, Zunahme der Igκ Promotoraktivität im Luciferase Assay.

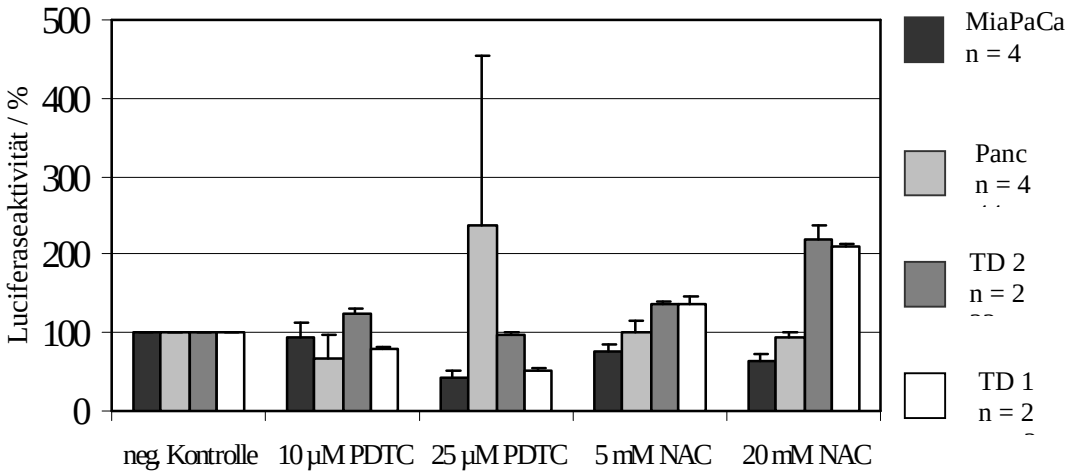


Abb. 11: **Promotoraktivität von Igκ unter NF-κ B Inhibitoren / Dual-Luciferase Assay**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und TD 2 Zellen wird Serum über 24 Stunden entzogen und 0,5 µg Igκ (prom. Luciferase) wird in die Zellen transfiziert. Zwölf Stunden später erfolgt die Inkubation mit NF-κB- Inhibitoren (PDTC, NAC) über Nacht (18 Stunden). Dann werden die Zellen für den Dual-Luciferase Assay weiterverarbeitet. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle.
Igk Immunglobulin κ light chain, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **PDTC** Ammonium-pyrrolidinedithiocarbamate, **NAC** N-acetyl-L-cystein, **prom.** Promotor

Nun wird das gleiche Experiment unter Verwendung des Dual-Luciferase Assay durchgeführt und in Abbildung elf veranschaulicht. Bei der Verwendung dieses Systems sind die Standartabweichungen bei der Mehrzahl der Experimente geringer als bei den Ergebnissen des Luciferase Assay. MiaPaCa Zellen weisen bei Inkubation mit allen NF-κB- Inhibitoren Reduktionen in der Igκ Promotoraktivität auf. Im Gegensatz dazu treten beispielsweise bei TD 1 und TD 2 Zellen bei Verwendung von fünf mM und 20 mM NAC Anstiege der Aktivität auf.

3.3 Expression von HSP 70 unter NF-κB Inhibition und Hitzestimulation

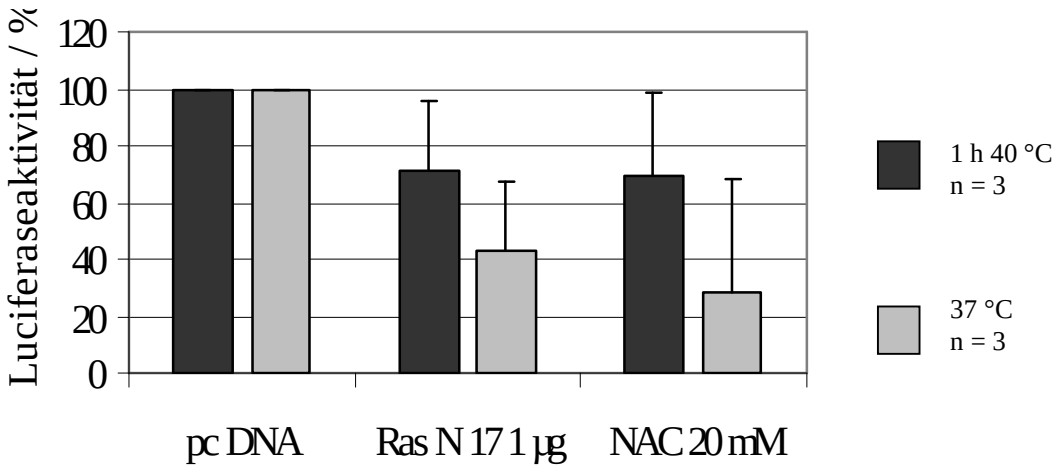


Abb. 12: **Promotoraktivität von HSP 70, +/- Hitze, mit NF-κB Inhibition / Luciferase Assay**
MiaPaCa Zellen werden über 24 Stunden Serum gehungert und mit 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) transfiziert. Zusätzlich werden als weitere Plasmide je ein µg pc-DNA oder ein µg Ras N 17 co-transfiziert. Eine Gruppe wird über Nacht (18 Stunden) mit 20 mM NAC inkubiert. Anschließend wird die eine Hälfte der Zellen für eine Stunde bei 40 °C im Wasserbad inkubiert, während die Kontrollgruppe im Brutschrank belassen wird. Daran schließt sich unter erneutem 24-stündigem Serumentzug die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay an. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).
HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **NAC** N-acetyl-L-cystein, **prom.** Promotor

Nachdem im Vorangegangenen jeweils die Effekte von NF-κB- Inhibitoren und Hitzestimulation auf die Pankreaskarzinomzellen in vitro einzeln betrachtet wurden, soll nun die kombinierte Wirkung von beidem auf die Promotoraktivität von HSP 70 und Igκ studiert werden. Daher werden die Zellen nun sowohl dem Inhibitor NAC bzw. der inhibierenden Wirkung von co-transfiziertem dominant negativem Ras N 17 ausgesetzt, als auch zusätzlichem Hitzestress.

NF-κB Inhibition durch Ras N 17 und 20 mM NAC senkt die HSP 70 Promotoraktivität in MiaPaCa Zellen. Eine Hitzestimulation von 40 °C über eine Stunde wirkt dieser Inhibition entgegen, so dass die erhitzten Zellen wieder mehr HSP 70 Promotoraktivität zeigen (Abbildung zwölf).

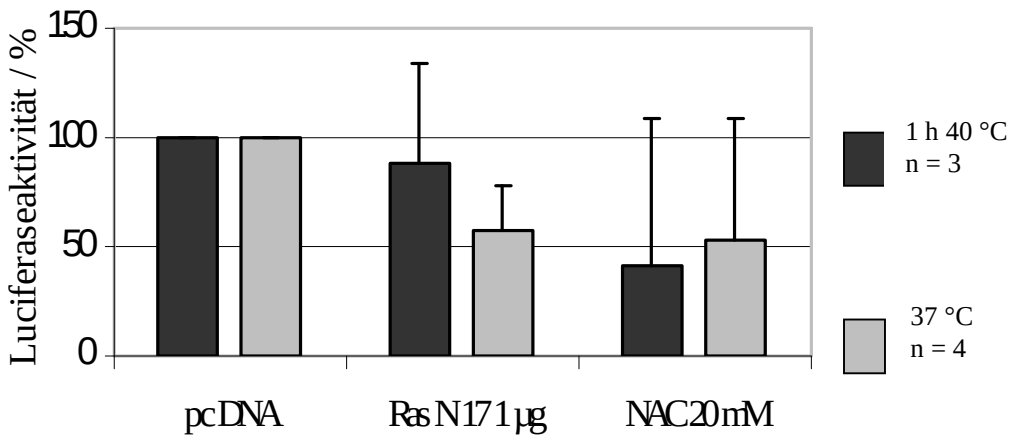


Abb. 13: **Promotoraktivität von HSP 70, +/- Hitze, mit NF-κB Inhibiton / Luciferase Assay**

Panc-1 Zellen werden über 24 Stunden Serum gehungert und mit 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) transfiziert. Zusätzlich werden als weitere Plasmide je ein µg pc-DNA oder ein µg Ras N 17 co-transfiziert. Eine Gruppe wird über Nacht (18 Stunden) mit 20 mM NAC inkubiert. Anschließend wird die eine Hälfte der Zellen für eine Stunde bei 40 °C im Wasserbad inkubiert, während die Kontrollgruppe im Brutschrank belassen wird. Daran schließt sich unter erneutem 24-stündigem Serumentzug die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay an. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

HSP Hitzeschockprotein, **NF-κB** κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **NAC** N-acetyl-L-cystein, **prom.** Promotor

Auch in Panc-1 Zellen erzielt die NF-κB Inhibition durch Ras N 17 und 20 mM NAC eine Inhibition der HSP 70 Promotoraktivität. In Abbildung 13 ist dies zu sehen. Nach Inkubation einer Zellgruppe im 40 °C-Wasserbad erhöht sich die Promotoraktivität trotz NF-κB Inhibition zwar, bleibt aber immer noch unterhalb der Aktivität der Negativkontrolle mit pc-DNA.

3.4 Einfluss von dominant negativen IkB- kinasen (IKKs) auf die HSP 70 Expression

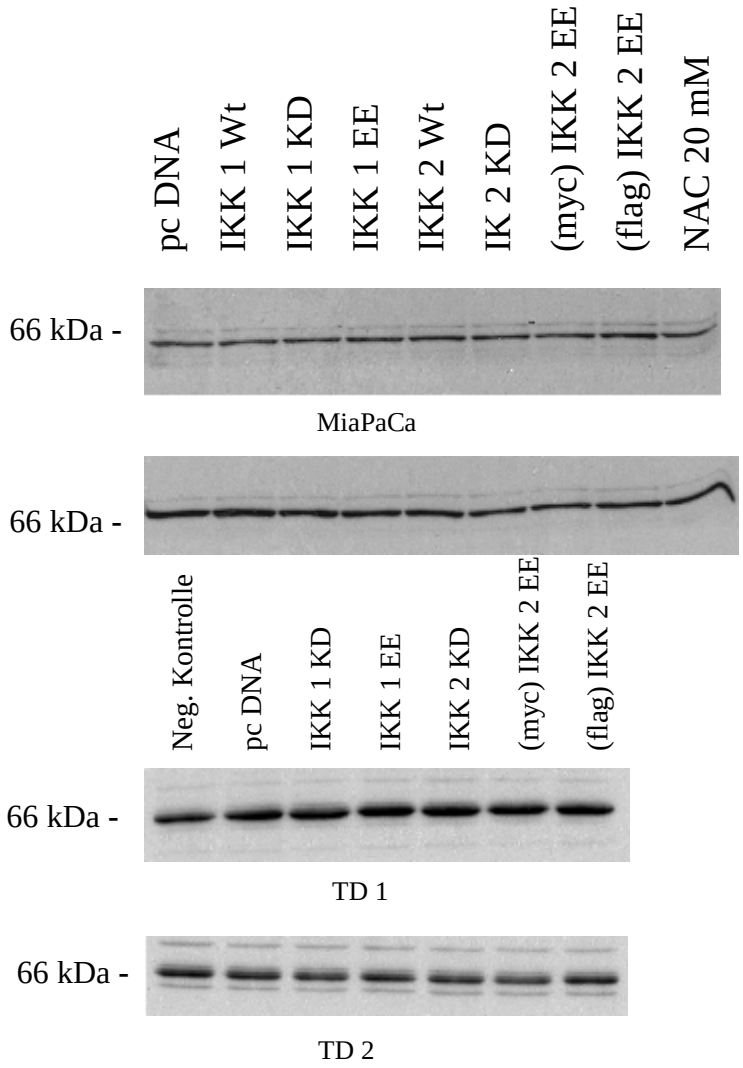


Abb. 14: **Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Western Blot Analyse**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden über 24 Stunden Serum gehungert, mit je ein µg verschiedener Versionen von IKK Plasmiden transfiziert bzw. über 18 Stunden mit 20 mM NAC inkubiert. 24 Stunden später erfolgt im Western Blot eine Analyse der Hitzeschockprotein (HSP) 70 Expression. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.
HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **EE** konstitutiv aktiv, **NAC** N-acetyl-L-cystein

Im Weiteren soll in Abbildung 14 durch Transfektion verschiedener IKK-Plasmide der Einfluss von IKK auf die Expression von HSP 70 studiert werden. Im Western Blot sind bei allen vier verwendeten Zelllinien keine Abhängigkeiten der HSP 70 Expression von IKK zu erkennen. Weder ein Ausschalten von IKK 1 oder IKK 2 durch Transfektion von

IKK 1 KD oder IKK 2 KD noch die Transfektion von aktivem IKK 1 EE oder IKK 2 EE verändern etwas an der Expression von HSP 70 im Vergleich zu den Negativkontrollen mit pc-DNA oder IKK 1 und 2 Wildtyp. Auch für die Gruppe mit 20 mM NAC kann im Western Blot wiederholt keine Expressionsveränderung von HSP 70 nachgewiesen werden.

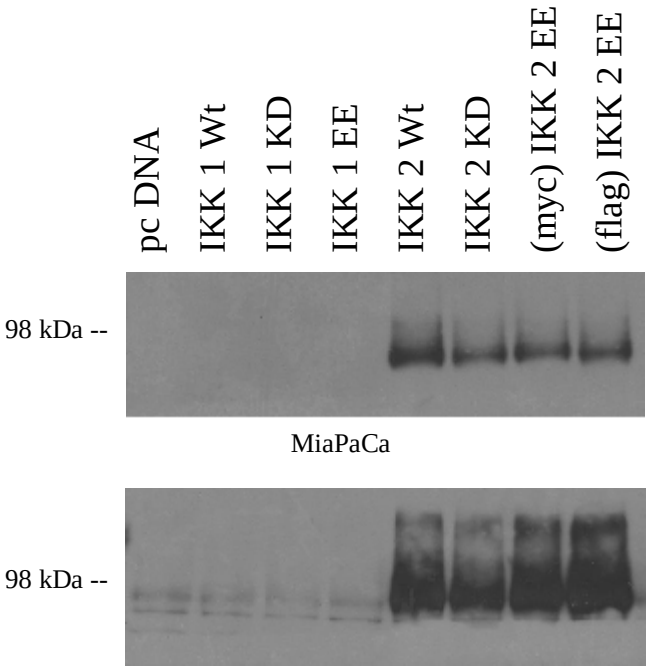


Abb. 15: **Expression von IKK 1/2 in Abhängingkeit von IKK / Western Blot Analyse**
MiaPaCa und *Panc-1* Zellen werden über 24 Stunden Serum gehungert und mit je einem µg verschiedener Versionen von IKK Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später wird im Western Blot eine Analyse der IKK 1/2 Expression durchgeführt. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.
IKK Inhibitor of κB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **EE** konstitutiv aktiv

Im IKK 1/2 Western Blot erfolgt der Nachweis der transfizierten Plasmide in MiaPaCa und Panc-1 Zellen (Abbildung 15). Dabei stellt sich heraus, dass der Antikörper möglicherweise eine wesentlich größere Affinität zu IKK 2 hat. Für IKK 1 stellen sich die Banden schwächer dar, obwohl dieselbe Menge Plasmid transfiziert worden war.

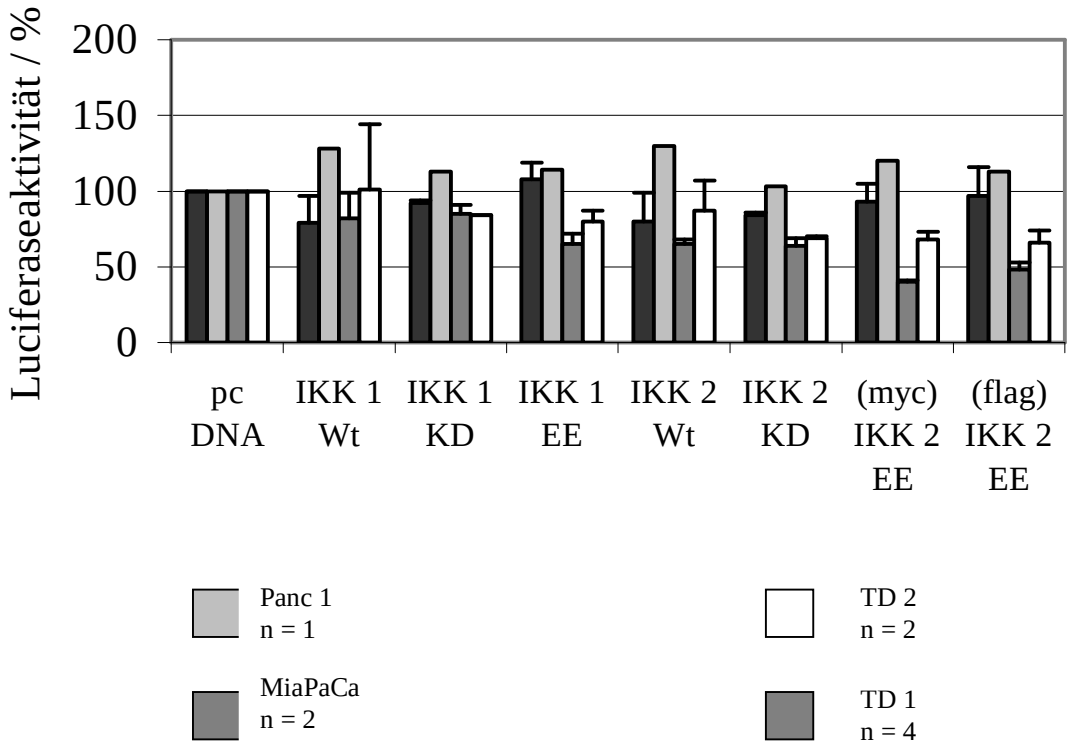


Abb. 16: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Dual-Luciferase Assay**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und jeweils 0,5 µg verschiedener IKK Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).
HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **EE** konstitutiv aktiv, **prom.** Promotor

Nachdem der Einfluss von IKK auf die HSP 70 Expression auf Proteinlevel im Western Blot untersucht wurde, steht nun als nächster Schritt die Untersuchung auf Promotorebene an. Der in Abbildung 16 aufgeführte Dual-Luciferase Assay zeigt einen geringfügigen Rückgang der HSP 70 Promotoraktivität bei Transfektion von funktionslosem IKK 1 KD oder 2 KD. Jedoch kann für das aktive IKK 1 und 2 EE kein einheitlicher Anstieg der HSP 70 Promotoraktivität erreicht werden.

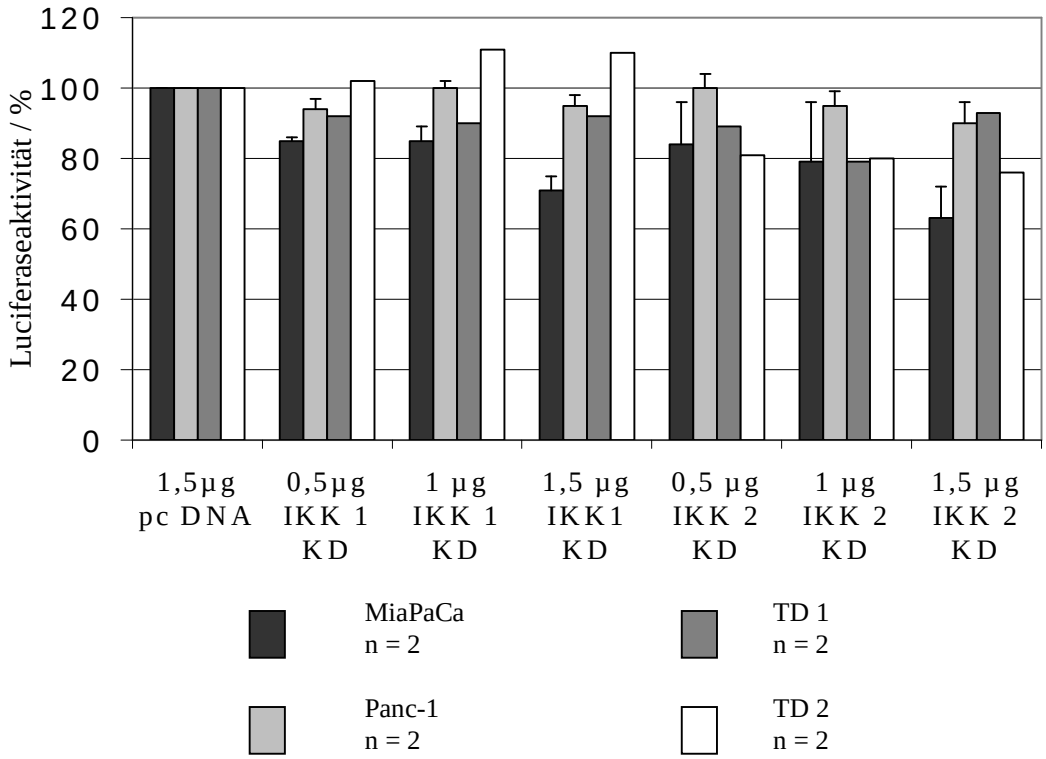


Abb. 17: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg) von IKK 1 KD und IKK 2 KD transfiziert. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **KD** kinase dead, **prom.** Promotor

Im Dual-Luciferase Assay zeigt sich eine dezente Konzentrationsabhängigkeit von transfiziertem, funktionslosem IKK KD und der HSP 70 Promotoraktivität. Dies lässt sich in Abbildung 17 erkennen. Mit steigenden Konzentrationen von IKK 1 und IKK 2 sinkt die ermittelte Promotoraktivität von HSP 70.

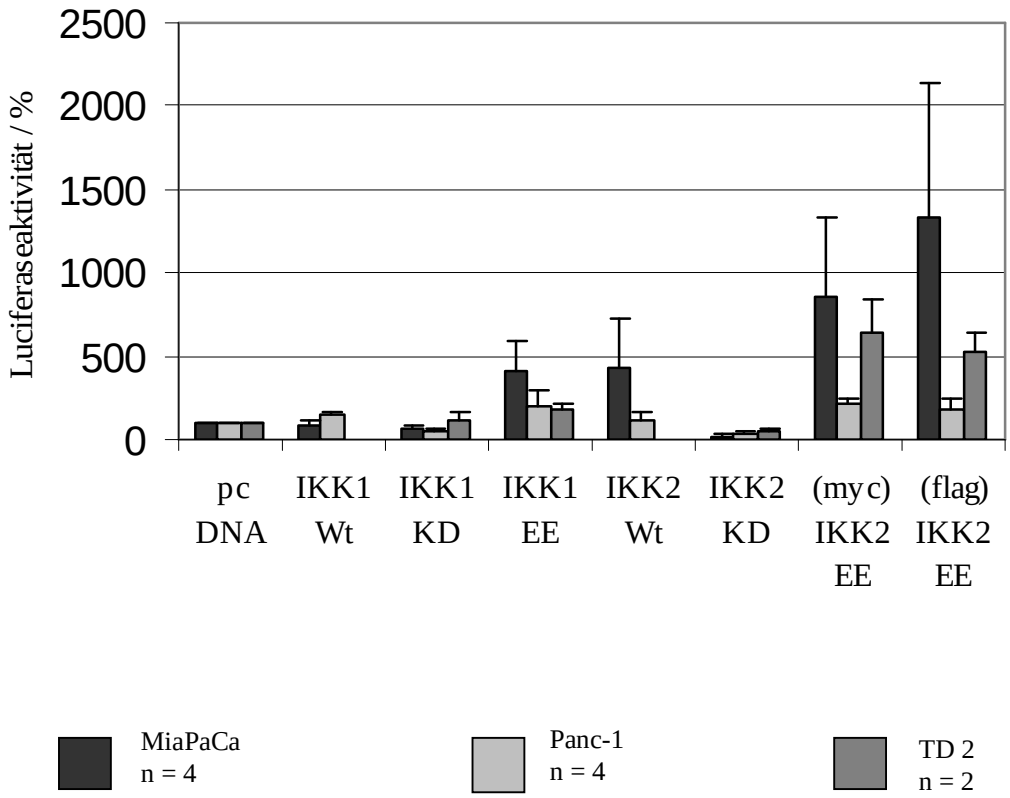


Abb. 18: **Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von IKK / Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,5 µg Igκ (prom. Luciferase) und jeweils 0,5 µg verschiedener IKK Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin κ light chain, **IKK** Inhibitor of kB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **EE** konstitutiv aktiv, **prom.** Promotor

Analog wird, gewissermassen als Kontrollexperiment, die Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von co-transfiziertem IKK mittels Luciferase Assay gemessen und in Abbildung 18 dargestellt. Die Promotoraktivität von Igκ steigt erwartungsgemäss bei Zellen an, denen IKK 1 EE oder IKK 2 EE A 10 oder flag IKK 2 EE transfiziert worden ist, sie sinkt bei Transfektion von funktionslosem IKK 1 KD und IKK 2 KD.

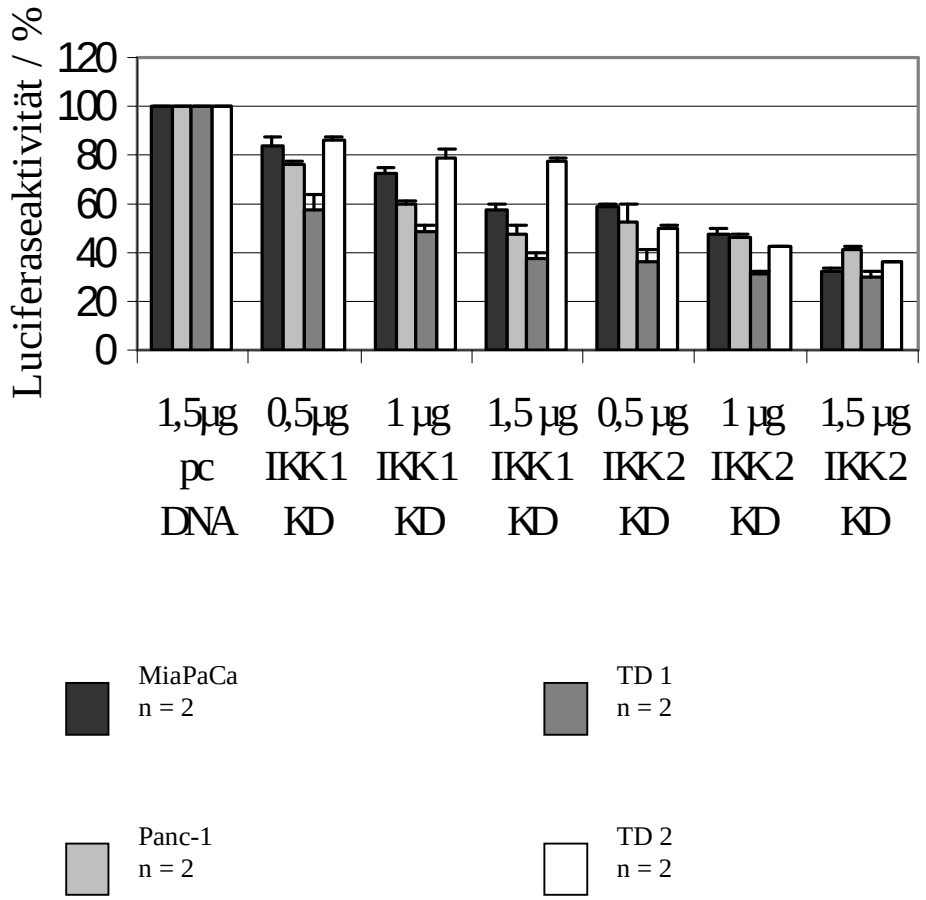


Abb. 19: **Promotoraktivität von Ig**k **in Abhängigkeit von IKK / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg Igκ (prom. Luciferase) und verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg) von IKK 1 KD und IKK 2 KD transfiziert. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin κ light chain, **IKK** Inhibitor of kB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **KD** kinase dead, **prom.** Promotor

.

Im Dual-Luciferase Assay zeigt sich dann noch eine klare Dosisabhängigkeit von IKK 1 und 2 KD und der Promotoraktivität von Igκ. Mit steigender Konzentration der IKK KD sinkt die Aktivität. Dargelegt werden diese Zusammenhänge in Abbildung 19.

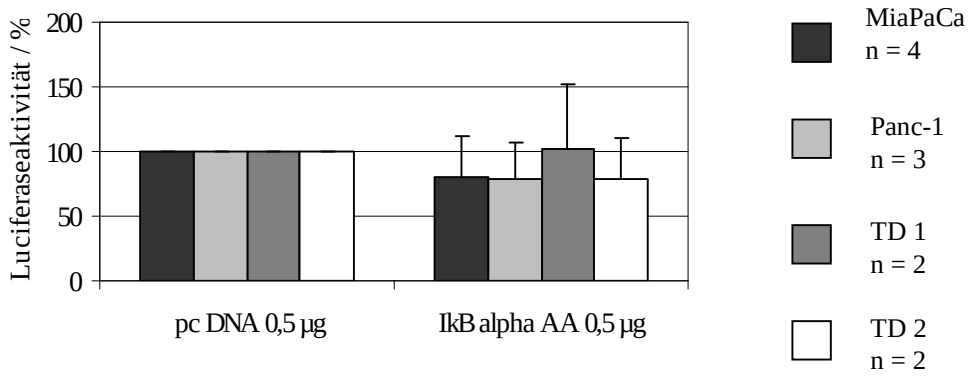


Abb. 20: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IκBα / Dual-Luciferase Assay**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und jeweils 0,5 µg IκBα AA transfiziert. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).
HSP Hitzeschockprotein, **IκBα** Inhibitor of κBα, **IκBα AA** „NF-κB-Superinhibitor", **DNA** desoxyribonucleic acid, **prom.** Promotor

Als nächstes wird die HSP 70 Promotoraktivität in Abhängigkeit von IκBα mittels Dual-Luciferase Assay bestimmt und in Abbildung 20 präsentiert. Dazu wird den Zellen ein sogenannter „NF-κB-Superinhibitor" (IκBα AA) co-transfiziert. Die HSP 70 Promotoraktivität sinkt im Vergleich zur Negativkontrollgruppe, welcher pc-DNA transfiziert wurde, wenn auf diese Weise NF-κB inhibiert wird.

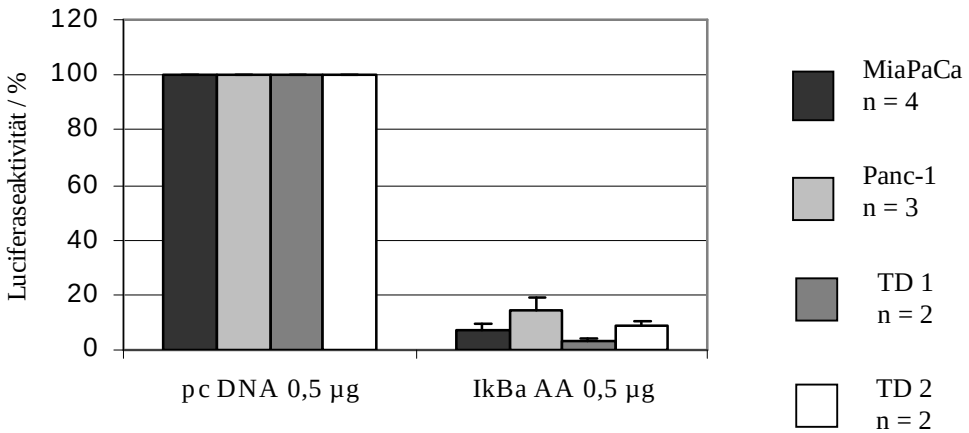


Abb. 21: **Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von IκBα / Dual-Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg Igκ (prom. Luciferase) und jeweils 0,5 µg IκBα AA transfiziert. Weitere 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin κ light chain, **IκBα** Inhibitor of κBα, **IκBα AA** „NF-κB-Superinhibitor", **DNA** desoxyribonucleic acid, **prom.** Promotor

Im Kontrollexperiment wird wiederum die Igκ Promotoraktivität gemessen (Abbildung 21). Bei Transfektion von 0,5 µg IκBα AA (NF-κB – „Superinhibitor") in die Zellen sinkt die Promotoraktivität von Igκ bei allen vier Zelllinien auf ein basales Level.

3.5 HSP 70 Expression unter Ras

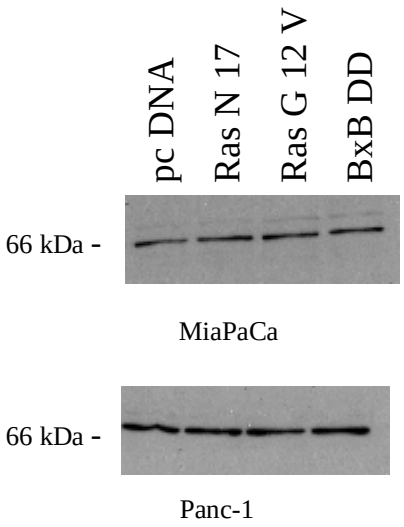


Abb. 22: **Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen wird über 24 Stunden Serum entzogen, dann werden die Zellen mit je einem µg pc-DNA, Ras N 17, Ras G 12 V bzw. BxB DD Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen für eine Western Blot Analyse der HSP 70 Expression. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.
HSP Hitzeschockprotein, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB

Nachdem im Vorangegangenen der Einfluss von NF-κB auf HSP 70 beleuchtet wurde, soll nun mit Abbildung 22 untersucht werden, ob Ras seinerseits die HSP 70 Expression beeinflusst. Dazu werden zunächst humane und Mäuse- Pankreaskarzinomzellen in vitro mit verschiedenen Ras-Plasmiden transfiziert. MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und TD 2 Zellen zeigen im Western Blot keine Unterschiede in der HSP 70 Expression nach Transfektion mit Ras N 17 (inaktives Ras), Ras G 12 V (aktives Ras), BxB DD (aktives Raf) im Vergleich zu Zellen, die pc-DNA transfiziert bekamen.

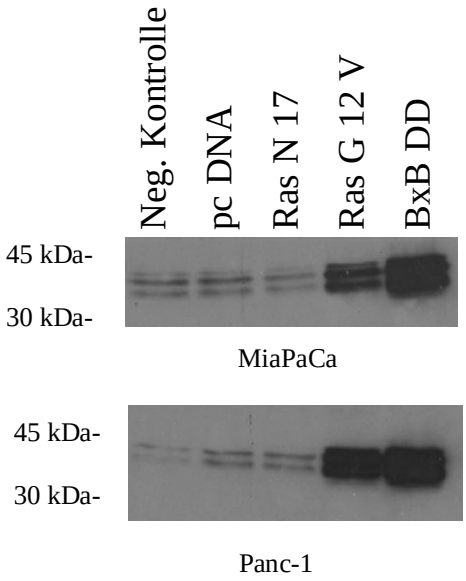


Abb. 23: **Expression von pERK in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse**
MiaPaCa und *Panc-1* Zellen wird über 24 Stunden Serum entzogen, dann werden die Zellen mit je einem µg pc-DNA, Ras N 17, Ras G 12 V bzw. BxB DD Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen für eine Western Blot Analyse der pERK Expression. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.

pERK phospho-extracellular-signal regulated kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB

Um die erfolgte Transfektion und auch die Funktionsfähigkeit der transfizierten Plasmide zu überprüfen, wird eine Western Blot Analyse von pERK, welches als MAP Kinase der Ras-Signalkaskade angehört, durchgeführt (Abbildung 23). Im Western Blot der MiaPaCa und Panc-1 Zellen resultiert die Transfektion von Ras N 17 in einem Rückgang von Phospho-ERK. Die Transfektion von Ras G 12 V hingegen bewirkt einen Anstieg der Phospho-ERK Expression um ein Vielfaches, wird jedoch von der Expression nach Transfektion von BxB DD noch übertroffen. Die transfizierten Plasmide zeigen also regelrechte Funktion.

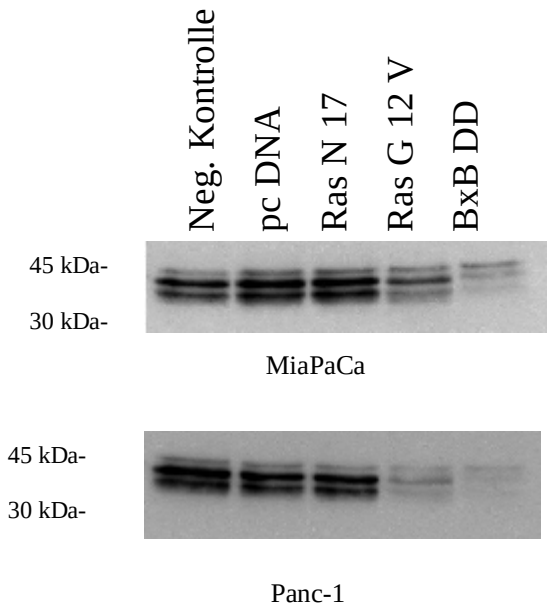


Abb. 24: **Expression von ERK 1 und 2 in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse**
MiaPaCa und *Panc-1* Zellen wird über 24 Stunden Serum entzogen, dann werden die Zellen mit je einem µg pc-DNA, Ras N 17, Ras G 12 V bzw. BxB DD Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen für eine Western Blot Analyse der ERK 1 und 2 Expression. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.
ERK extracellular-signal regulated kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB

ERK 1 und 2 sind als dephosphorylierte Formen ebenfalls der Ras-Signalkaskade zugehörig. Die Expression von ERK 1 und 2 sinkt in der Western Blot Analyse sowohl bei MiaPaCa als auch bei Panc-1 Zellen, wenn ihnen zuvor Ras G 12 V transfiziert wird. In noch höherem Maße ist dieser Expressionsrückgang in Abbildung 24 bei Transfektion von BxB DD zu beobachten.

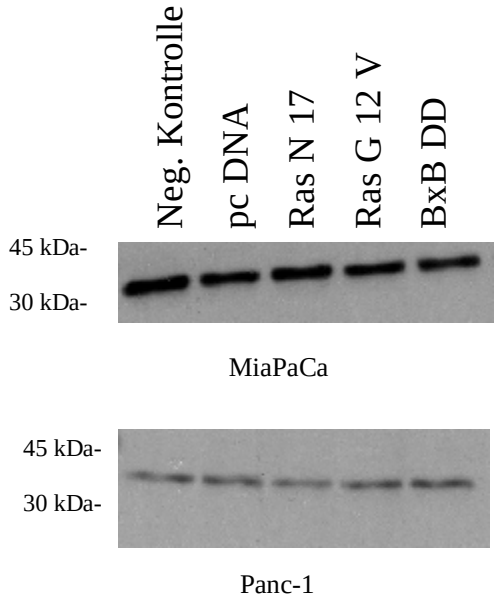


Abb. 25: **Expression von IκBα in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse**
MiaPaCa und *Panc-1* Zellen wird über 24 Stunden Serum entzogen, dann werden die Zellen mit je einem µg pc-DNA, Ras N 17, Ras G 12 V bzw. BxB DD Plasmiden transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen für eine Western Blot Analyse der IκBα Expression. Die Position der Markerbanden ist gekennzeichnet.
IκBα Inhibitor of κBα, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB

Im nächsten Schritt soll der Einfluss von Ras auf NF-κB überprüft werden. Im Western Blot in Abbildung 25 können bei MiaPaCa und Panc-1 Zellen keine Unterschiede in der Expression von IκBα in Abhängigkeit von verschiedenen Ras-Plasmiden festgestellt werden.

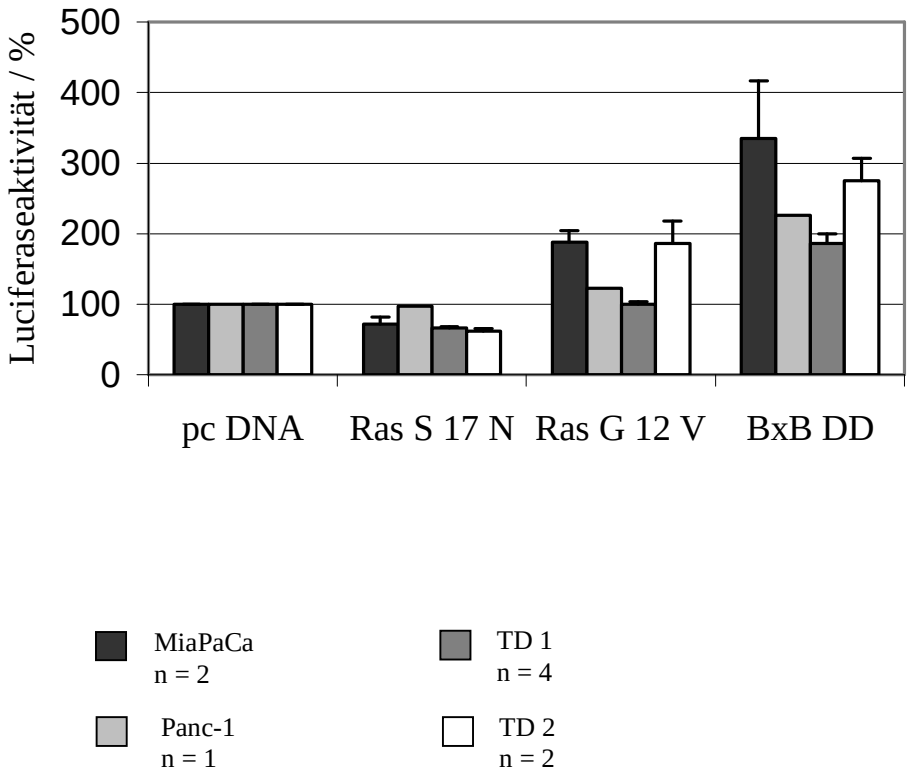


Abb. 26: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Dual-Luciferase Assay**
MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und jeweils 0,5 µg verschiedener Ras Plasmide transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).
HSP Hitzeschockprotein, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Wiederum folgt den Untersuchungen auf dem Level der Proteinexpression die Untersuchung auf Ebene der Promotoraktivität. Es wird im Folgenden in Abbildung 26 die Promotoraktivität von HSP 70 beobachtet und ob sie durch co-transfizierte verschiedene Ras-Plasmide Änderung erfährt. Im Dual-Luciferase Assay sinkt bei allen vier Zellreihen die Promotoraktivität von HSP 70 wenn den Zellen außer HSP 70 noch Ras N 17 co-transfiziert wurde. Eine Transfektion von Ras G 12 V hingegen bewirkt einen HSP 70 Promotoranstieg um ein Vielfaches, welcher bei Verwendung von BxB DD sogar noch gesteigert wird.

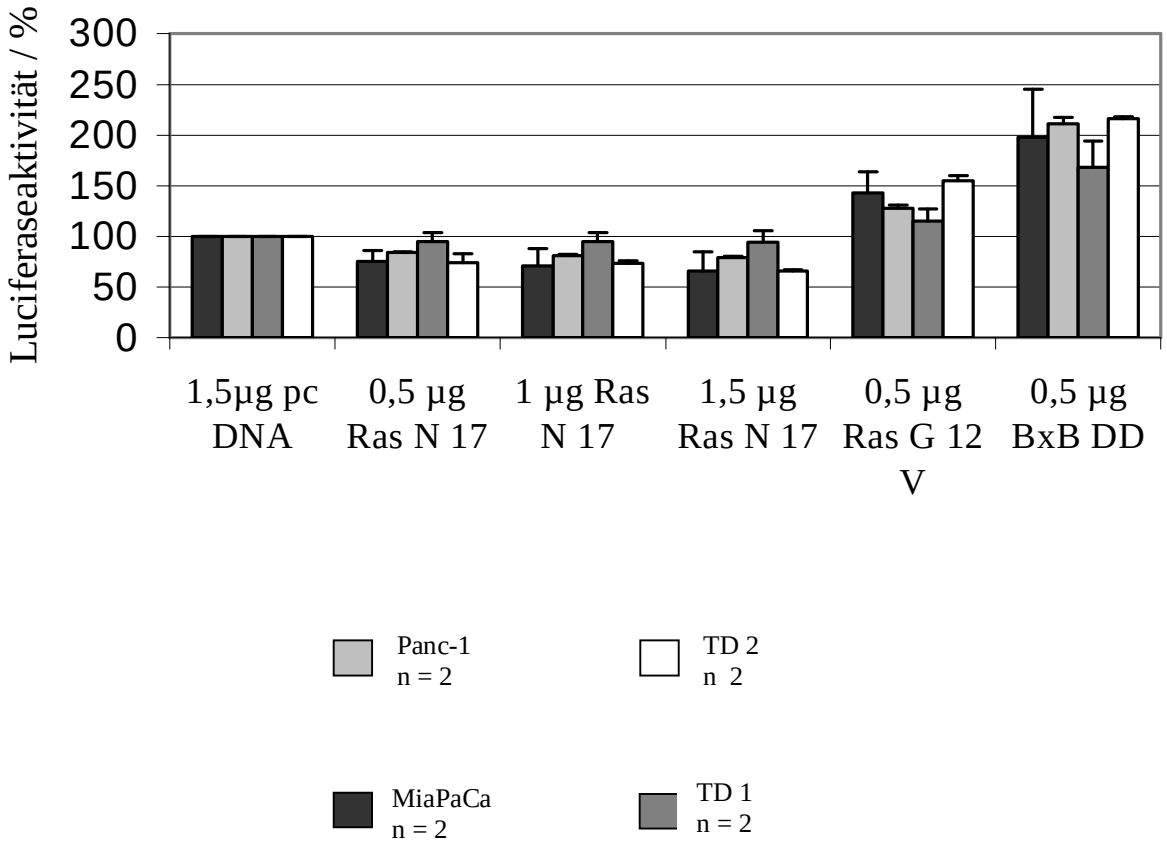


Abb. 27: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Dosiskurve / Dual-Luciferase-Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg) von Ras N 17 transfiziert. Ras G 12 V und BxB DD werden in einer Konzentration von 0,5 µg transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

HSP Hitzeschockprotein, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Im Dual-Luciferase Assay zeigt sich eine leichte Konzentrationsabhängigkeit des Rückgangs der HSP 70- Promotoraktivität unter Ras N 17. Mit steigender Konzentration des Plasmids sinkt die ermittelte HSP 70 Promotoraktivität. Unter Transfektion von Ras G 12 V und BxB DD steigt die HSP 70 Promotoraktivität erneut und ist in Abbildung 27 zu sehen.

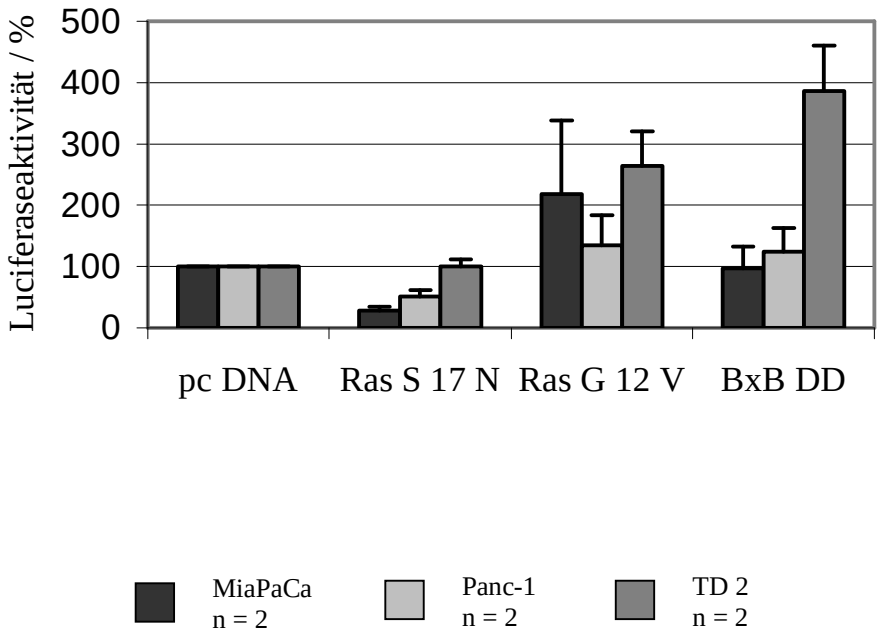


Abb. 28: **Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von Ras / Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,5 µg Igκ (prom. Luciferase) und jeweils einem µg verschiedener Ras Plasmide transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin k light chain, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Interessant scheint als nächstes, ob sich neben der HSP 70- auch die Igκ– Promotoraktivität durch co-transfiziertes Ras beeinflussen lässt. Im Luciferase Assay manifestiert sich bei allen vier Zelllinien ein Rückgang von Igκ, wenn zuvor Ras N 17 transfiziert worden ist. Es lassen sich Anstiege der Promotoraktivität von Igκ nachweisen, wenn Ras G 12 V und BxB DD transfiziert werden (Abbildung 28).

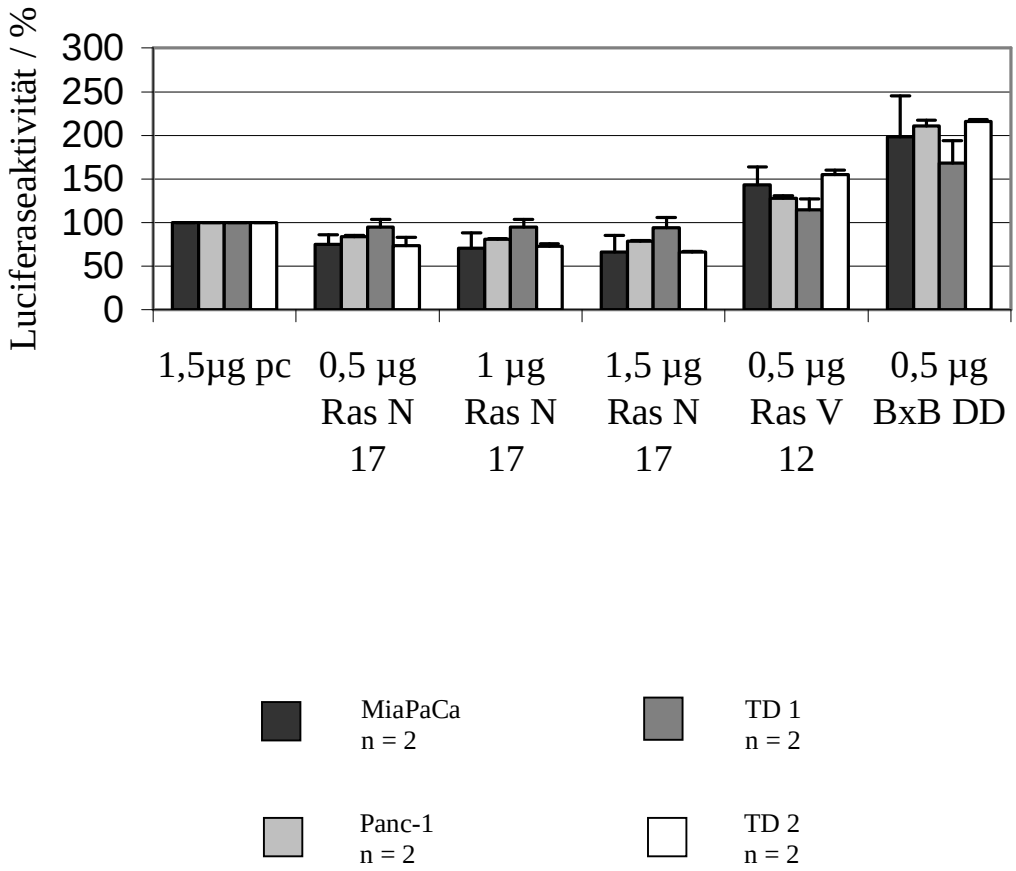


Abb. 29: **Promotoraktivität von Igk in Abhängigkeit von Ras / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay**

MiaPaCa, Panc-1, TD 1 und *TD 2* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,1 µg HSP 70 (prom. Luciferase) und verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg) von Ras N 17 transfiziert. Ras G 12 V und BxB DD werden in einer Konzentration von 0,5 µg transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Dual-Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin k light chain, **DNA** desoxyribonucleic acid, **Ras N 17** dominant negatives Ras (rat sarcoma), **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras, **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Die Promotoraktivität von Igκ zeigt in Abbildung 29 eine leichte Dosisabhängigkeit von co-transfiziertem Ras N 17. Ras G 12 V und BxB DD hingegen bewirken einen Anstieg von Igκ.

3.6 Einfluss von Ras in Kombination mit Inhibiting kappa B kinasen (IKKs) auf die HSP 70 Expression

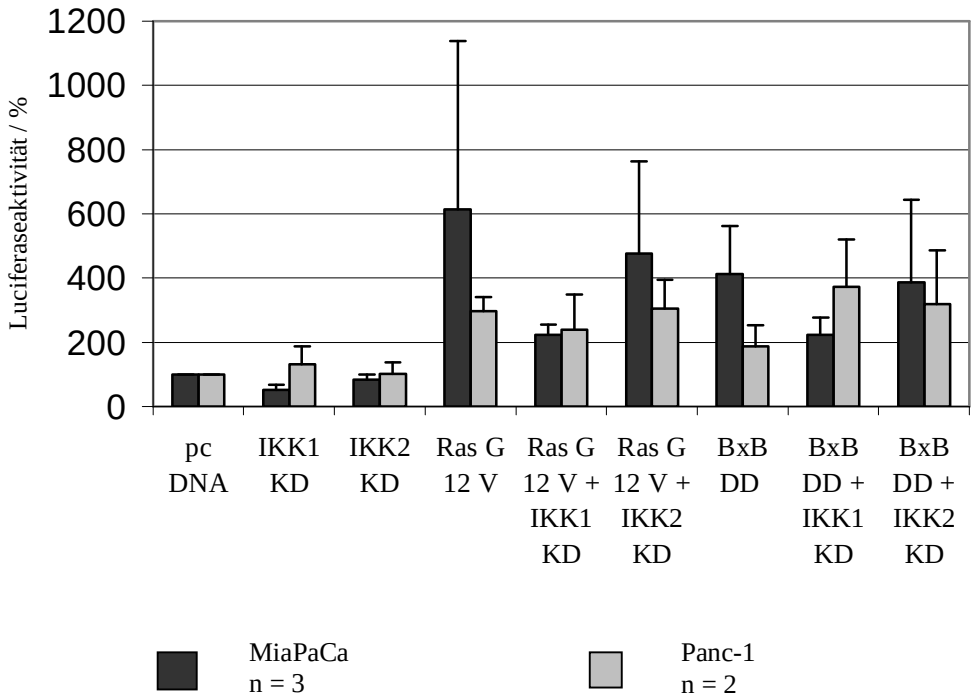


Abb. 30: **Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras und Inhibiting kappa B kinases / Luciferase Assay**

MiaPaCa und *Panc-1* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,5 µg HSP 70 (prom. Luciferase) transfiziert. Dazu werden jeweils 0,5 µg verschiedener Ras Plasmide, 0,5 µg IKK 1 KD oder 0,5 µg IKK 2 KD bzw. eine Kombination dieser co-transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

HSP Hitzeschockprotein, **DNA** desoxyribonucleic acid, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **KD** kinase dead, **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras (rat sarcoma), **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Nachdem die Effekte von Ras und NF-κB auf die HSP 70 Promotoraktivität jeweils einzeln untersucht sind, soll im Folgenden untersucht werden, ob die aktivierende Wirkung von Ras durch NF-κB- Inhibition über „kinase dead“ (dominant negative) IKK moduliert werden kann. Sowohl bei MiaPaCa als auch bei Panc-1 Zellen manifestiert sich im Luciferase Assay ein Rückgang der Promotoraktivität von HSP 70, wenn ihnen IKK 1 KD oder IKK 2 KD transfiziert wird. Im Unterschied dazu steigt die Promotoraktivität des Proteins wenn Ras G 12 V in die Zelle transfiziert wird. Dieser Anstieg läßt sich jedoch

interessanterweise durch gleichzeitige Anwesenheit von transfiziertem IKK 1 KD oder IKK 2 KD in den Zellen wieder reduzieren. Auch der HSP 70 Expressionsanstieg unter BxB DD sinkt unter Co-transfektion von IKK 1 KD oder IKK 2 KD.

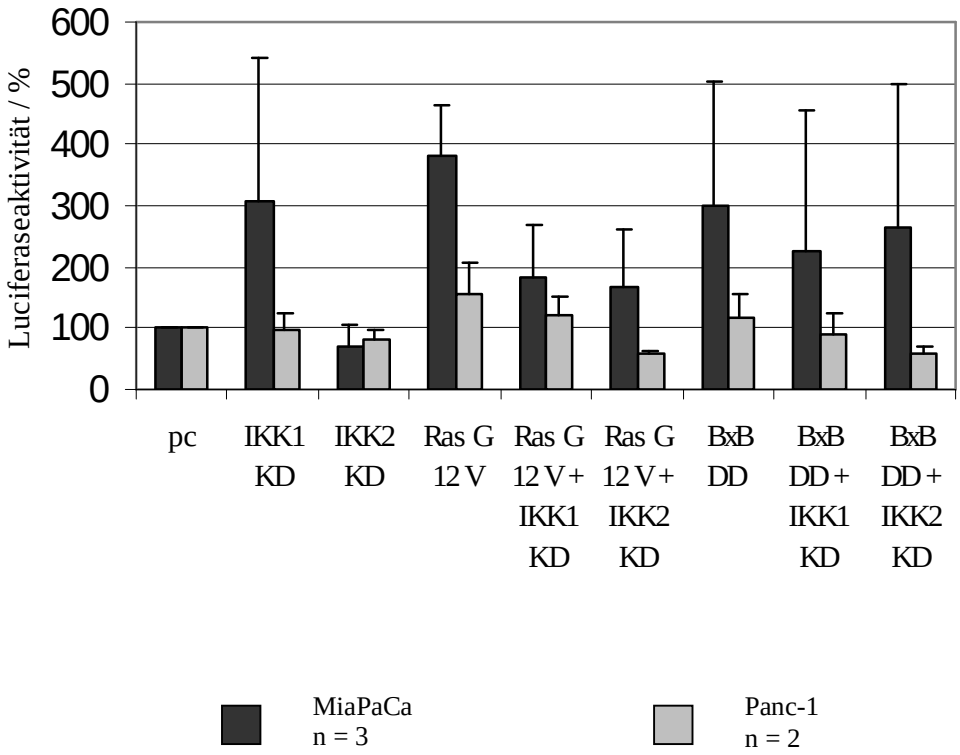


Abb. 31: **Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von Ras und Inhibiting kappa B kinases / Luciferase Assay**

MiaPaCa und *Panc-1* Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit 0,5 µg Igκ (prom. Luciferase) transfiziert. Dazu werden jeweils 0,5 µg verschiedener Ras Plasmide, 0,5 µg IKK 1 KD oder 0,5 µg IKK 2 KD bzw. eine Kombination dieser co-transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zum Luciferase Assay. Die Abbildung zeigt den Mittelwert +/- Standartabweichung der Luciferaseaktivität in prozentualem Bezug zur Negativkontrolle (pc DNA).

Igκ Immunglobulin k light chain, **DNA** desoxyribonucleic acid, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **KD** kinase dead, **Ras G 12 V** konstitutiv aktives Ras (Rat sarcoma), **BxB DD** konstitutiv aktives BxB, **prom.** Promotor

Analog zum vorangegangenen Experiment wird nun die Promotoraktivität von Igκ geprüft. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob die beobachteten Veränderungen in der HSP 70-Promotoraktivität sich in gleicher Weise auch bei NF-κB finden lassen. Die Promotoraktivität von Igκ steigt im Luciferase Assay nach Transfektion von Ras G 12 V

und BxB DD. Der Anstieg läßt sich jedoch wiederum durch Co-transfektion von IKK 1 KD oder IKK 2 KD in die Zellen reduzieren (Abbildung 31).

3.7 Expression von HSP 70 in MiaPaCa rtTA Zellen

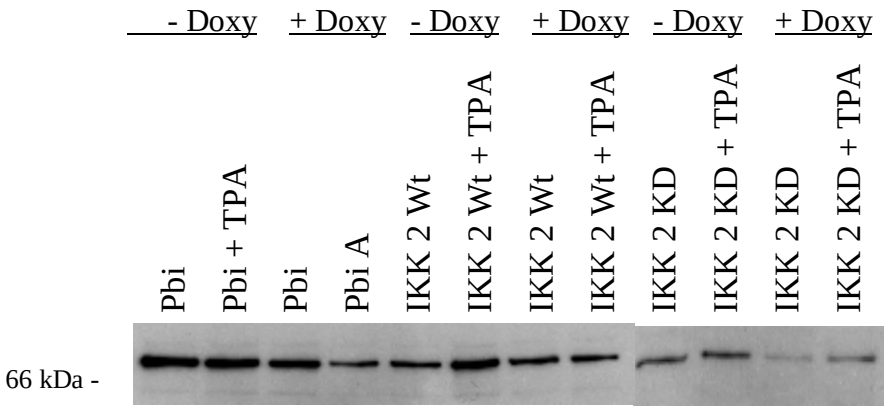


Abb. 32: **Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases und TPA / Western Blot**

MiaPaCa rtTA Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit jeweils 1 µg Pbi, IKK 2 Wt und IKK 2 KD transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Inkubation mit Doxycyclin (+) oder das Belassen als Negativkontrolle ohne Doxycyclin (-). Zeitgleich mit der Inkubation mit Doxycyclin wird jeweils einer der Doppelansätze mit TPA stimuliert. 48 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zur HSP 70 Western Blot Analyse, deren Ergebnis die Abbildung zeigt. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.

HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **TPA** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, **PBI** bidirectional promotor, **Doxy** Doxycyclin

In den Western Blot Analysen ließen sich bislang die auf Promotorebene detektierten Modulationen von HSP 70 nicht sicher nachweisen. Es soll daher ein Versuch mit sogenannten induzierbaren menschlichen Pankreaskarzinomzellen erfolgen. Diese Zellen ermöglichen es, durch Inkubation mit Doxycyclin das jeweils transfizierte Plasmid zu induzieren und damit zur Genexpression zu aktivieren. Im Western Blot zeigt sich dann bei induzierbaren MiaPaCa Zellen (MiaPaCa rtTA), die mit IKK 2 KD transfiziert werden, ein Rückgang der HSP 70 Expression, wenn die Genexpression von IKK 2 KD mittels Doxycyclin induziert wird. Eine Inkubation mit NF-κB aktivierendem TPA verstärkt ihrerseits in Kombination mit IKK 2 KD die HSP 70 Expression (Abbildung 32).

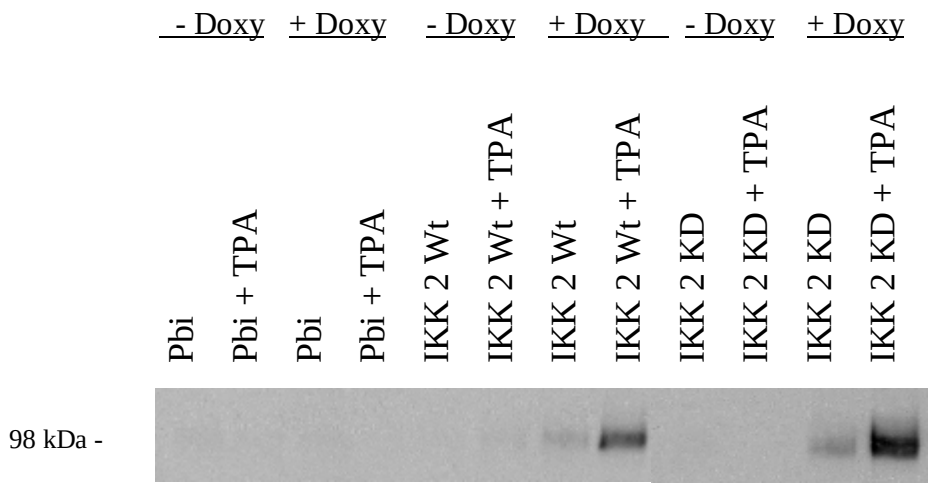


Abb. 33: **Expression von IKK 1/2 in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases und TPA / Western Blot**

MiaPaCa rtTA Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit jeweils 1 µg Pbi, IKK 2 Wt und IKK 2 KD transfiziert. 24 Stunden später erfolgt die Inkubation mit Doxycyclin (+) oder das Belassen als Negativkontrolle ohne Doxycyclin (-). Zeitgleich mit der Inkubation mit Doxycyclin wird jeweils einer der Doppelansätze mit TPA stimuliert. 48 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zur IKK 1/2 Western Blot Analyse, deren Ergebnis die Abbildung zeigt. Die Position der Markerbande ist gekennzeichnet.

IKK Inhibitor of κB kinase, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead, **TPA** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, **PBI** bidirectional promotor, **Doxy** Doxycyclin

Als Kontrolle kann das transfizierte und mit Doxycyclin induzierte IKK 2 in den induzierbaren MiaPaCa rtTA Zellen mittels Western Blot nachgewiesen werden, sowohl die Wildtyp- als auch die KD-Form. Das Signal verstärkt sich im Western Blot, wie in Abbildung 33 dargestellt, zusätzlich, wenn die Zellen zuvor mit TPA inkubiert worden sind.

3.8 Detektion von HSP 70 Expression mittels Northern Blot

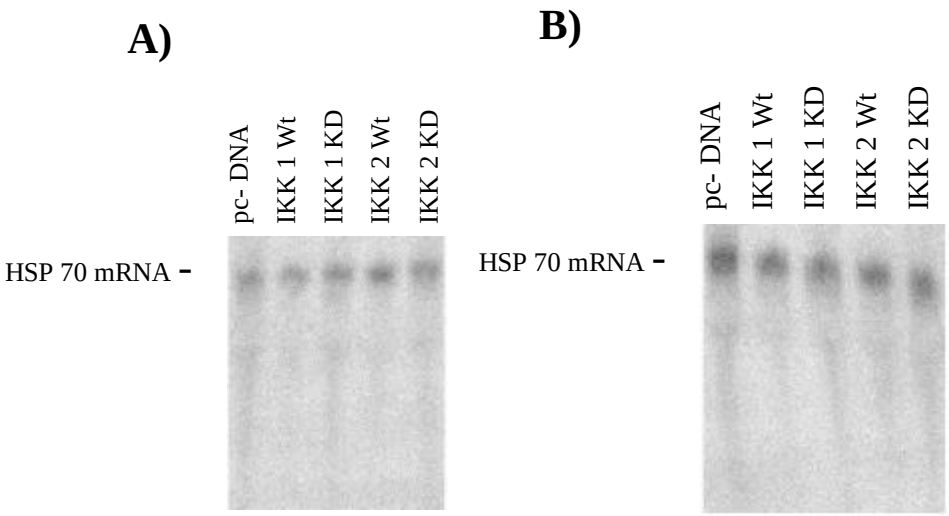


Abb. 34: **HSP 70 mRNA in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases / Northern Blot Analyse**

A) *MiaPaCa* und B) *Panc-1* Zellen werden nach 24- stündigem Serumentzug mit jeweils 4 µg IKK1 Wt, IKK 1 KD, IKK 2 Wt, IKK 2KD transfiziert. 48 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zur Northern Blot Analyse. Die Abbildung zeigt die HSP 70 Northern Blot Analyse der extrahierten mRNA.

HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **DNA** desoxyribonucleic acid, **mRNA** messenger ribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead

Neben den Ebenen der Proteinexpression und der Promotoraktivität von HSP 70 sollen nun noch die Modulationen auf mRNA- Ebene analysiert werden. Sowohl bei MiaPaCa als auch bei Panc-1 kann die Expression von HSP 70 mRNA durch Transfektion der Zellen mit IKK 1 KD oder IKK 2 KD nicht beeinflusst werden (Abbildung 34).

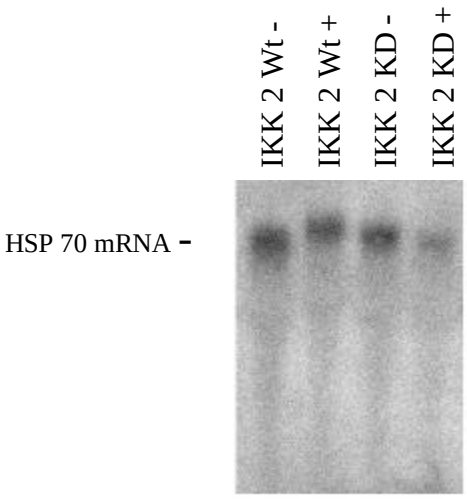


Abb. 35: **HSP 70 mRNA in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases / Northern Blot Analyse**

MiaPaCa rtTA Zellen werden nach 24-stündigem Serumentzug mit jeweils 4 µg IKK 2 Wt oder IKK 2 KD transfiziert. 24 Stunden später wird eine Zellgruppe mit Doxycyclin induziert (+), während die Kontrollgruppe ohne Doxycyclin (-) bleibt. 48 Stunden später erfolgt die Weiterverarbeitung der Zellen zur Northern Blot Analyse. Die Abbildung zeigt die Hitzeschockprotein (HSP) 70 Northern Blot Analyse der extrahierten mRNA.

HSP Hitzeschockprotein, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **mRNA** messenger ribonucleic acid, **Wt** Wildtyp, **KD** kinase dead

In der Northern Blot Analyse der induzierbaren MiaPaCa rtTA Zellen ergibt sich dann jedoch ein Rückgang der detektierbaren HSP 70 RNA, wenn die Zellen zuvor mit IKK 2 KD transfiziert und mit Doxycyclin induziert worden sind (Abbildung 35).

3.9 HSP 70 und pIkBa Doppel-Immunfluoreszenz

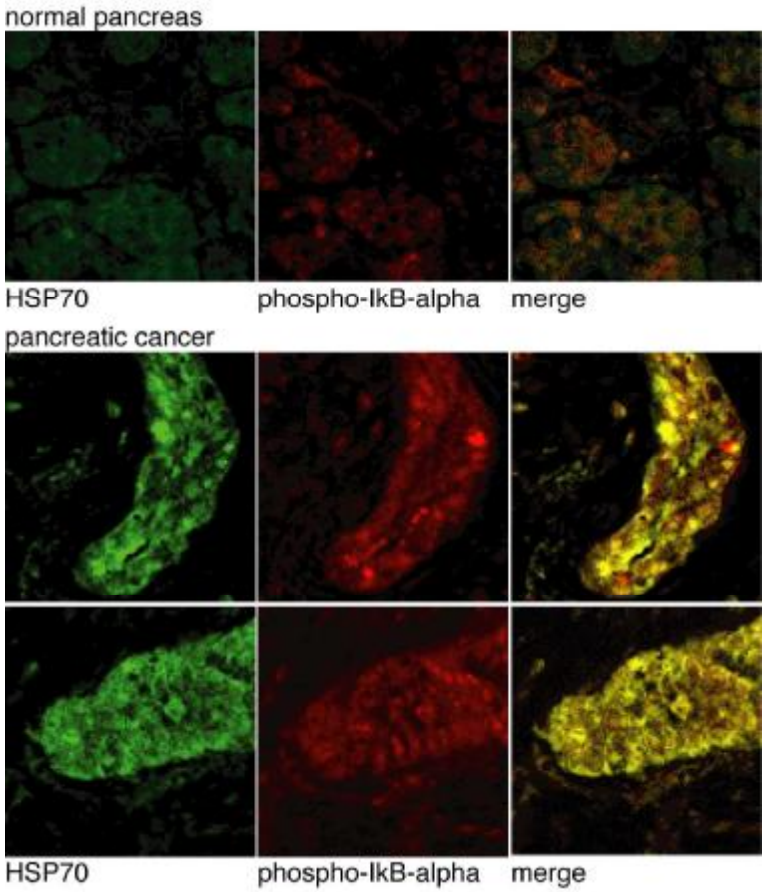


Abb. 36: **Expression von HSP 70 und pIkBa / Doppel-Immunfluoreszenz**
Paraffinschnitte von humanem Pankreaskarzinom-Gewebe und normalem humanen Pankreas werden mit Doppel – Immunmfluoreszenz gefärbt. Chromogenkonjugat ist dabei Alexa 488 für HSP 70 und CY 3 für pIκBα. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzen für HSP 70 (grün), pIκBα (rot) und ihre Überschneidung/merge (gelb).
HSP Hitzeschockprotein, **pIkB**a phospho-Inhibitor of κBα,

Den In vitro Studien folgt abschließend noch eine In vivo Untersuchung. Dabei werden Paraffinschnitte von humanem Pankreaskarzinom-Gewebe und gesundem Pankreas mit Doppel-Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Mittels dieser Immunfluoreszenz können sowohl bei normalem als auch bei karzinomatösem humanen Pankreasgewebe HSP 70 und pIκBα in ihrer Lokalisation im Gewebe visualisiert werden. Dabei fallen zunächst die deutlich stärkeren Fluoreszenzreaktionen im Karzinomgewebe auf. Weiter ermöglicht die Doppel–Immunfluoreszenz auch, Überschneidungen sichtbar zu machen (merge). So zeigt sich in Abbildung 36 im Pankreaskarzinom große Übereinstimmung in der Lokalisation von HSP 70 und pIκBα.

Zusammenfassend findet sich also in vitro und auch in vivo eine hohe basale HSP 70 Expression in menschlichen Pankreaskarzinomzellen und auch in den in vitro verwendeten Pankreaskarzinomzellen der Maus (TD1 und TD 2). Der Nachweis ist durch Western Blot Analysen auf Proteinlevel, durch Luciferase Assays auf Promotorebene und durch Northern Blot Analysen auf RNA-Level möglich. Die Expression von HSP 70 lässt sich durch Hitzeexposition der Zellen verstärken. Durch Inhibieren von NF-κB auf verschiedene Weisen (NAC, PDTC, LY, kinase dead IKK, „IκBα- Superinhibitor“) reduziert sich die HSP 70 Expression. Ras hat ebenso Einfluss auf die HSP 70 Expression. Der HSP 70 Level sinkt bei Verwendung von funktionslosem Ras, steigt jedoch bei aktivem Ras. Die NF-κB-Level verhalten sich dabei gleichsinnig, sinken bei funktionslosem Ras und steigen bei aktivem Ras. Durch NF-κB-Inhibition mit kinase dead IKK reduziert sich der HSP 70 Anstieg, welcher durch aktives Ras verursacht wird, wieder. Der durch Hitze als physikalischem Stressor induzierte Anstieg von HSP 70 lässt sich durch funktionsloses Ras und den NF-κB Inhibitor NAC nur partiell senken. Mit induzierbaren Pankreaskarzinomzellen (MiaPaCa rtTA) kann dann ein Sinken der HSP 70 Expression als Reaktion auf kinase dead IKK sowohl im Western Blot als auch im Northern Blot detektiert werden. Letztendlich zeigt sich in vivo in Gewebeschnitten von humanem Pankreaskarzinom eine deutliche Überschneidung der Lokalisation von HSP 70 und pIκBα.

4. Diskussion

Die entwicklungsgeschichtlich hochkonservierten und ubiquitär vorkommenden Hitzeschockproteine akkumulieren in Zellen, welche Hitze oder einer Vielzahl anderer Stressoren ausgesetzt sind (Santoro 2000). Hitzeschockproteine, als molekulare Chaperone fungierend, helfen Zellen sich an Veränderungen ihrer Umwelt allmählich anzupassen, um ansonsten tödliche Bedingungen überleben zu können. Im Rahmen der Stressantwort scheinen Hitzeschockproteine an zentralen Stellen an der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein (Garrido et al. 2001). Sowohl pro- als auch antiapoptotische Proteine der HSP-Familie interagieren mit einer Reihe von zellulären Proteinen im Rahmen des Zellzyklus und der Proliferation (Milarski et al. 1986).

Karzinomzellen haben per se ein „stressiges“ Leben, etwa durch beschleunigte Zellproliferation, Nährstoff- und Sauerstoffmangel und limitiertes Platzangebot in einer potentiell gefährlichen Umgebung mit Attacken der Immunabwehr. Ein wesentliches Charakteristikum von Tumorzellen ist jedoch ihre Resistenz gegenüber dem sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose). Deshalb macht die Fähigkeit der Hitzeschockproteine, Zellen vor Apoptose zu schützen, sie im Rahmen der Karzinomforschung erneut interessant (Nylandsted et al. 2000). Bei bestimmten Brustkrebsformen ist eine Überexpression von HSP 90α sogar mit schlechter Prognose assoziiert (Yano et al. 1996). 2002 fanden Sagol et al. durch immunohistochemische Färbungen, dass HSP 70 in Adenokarzinomen des Pankreas als prognostischer Faktor zu werten sei (Sagol et al. 2002). Andererseits kann die Proliferation maligner Zellen in einigen Fällen durch Überexpression von zum Beispiel HSP 25 verlangsamt werden (Knauf et al. 1992).

In Pankreaskarzinomzellen sind unter Ruhebedingungen Hitzeschockproteine, wie HSP 27, HSP 70 und HSP 90, im Western Blot detektierbar (Abb. 3, 4, 5).

Im Northern Blot lässt sich in den humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien MiaPaCa und Panc-1 auch HSP 70 mRNA nachweisen (Abb. 33). In Übereinstimmung mit Gress et al. kann HSP 70 mRNA in humanem Pankreaskarzinomgewebe mittels Northern Blot Analyse detektiert werden, und zwar in höherem Ausmaß als in gesundem Pankreasgewebe (Gress et al. 1994). Auch Aghdassi et al. finden in Pankreaskarzinomzellen eine höhere HSP 70 Expression als in normalen duktalen Pankreaszellen (Aghdassi et al. 2007). Dies findet Bestätigung in den Immunfluoreszenz-Färbungen für HSP 70 von menschlichem Pankreasgewebe. In den tumorösen

Zellverbänden ist deutlich mehr HSP 70 nachweisbar als in den Immunfluoreszenzen von gesundem Pankreasgewebe (Abb. 35).

Ogata et al. fanden 2000, dass Hitzeschockproteine in schlecht differenzierten Adeno- und muzinösen Pankreaskarzinomen höher expremiert sind als in differenzierteren Karzinomen. Hitzeschockproteine können dabei sowohl im Nukleus als auch im Zellplasma lokalisiert werden (Ogata et al. 2000).

Es kann in der vorliegenden Arbeit weiter gezeigt werden, dass die basale Expression von HSP 70 in humanen Pankreaskarzinomzellen unter zusätzlichem zellulären Stress, hier Hitzeexposition bei 40 °C, zunimmt (Abb. 1 und 2). Der erhöhte Grundlevel in den Karzinomzellen lässt also immer noch regulatorischen Spielraum für ein weiteres Ansteigen der Hitzeschockproteine.

Nachdem veränderte Expressionslevel der Hitzeschockproteine nicht nur im Pankreaskarzinom, sondern auch in etlichen anderen Tumoren beobachtet werden, stellt sich die Frage, ob diese Assoziationen mit der Pathogenese der Tumoren kausalen oder korrelativen Charakter haben. Überleben und Apoptose sind die wesentlichen Pfade der Stressantwort, deren Balance oder Imbalance über das Schicksal der Zelle entscheidet. Daher gibt es sicherlich multiple Verknüpfungspunkte zwischen Zellstress und der zellulären Antwort in Form von Zelltod oder Überleben. Afanasyeva et al zeigen, dass Hitzeschock und HSP 70 Expression Zellen vor Myc-modulierter Apoptose nach Zytostatikatherapie mit Etoposide und Camptothecin schützen (Afanasyeva et al. 2007). Für das Adenokarzinom des Pankreas können Aghdassi et al. mit einem selektiven knockdown von HSP 70 Apoptose induzieren (Aghdassi et al. 2007). Auch in Prostatakarzinom- und Magenkarzinomzelllinien lässt sich durch HSP 70 Inhibition Apoptose induzieren, so dass es sich nicht um ein Zelllinien-spezifisches Phänomen zu handeln scheint (Jonas et al. 2004, Zhao und Shen 2005).

Die Expression von induzierbarem HSPs wird auf der Transkriptionsebene durch Hitzschock Transkriptionsfaktoren reguliert. Bekannt sind heute vier verschiedene Hitzeschock Transkriptionsfaktoren (HSF 1-4) (Santoro 2000). HSF 1 bindet nach Aktivierung der monomeren Form als Trimer an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz (Hitzeschockelement) im HSP 70 Promotor (Morimoto 1998). Eine Phosphorylierung scheint für die Aktivierung des HSF 1 erforderlich zu sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob und in wiefern die Signaltransduktionsketten von NF-κB und Ras mit der Expression von Hitzeschockproteinen in Zusammenhang

stehen. Daraus könnten sich beachtenswerte und für neue Ansätze in der Tumortherapie durchaus relevante Aspekte ergeben.

Hitzeschock und nachfolgende Hitzeschockprotein-expression ist in der Lage NF-κB-Translokation über den IKK-Weg zu inhibieren (Kohn et al. 2002, Malhotra und Wong 2002, Wong et al. 1997, Chen et al. 2004, Weiss et al 2007). 2008 finden Zheng et al. eine Interaktion von HSP 70 mit dem NF-κB / IκBα–komplex in Mäusen mit HSP 70 Überexpression. Eine vermehrte HSP 70 Expression führt hier zu einer Verminderung der NF-κB-Aktivierung (Zheng et al. 2008). Andererseits sind extrazelluläre Hitzeschockproteine potente Zytokine, die NF-κB aktivieren (Asea at al. 2002). Ein Weg ist dabei HSP-stimulierte IKK-Aktivierung (Kol et al. 1999, Valbulas et al. 2001). 2007 finden Chase et al. weitere Hinweise für eine Aktivierung von NF-κB durch HSP 72, wobei sich die folgende Zytokin-expression wiederum durch NF-κB Inhibition mindern läßt (Chase et al. 2007).

Hitzeschock und Hitzeschockproteine haben also Einfluss auf die NF-κB-Signaltransduktionskaskade. Doch wie verändert oder beeinflusst eine Modulation von NF-κB ihrerseits die Expression von Hitzeschockproteinen?

In vielen malignen Tumoren findet sich erhöhte NF-κB-Aktivität. Als Beispiele seien hier der Brustkrebs (Sovak et al. 1997) und der M. Hodgkin (Bargou et al. 1997 und Krappmann et al. 1999) genannt. Auch im Pankreaskarzinom lassen sich erhöhte Level von konstitutiv aktivem NF-κB nachweisen (Dejardin et al. 1999, Ludwig et al. 2001, Wang et al. 1999).

Eine Reihe von Pankreastumorzelllinien, die sich besonders chemoresistent präsentieren, weist erhöhte Aktivität von konstitutivem NF-κB auf. Unterbrechung dieser NF-κB-Aktivität macht die Zellen wiederum sensibler für Chemotherapie (Arlt et al. 2001). Vor allem die Kombination aus bestimmten chemotherapeutischen Medikamenten und die pharmakologische Inhibition von NF-κB könnten einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie des Pankreaskarzinomes darstellen (Wang et al. 1999, McDade et al. 1999, Mayo und Baldwin 2000).

Es bestätigt sich in der vorliegenden Arbeit zunächst die inhibitorische Wirkung von NAC und PDTC auf NF-κB. Es wird die NF-κB- Aktivierung und/oder die NF-κB- vermittelte Transkriptionsaktivität inhibiert (Schenk et al. 1994 und Blackwell et al. 1996). Im Western Blot erhöht sich nach ihrer Inkubation die IκBα Konzentration in den Karzinomzellen (Abb. 6). Vor allem aber sinkt nach ihrer Anwendung die Promotoraktivität von Igκ in Luciferaseassays (Abb. 9 und 10). Auch für den PI3- kinase

Inhibitor LY 294002 ist bereits inhibitorische Wirkung auf NF-κB nachgewiesen worden (Liptay et al. 2003).

Mit den genannten NF-κB- Inhibitoren kann zwar keine Reduktion der Expression von HSP 27, 70 oder 90 im Western Blot erreicht werden (Abb. 3, 4, 5), durch Luciferaseassays zeigt sich aber, dass die HSP 70 Promotoraktivität durch die NF-κB Inhibition abnimmt, wenn auch nur wenig (Abb. 7 und 8). Interessanterweise ist die Inhibition von HSP 70 auch nicht so effektiv, wenn die Zellen neben der NF-κB- Inhibition durch 20 mM NAC einem zusätzlichen Hitzestimulus (eine Stunde bei 40 °C) unterzogen werden (Abb. elf und zwölf). Das heißt, dass NAC nicht in der Lage ist, die Expression von HSP 70 nach einem Hitzeschock komplett zu unterbinden, zumindest nicht in der verwendeten Konzentration. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die verwendeten NF-κB-Inhibitoren nur partiellen, modulierenden Einfluss auf die Induktion von Hitzeschockproteinen durch physikalische Stressoren wie Hitze haben.

In einem weiteren Schritt wird versucht, die Regulation von NF-κB in den Karzinomzellen durch transiente Transfektion von verschiedenen IKK-cDNA-Konstrukten zu modulieren. Die Promotoraktivität von Igκ sinkt dosisabhängig unter dominant negativem „kinase dead“ IKK 1 und 2, während es bei den konstitutiv aktivierten IKKs zu einem Anstieg von Igκ-Aktivität kommt (Abb. 18 und 19). Diese Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Arbeiten über IKK (reviewed in Gosh und Karin 2002). Das transfizierte IKK lässt sich mittels Western Blot in den Zelllysaten nachweisen (Abb. 14). Ferner reduziert die Transfektion des „Superinhibitors“ IκBα AA die Promotoraktivität von HSP 70 und Igκ (Abb. 20 und 21). Weniger eindeutig sind die Ergebnisse für die HSP 70 Promotoraktivitäten bei der Transfektion von aktivem und funktionslosem IKK 1 und 2 (Abb. 16). Es zeigt sich allerdings doch eine leichte Dosisabhängigkeit zwischen transfiziertem „kinase dead“ IKK und HSP 70 im Sinne einer Abnahme der HSP 70-Promotoraktivität (Abb. 17). Jedoch hat diese Modulation des NF-κB- Signalweges keine im Western Blot ersichtliche Veränderung in der HSP 70 Expression zur Folge (Abb. 13). Möglicherweise ist die transiente Transfektion ein nicht ausreichender Stimulus.

Bei mit Doxycyclin induzierbaren MiaPaCa rtTA- Zellen ist durch Transfektion von kinase dead (also funktionslosem) IKK 2 ein Rückgang von HSP 70 auch im Western blot zu sehen, welcher durch TPA wiederum etwas aufgehoben wird (Abb. 32). Inkubation mit TPA verstärkt dabei die Expression des transfizierten IKK 2 (Abb. 33 und Huang et al. 2003). Bei der Untersuchung der HSP 70 mRNA im Northern Blot sind erneut mit einfacher transienter Transfektion von kinase dead IKK keine Veränderungen der HSP 70

mRNA zu beobachten (Abb. 34). Allerdings gelingt es wiederum mit induzierbaren Zellen (MiaPaCa rtTA), eine Reduktion von HSP 70 mRNA nach Transfektion von kinase dead IKK 2 zu erreichen (Abb. 35). Dieser Widerspruch lässt sich dadurch erklären, dass es noch alternative Aktivierungswege von NF-κB gibt, die nicht den IKK-Komplex involvieren. Diese Wege können ebenfalls durch TPA aktiviert werden. Dagegen sprechen die in den Doppel-Immunfluoreszenzen gefundenen Lokalisationsübereinstimmungen der Immunoreaktionen von pIκBα und HSP 70 für eine Verknüpfung dieses Pfades mit der Expression von HSP 70 (Abb. 36). Zusätzlich fanden Malhotra und Wong Hinweise, dass HSP 70 selbst über direkte Interaktion mit IKKγ und eine folgende Blockade des IKK-Komplexes die NF-κB Aktivität herabsetzen kann (Malhotra und Wong 2002), so dass möglicherweise an eine Regulierung im Sinne einer negativen Rückkopplung gedacht werden muss.

Insgesamt kann jedoch nur von einer fraglichen positiven Korrelation zwischen IKK und HSP 70 ausgegangen werden. Eine gute Korrelation findet sich hingegen zwischen IκB und HSP 70, so dass also auch Interaktionen auf anderer Ebene, IKK-unabhängig, vorstellbar sind, wie dies in Abbildung 37 schematisiert wird.

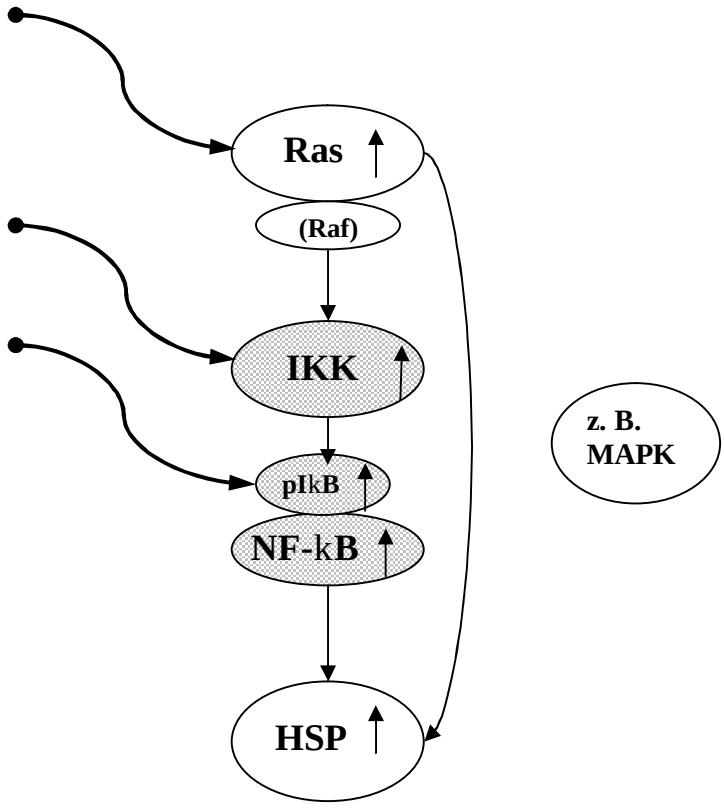


Abb. 37: Schematische Darstellung der möglichen Einflüsse auf Hitzeschockproteine

Die Abbildung 37 zeigt schematisch die denkbaren Zusammenhänge zwischen Ras, NF-κB und Hitzeschockproteinen.

Ras Rat sarcoma, **Raf** rapidly growing fibrosarcoma, **IKK** Inhibitor of κB kinase, **pI**k**B** phospho-Inhibitor of κB kinase, **NF**-k**B κ** light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes, **HSP** Hitzeschockprotein, **MAPK** mitogen activated protein kinase

Um nun Zusammenhänge zwischen Ras und der Expression von NF-κB und HSP 70 zu studieren, werden die Karzinomzellen mit verschiedenen Ras-Plasmiden transfiziert, wobei Ras N 17 als dominant-negative Form, das konstitutiv aktive Ras G 12 V und BxB DD als aktiver downstream Effektor der Ras-Signalkaskade verwendet werden. Im Western Blot zeigt das transfizierte Ras sein regelrechtes Wirken und die intakte Funktion, indem bei den aktiven Formen die ERK 1 und ERK 2 Expression entsprechend abnimmt (Abb. 24). Umgekehrt stieg die Expression des pERK durch Ras G 12 V und BxB DD (Abb. 23).
Keinen Einfluss scheint transfiziertes Ras auf die Expression von IκBα und HSP 70 im Western Blot zu haben (Abb. 22 und 25), was wiederum auf die unzureichende Effektivität der transienten Transfektion zurückzuführen sein könnte. Es ist denkbar, dass transiente Transfektionseffekte sich nicht bis auf im Western Blot detektierbare Level in der Ebene der Proteinexpression durchsetzen können. In den Luciferase Assays ist durch Ras G12V und BxB (aktives Raf) nicht nur ein Anstieg der Igκ Promotoraktivität, sondern auch ein gleichsinniges Ansteigen der HSP 70 Promotoraktivität zu verzeichnen (Abb. 26 und 27, 28 und 29). Ein möglicher Aktivierungsweg des HSP 70 Promotors könnte Ras-abhängig über die extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) erfolgen (Kim et al. 1997). Ras-induzierte Hitzeschockproteintranskriptionen sind aber auch über einen von der MAPK-kaskade unabhängigen Aktivierungsweg des HSP 70 Promotors denkbar. Xu et al. fanden keinen Einfluss auf die HSF-1-DNA- Bindung durch Inhibition der MAPK-kaskade (Xu et al. 2000). NF-κB wäre hier eine denkbare Möglichkeit. Dafür spricht, dass durch aktives Ras (Ras G 12 V und BxB DD) erhöhte HSP 70 Promotoraktivität durch co-transfizierte kinase dead IKK 1 und 2 wieder reduziert werden kann (Abb. 30). Ebenso verhält es sich mit der Igκ Promotoraktivität (Abb. 31). Sie steigt bei Ras G 12 V und BxB DD, wird allerdings durch co-transfizierte kinase dead IKK 1 und 2 in ihrer Aktivität gemindert. Vorstellbar ist demnach, dass das aktive Ras die IKK hochreguliert, welche dann über NF-κB auf den HSP Promotor einwirken (Abb. 37).
Transfektion von funktionslosem Ras N 17 reduziert sogar dosisabhängig die HSP 70- und Igκ Promotoraktivität (Abb. 27 und 29). Werden diese Zellen einem zusätzlichem

Hitzeschock unterzogen, so ist die reduzierte HSP 70- und Igκ Promotoraktivität wieder höher, bleibt aber trotzdem unter dem Level der Negativkontrollen (Abb. elf und zwölf).
Zusammenfassend gesehen zeigt sich eine gute Korrelation zwischen Ras/Raf (BxB) und der Induktion der Hitzeschockproteine, am Beispiel von HSP 70. Dessen Induktion durch Ras/Raf (BxB) kann wiederum durch Inhibition von NF-κB unterdrückt werden, so dass hier eine modulierende Funktion von NF-κB anzunehmen ist.

5. Zusammenfassung

Hitzeschockproteine werden als so genannte Chaperone bei zellulärem Stress expremiert. In Pankreaskarzinomzellen existiert eine konstitutive Expression von Hitzeschockproteinen. κ light chain enhancer nuclear binding factor in B lymphocytes (NF-κB) ist ein Transkriptionsfaktor, dem große Bedeutung in der Regulation vieler Gene zukommt, die im Rahmen der Immunantwort und Onkogenese exprimiert werden. Auch rat sarcoma (Ras) spielt eine wesentliche Rolle in der Steuerung von Zellzyklus und Proliferation im komplexen Signalnetzwerk des zellulären Überlebens. Bei allen drei genannten Molekülen ist noch kein komplettes Verständnis aller Mechanismen erreicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob und in welcher Weise NF-κB und Ras die Expression von Hitzeschockproteinen beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus zunächst auf dem Nachweis erhöhter Expression von Hitzeschockproteinen in Pankreaskarzinomzellen. Verwendet wurden sowohl humane als auch Mäuse-Pankreaskarzinomzelllinien, in denen dann auf bereits etablierte Weisen experimentell die Aktivität von NF-κB und Ras verändert wurde, um dann die Expression von Hitzeschockproteinen zu studieren.

Dabei zeigte sich, dass sowohl NF-κB als auch Ras auf die Promotoraktivität von Hitzeschockprotein 70 (HSP 70) Einfluss haben. Im Fall von NF-κB scheint dies über Inhibiting-κB kinase (IKK) und Inhibiting κB-α (IκBα) so reguliert zu sein, dass funktionslose „kinase dead“ IKK oder auch ein IκB- „Superinhibitor“ nicht nur NFκB, sondern auch die Promotoraktivität von Hitzeschockprotein 70 inhibieren. Auch findet sich in Doppel-immunfluoreszenzfärbungen eine Koexistenz von phospho-IκBα und Hitzeschock-protein 70, beide in Pankreaskarzinomzellen mit deutlich stärkeren Immunfluoreszenz-reaktionen als in gesundem Pankreasgewebe. Ras ist ebenso in der Lage, als dominant negative Mutante NF-κB und die Promotoraktivität von Hitzeschockprotein 70 zu inhibieren. Konstitutiv aktives Ras G 12 V und BxB DD als aktiver downstream Effektor der Ras/Raf-Signalkaskade sind hingegen in der Lage, NF-κB und Hitzeschockprotein 70 zu aktivieren.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit Teile eines denkbaren Netzwerkes aus wachstumsfördernden Molekülen wie Ras und protektiven Mechanismen wie den Hitzeschockproteinen. Dem Transkriptionsfaktor NF-κB kommt dabei eine modulierende

Funktion zu, indem er durch Ras stimuliert, aber auch selbst Hitzeschockproteine induzieren kann.

Weitere detaillierte Erkenntnisse dieser Zusammenhänge sind für das Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der Erkrankung essentiell, beispielsweise um zukünftig alternative Methoden zur früheren Detektion des Pankreaskarzinoms zu eröffnen.

6. Literaturverzeichnis

- **Afanasyeva EA, Komarova EY, Larsson LG, Bahram F, Margulis BA, Guzhova IV:** Drug-induces Myc-mediated apoptosis of cancer cells is inhibited by stress protein Hsp 70. *Int J Cancer* 121: 2615-2621 (2007)

- **Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A:** Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 67: 616-625 (2007)

- **Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schäfer H:** Inhibition of NF-κB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20: 859-868 (2001)

- **Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK:** Novel signal transduction pathway utilized by extrazellular HSP 70. *J Biol Chem* 277: 15028-15034 (2002)

- **Baldwin AS:** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683 (1996)

- **Barbacid M:** Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827 (1987)

- **Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B:** Consitutive nuclear factor-κB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Investig* 100:2961-2969 (1997)

- **Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP:** In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor- κB activation and neutorphilic lung inflammation. *J Immunol* 157: 1630-1637 (1996)

- **Boguski MS, McCormick F:** Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654 (1993)

- **Bos JL:** Ras oncogenes in human cancer – a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689 (1989)

- **Bukau B, Horwich AL:** The HSP 70 and Hps 60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366 (1998)

- **Burris H, Storniolo AM:** Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-FU. *Eur J Cancer* 33: 18-22 (1997)

- **Chase MA, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K:** Hsp 72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- und NF-kappaB-dependent mechanism. *J Immunol* 179: 6328-6324 (2007)

- **Chen Y, Arrigo AP, Currie RW:** Heat shock treatment suppresses angiotensin-II-induced activation of NF-κB pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: 1104-1114 (2004)

- **Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SAW, Welch WJ, McGuire WL:** Heat shock protein HSP 70 in patients with acillary lymphnode-negative breast cancer : Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85: 570-574 (1993)

- **Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V:** Regulation of NF-κB activity by IκB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* 18: 2567-2577 (1999)

- **Finco T, Baldwin A:** Kappa B site-dependent induction of gene expression by diverse inducers of nuclear factor kappa B requires Raf-1. *J Biol Chem* 268: 17676-17679 (1993)

- **Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin AS jun:** Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB Transcriptional Activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 272: 24113-24116 (1997)

- **Galang C, Der C, Hauser C:** Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* 9: 2913-2921 (1994)

- **Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G:** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433-442 (2001)

- **Gosh S, Karin M:** Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell* 109: 81-96 (2002)

- **Ghosh S, May MJ, Kopp EB:** NF-kappa B and Rel proteins: revolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260 (1998)

- **Gress TM, Müller-Pillasch F, Weber CK, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Beger HG, Adler G:** Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma. *Cancer Research* 54: 547-551 (1994)

- **Hartl FU:** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579 (1996)

- **Hartl FU, Hayer-Hartl M:** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858 (2002)

- **Hightower LE:** Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197 (1991)

- **Huang WC, Chen JJ, Inoue H, Chen CC:** Tyrosine phosphorylation of I-κB kinase α/β by protein kinase C-dependent s-Src activation is involved in TNF-α- induced cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol* 170: 4767-4775 (2003)

- **Hunter T:** Oncoprotein networks. *Cell* 88: 333-346 (1997)

- **Isreal A:** The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappa B? *Trends Cell Biol* 10: 129-133 (2000)

- **Jameel A, Skilton RA, Campell SK, Coombes RC, Luqmani YA:** Clilnical and biological significance of hsp 89 α in human breast cancer. *Int J Cancer* 50: 409-415 (1992)

- **Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ:** Cancer statistics 2006. *CA Cancer J Clin* 56: 106-130 (2006)

- **Jones EL, Zhao MJ, Stvenson MA, Calderwood SK:** The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate caner. *Int J Hyperthermia* 20: 835-849 (2005)

- **Joneson T, Bar-Sagi D:** Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med* 75: 587-593 (1997)

- **Karin M:** How NF-kappa B is activated: The role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-6874 (1999)

- **Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappa B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-663 (2000)

- **Kiang JG, Tsokos GC:** Heat shock preotein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther* 80: 183-201 (1998)

- **Kim U, Nueda A, Meng YH, Dyan WS, Mivechi NF:** Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor 1 by MAP kinase family members. *J Cell Biochem* 67: 43-54 (1997)

- **Knauf U, Bielka H, Gaestel M:** Overexpression of the small heat-shock protein, hsp 25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett* 309:297-302 (1992)

- **Kohn G, Wong HR, Bshesh K, Zhao B, Vasi N, Deneberg A, Morris C, Stark J, Shanley TP:** Heat shock inhibits TNF-induced ICAM-1 expression in human endothelian cells via I kappa kinase inhibition. *Shock* 17: 91-97 (2002)

- **Kol A, Bourcier T, Lichtmann AH, Libby P:** Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smoth muscle cells and macrophages. *J Clin Invest* 103: 571-577 (1999)

- **Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dörken B, Scheidereit C:** Molecular mechanisms of consitutive NF-κB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 18: 943-953 (1999)

- **Leppä S, Sistonen L:** Heat shock response – pathophysiological implications. *Ann Med* 29: 73-78 (1997)

- **Li Q, Verma IM:** NF-kappa B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734 (2002)

- **Lindquist S, Craig EA:** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677 (1988)

- **Liptay S, Weber CK, Ludwig L, Wagner M, Adler G, Schmid RM:** Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappa B/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 105: 735-746 (2003)

- **Ludwig L, Kessler H, Wagner M, Hoang-Vu C, Dralle H, Adler G, Böhm BO, Schmid RM:** Nuclear factor-κB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer Res* 61: 4526-4535 (2001)

- **Malhotra V, Wong HR:** Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Crit Care Med* 30: 89-95 (2002)

- **Mayo MW, Baldwin AS:** The transcription factor NF-κB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys* Acta 1470: M55-M62 (2000)

- **McCormick F:** Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4: 71-76 (1994)

- **McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJ Jr, Carrigan RC, Callery MP:** Salicylates inhibit NF-κB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 83: 56-61 (1999)

- **Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Young DB, Pascual G, Motiwala A, Zhu H, Mann M, Manning AM :** IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterongenous IKK complex. *Mol Cell Biol* 19: 1526-1538 (1999)

- **Milarski KL, Morimoto RL:** expression of human HSP 70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9517-9521 (1986)

- **Minowada G, Welch WJ:** Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95: 3-12 (1995)

- **Miyamoto S, Verma IM:** Rel/NF-kappa B/I-kappa B story. *Adv Cancer Res* 66: 255-292 (1995)

- **Morimoto H, Monden T, Miyoshi Y, Kawasaki Y, Nakanishi H, Shimano T, Mori T:** Expression of p53 and heat shock protein in colorectal tumors: An immunohistochemical study. *J Jpn Sur Soci* 9: 1094-1097 (1991)

- **Morimoto RI:** Regulations of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796 (1998)

- **Nylandsted J, Brand K, Jaattela M:** Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 926: 122-125 (2000)

- **Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M:** Selective depletion of heat shock protein 70 activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7871-7876 (2000)

- **Ogata M, Naito Z, Tanaka S, Moriyama Y, Asano G:** Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch* 67: 177-185 (2000)

- **Ritossa FA:** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 18: 571-573 (1962)

- **Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC, Andersen JS, Portenoy RK, Buriis HA 3rd, Green MR, Tarassoff PG, Brown TD Casper ES, Storniolo AM, Von Hoff DD:** A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann Oncol* 7: 347-353 (1996)

- **Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M:** IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395: 297-300 (1998)

- **Sagol O, Tuna B, Coker A, Karademir S, Obuz F, Astarcioglu H, Kupelioglu A, Astarcioglu I, Topalak O:** Immunohistochemical detection of pS2 protein and heat shock protein 70 in pancreatic adenocarcinomas. Relationship with disease extent and patient survival. *Pathol Res Pract* 198:77-84 (2002)

- **Santoro MG:** Heat shock faktors and the control of stress response. *Biochem Pharmacol* 59: 55-63 (2000)

- **Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y:** Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 267: 24149-24152 (1992)

- **Schenk H, Klein M, Erdbrugger W:** Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-κB and AP-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1672-1676 (1994)

- **Silverman N, Maniatis T:** NF-kappa B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 15: 2321-2342 (2001)

- **Smith DF, Whitesell L, Katsanis E:** Molecular chaperones: Biology and prospects for pharmacological intervention. *Pharmacol Rev* 50: 493-514 (1998)

- **Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, Sonnenshein GE:** Abberant nuclear factor-κB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Investig* 100: 2952-2960 (1997)

- **Tissières A, Mitchell HK, Tracy U:** Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs. *J mol Biol* 84: 389-398 (1974)

- **Valbulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H:** Endocytosed HSP 60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR 4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276: 31332-31339 (2001)

- **Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr:** Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-κB. *Nat Med* 5: 412-417 (1999)

- **Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ:** The nuclear factor-κB RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenomacarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5: 119-127 (1999)

- **Weiss YG, Bromberg Z, Raj N, Raphael J, Goloubinoff P, Ben-Neriah Y, Deutschmann CS:** Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of IkappaB kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 35: 2128-2138 (2007)

- **Wong HR, Ryan M, Wispe JR:** The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking IκB degradation and NF-κB nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 257-263 (1997)

- **Xu Q, Schett G, Li C, Hu Y, Wick G:** Mechanical stress-induced heat shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Rac and Ras small G proteins but not mitogen-activated protein kinases. *Circ Res* 86: 1124-1130 (2000)

- **Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A:** Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex esssential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-1240 (1998)

- **Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G:** Expression and role of heat shock proteins in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 87: 908-915 (1996)

- **Yuhu Y, Nishimura J, Nawata H:** Hight constitutive expression of heat shock protein 90 α in human acute leukemia cells. *Leuk Res* 16: 597-605 (1992)

- **Zhao ZG, Shen WL:** Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol* 11: 73-78 (2005)

- **Zheng Z**, **Kim JY**, **Ma H**, **Lee JE**, **Yenari MA**: Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 53-63 (2008)

7. Danksagung

Ausdrücklicher Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Christoph Weber für das Überlassen des Themas sowie für seine gute und zuverlässige Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit.
Herzlichen Dank möchte ich Frau Beate Knobel sagen für ihre einwandfreie, geduldige Anleitung und ihre tatkräftige Unterstützung vor allem in praktischen Dingen.
Dankbar bin ich auch Dr. Tamara Aleksic (Oxford, GB) und Dr. Richard Lorenz (Universität Ulm) für so manchen hilfreichen Ratschlag.
Größte Dankbarkeit gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir stets bedingungsloser Rückhalt sind.

8. Lebenslauf

Zwickauerweg 3
89547 Gerstetten
Deutschland

Tel.: 07323-6970
Fax: 07323-6970
theresa.schuster@gmx.net

Theresa Schuster

Persönliche Angaben:	Familienstand:	ledig
	Konfession:	römisch-katholisch
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
	Geburtstag:	15.03.1979
	Geburtsort:	Heidenheim an der Brenz
Ausbildung:	1985 – 1989:	Grundschule, Gerstetten
	1989 – 1998:	Hellenstein Gymnasium, Heidenheim Abschluss: Allg. Hochschulreife
Studium:	1998 – 2005:	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm Abschluss: Staatsexamen
	2004 – 2005:	Praktisches Jahr Klinikum Oberallgäu, Kempten Spital Oberengadin, Samedan, Schweiz
	2003 – 2007:	Promotion Abteilung Innere Medizin I, Universität Ulm
Berufstätigkeit:	seit 2005:	Assistenz Abteilung für Innere Medizin, Oberschwabenklinken, Krankenhaus Leutkirch

9. Anhang

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des klassischen Aktivierungsweges von NF-κB..2

Tabelle 1: verwendete eukaryontische Zelllinien.....7

Tabelle 2: verwendete Gewebeschnitte 7

Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper.....8

Tabelle 4: verwendete sekundäre Antikörper 8

Tabelle 5: verwendete Plasmide und Tracer.....9

Tabelle 6: Herstellung von Trenn- und Sammelgel 14

Abb. 2: Expression von HSP 70 unter Hitze / Western Blot 21

Abb. 3: Promotoraktivität von HSP 70 unter Hitzeexposition / Luciferase Assay ...21

Abb. 4: Expression von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse .22

Abb. 5: Expression von HSP 27 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse .23

Abb. 6: Expression von HSP 90 unter NF-κB Inhibitoren / Western Blot Analyse .24

Abb. 7: Expression von IκBα unter NF-κ B Inhibitoren / Western Blot Analyse 25

Abb. 8: Promotoraktivität von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Luciferase Assay 26

Abb. 9: Promotoraktivität von HSP 70 unter NF-κB Inhibitoren / Dual-Luciferase Assay 27

Abb. 10: Promotoraktivität von Igκ unter NF-κB Inhibitoren / Luciferase Assay 28

Abb. 11: Promotoraktivität von Igκ unter NF-κ B Inhibitoren / Dual-Luciferase Assay 29

Abb. 12: Promotoraktivität von HSP 70, +/- Hitze, mit NF-κB Inhibition / Luciferase Assay 30

Abb. 13: Promotoraktivität von HSP 70, +/- Hitze, mit NF-κB Inhibiton / Luciferase Assay 31

Abb. 14: Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Western Blot Analyse32

Abb. 15: Expression von IKK 1/2 in Abhängingkeit von IKK / Western Blot Analyse 33

Abb. 16: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Dual-Luciferase Assay 34

Abb. 17: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IKK / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay 35

Abb. 18: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von IKK / Luciferase Assay....36

Abb. 19: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von IKK / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay 37
Abb. 20: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von IκBα / Dual-Luciferase Assay 38
Abb. 21: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von IκBα / Dual-Luciferase Assay 38
Abb. 22: Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse. 40
Abb. 23: Expression von pERK in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse ... 40
Abb. 24: Expression von ERK 1 und 2 in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse 41
Abb. 25: Expression von IκBα in Abhängigkeit von Ras / Western Blot Analyse 42
Abb. 26: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Dual-Luciferase Assay 43
Abb. 27: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras / Dosiskurve / Dual-Luciferase-Assay 44
Abb. 28: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von Ras / Luciferase Assay 45
Abb. 29: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von Ras / Dosiskurve / Dual-Luciferase Assay 46
Abb. 30: Promotoraktivität von HSP 70 in Abhängigkeit von Ras und Inhibiting kappa B kinases / Luciferase Assay 47
Abb. 31: Promotoraktivität von Igκ in Abhängigkeit von Ras und Inhibiting kappa B kinases / Luciferase Assay 48
Abb. 32: Expression von HSP 70 in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases und TPA / Western Blot 49
Abb. 33: Expression von IKK 1/2 in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases und TPA / Western Blot 50
Abb. 34: HSP 70 mRNA in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases / Northern Blot Analyse 51
Abb. 35: HSP 70 mRNA in Abhängigkeit von Inhibiting kappa B kinases / Northern Blot Analyse 52
Abb. 36: Expression von HSP 70 und pIκBα / Doppel-Immunfluoreszenz 53
Abb. 37: Schematische Darstellung der möglichen Einflüsse auf Hitzeschockproteine 59