Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. G. Adler

Untersuchungen zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sp1 in der TGFβ-1 - vermittelten Progression des Pankreaskarzinoms

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

vorgelegt von
Kerstin Jungert
aus Freiburg i. Br.
im Jahr 2005

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
Erster Berichterstatter:	PD Dr. med. Volker Ellenrieder
Zweiter Breichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Michael Kühl
Tag der Promotion:	27.01.2006

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung 1

A.1 Duale Rolle vonTGFβ-1 im Pankreaskarzinom 1

A.2 TGFβ-1 Signaltransduktion 2

A.3 Smad unabhängige TGFβ-1 Signaltransduktion 5

A.4 TGFβ-1 in der Tumorprogression 7

A.5 Rolle des Transkriptionsfaktors Sp1 im Tumor 9

A.6 Ziel der Arbeit 11

B Material und Methoden 13

B.1 Zellkulturtechniken 13

B.2 Arbeiten mit DNA 17

B.3 Luciferase Reportergen Assay 21

B.4 Migrationsassay 22

B.5 Proliferationsassay 23

B.6 Proteinanalyse 24

B.7 DNA-Pulldown Assay 28

B.8 RNA Analyse 28

B.9 Expressionsprofilanalyse 34

C Ergebnisse 36

C.1 Vorversuche 36

C.2 Regulation früher TGFβ-1 - Zielgene durch Smad-Proteine und Sp1 40

C.3 Transkriptionelle Regulation von Smad7 45

C.4 Bedeutung von endogenem Sp1 für die Prozesse der TGFβ-1 - vermittelten Tumorgenese 51

C.5 Transkriptionelle Regulation und funktionelle Bedeutung von Vimentin in Pankreaskarzinomzellen *54*

D Diskussion 62

D.1 Sp1 - artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der TGFβ-1 - vermittelten Genregulation beteiligt *63*

D.2 Die transkriptionelle Aktivierung von Smad7 durch Smad3/4 wird über Sp1 vermittelt *66*

D.3 Der Transkriptionsfaktor Sp1 trägt zur TGFβ-1 - vermittelten Migration und EMT bei *67*

D.4 Die TGFβ-1 - vermittelte transkriptionelle Aktivierung von Vimentin erfolgt durch Smad2/3/4 und ist abhängig von endogenem Sp1 ..... *68*

D.5 Vimentin hat eine Rolle in der TGFβ-1 - vermittelten Zellmigration *70*

D.6 Schlussfolgerung *71*

E Zusammenfassung 74

F Literaturverzeichnis 76

Abkürzungsverzeichnis

ALK-5	Activin Receptor-Like Kinase 5
AMH	Anti-Müllerian hormone
APS	Amoniumpersulfat
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSA	Bovine serum albumine
CCDN1	CyclinD1
CDH1	E-Cadherin
Col1A1	α1 Untereinheit von Collagen I
Co-Smad	Common partner Smad
DMEM	Dulbecco`s modified minimal essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E.coli	*Escherichia coli*
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
EST	Expressed sequence tag
CTBS	Cathhepsin B
FN1	Fibronectin1
h	Stunde
HAT	Histon-Actetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethan-Sulfonsäure
HRP	Horse raddish peroxidase
I.P.	Immunpräzipitation
I-Smad	Inhibitorisches Smad
LB-Medium	Luria Bertani Medium

MAD	Mother against decapentaplegic peptide
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MH	MAD-homology
min	Minute
MMP11	Matrixmetalloproteinase11
MMP2	Matrixmetalloproteinase2
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
O.D.	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R-Smad	Rezeptor-Smad
RT-PCR	Real-time PCR
SARA	Smad anchor for receptor activation
SBE	Smad Bindungselement
SDS	Sodiumdodecylsulfate
siRNA	Small interfering RNA
Smad	Signalling mother against decapentaplegic peptide
Sp1	Signal protein 1
Sp1siRNA	siRNA Oligonukleotidsequenz gegen Sp1
TβR-I	TGFβ TypI Rezeptor
TβR-II	TGFβ TypII Rezeptor
TGFβ-1	Transforming growth factor β-1
Vim	Vimentin
VimsiRNA	siRNA Oligonukleotidsequenz gegen Vimentin

A Einleitung

A.1 Duale Rolle vonTGFβ-1 im Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt die fünfhäufigste Ursache tumorbedingter Todesfälle in Europa und Nordamerika dar (Jemal, Thomas et al. 2002). Zumeist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, weist das Pankreaskarzinom weitgehende Resistenz gegenüber chemo -und radiotherapeutischer Behandlung auf, so dass die Überlebensrate nach 5 Jahren nur ca. 3% beträgt. Auch operative Maßnahmen zeigen mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 15-20% nur wenig Erfolg (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992; Rosewicz and Wiedenmann 1997; Ahrendt and Pitt 2002).

Während der Entstehung und der Progression des Pankreaskarzinoms spielt das Cytokin Transforming growth factor β-1 (TGFβ-1) eine wichtige Rolle. Mitglieder der TGFβ Familie kontrollieren in Epithelien, Endothelien, Fibroblasten und Immunzellen viele grundlegende Funktionen, wie Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung. TGFβ-1 vermittelt die jeweils spezifischen zellulären Effekte über die Bindung von transmembranen, heteromeren Typ-I und Typ-II Serin/Threonin Kinaserezeptoren, welche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und über diese die transkriptionelle Regulation von TGFβ-1 - Zielgenen beeinflussen. Studien an Zellkulturen, transgenen Mäusen und humanen Tumoren, lassen auf eine duale Rolle von TGFβ-1 während der Tumorentstehung schließen (Cui, Fowlis et al. 1996; Blobe, Schiemann et al. 2000; de Caestecker, Piek et al. 2000; Wakefield and Roberts 2002; Siegel, Shu et al. 2003; Sun 2004). In gesunden Geweben und während früher Tumorstadien wirkt TGFβ-1 als Tumorsuppressor, indem es die Proliferation durch entsprechende transkriptionelle Regulation von Zellzyklusgenen hemmt. Während der Tumorgenese verlieren die Zellen jedoch die Fähigkeit auf TGFβ-1 mit Wachstumshemmung zu reagieren. Mit dem Fortschreiten des Tumors nehmen die Epithelzellen in Gegenwart von TGFβ-1 eine fibroblastoide Morphologie an und es sind gesteigerte Invasion und Metastasierung zu beobachten (Welch,

Fabra et al. 1990; de Caestecker, Piek et al. 2000; Ellenrieder, Hendler et al. 2001; Roberts and Wakefield 2003). Die Gründe dafür liegen zum einen bei genetischen Mutationen der Proteine der TGFβ-1 Signaltransduktionskaskade. Zum anderen führen auch epigenetische Veränderungen während der Tumorgenese zu einer modifizierten TGFβ-1 Antwort. Die TGFβ-1 Signaltransduktion und die Auswirkungen von deren Modulation auf die Tumorgenese werden im Folgenden näher erläutert.

A.2 TGFβ-1 Signaltransduktion

Die TGFβ Superfamilie umfasst ca. 30 Mitglieder, und teilt sich in die Subfamilien TGFβ, Activin, Nodal, Bone morphogenetic proteins (BMP), und anti-Müllerian hormone (AMH) auf. Diese interagieren als Homodimere mit einer spezifischen heterotetramere Kombination von je zwei Typ-I und Typ-II transmembranen, Serin/Threonin Kinase Rezeptoren (Wrana, Attisano et al. 1994; Heldin, Miyazono et al. 1997). Bislang wurden sieben TGFβ Typ-I (TβR-I) und fünf TGFβ Typ-II (TβR-II) Rezeptoren in Säugern identifiziert (Derynck and Feng 1997; Moren, Itoh et al. 2000; Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001). TGFβ-1 bindet spezifisch an ein Typ-II Rezeptor Homodimer, dessen intrazelluläre Serin/Threonin Kinase Domänen konstitutiv aktiv sind (Shi, Wang et al. 1998). Dieser Komplex rekrutiert TβR-I/ ALK-5 Rezeptor Homodimere, so dass ein heterotetramerer Rezeptorkomplex aus je zwei TβR-II und TβR-I/ ALK-5 Molekülen entsteht. Hierin aktiviert die TβR-II Kinase die TβR-I/ ALK-5 Rezeptoren, indem sie deren cytoplasmatischen GS-Domänen phosphoryliert (Derynck and Feng 1997). In der Folge vermitteln die aktivierten TβR-I Serin /Threonin Kinasen durch die Phosphorylierung intrazellulärer Substrate die Aktivierung der TGFβ-1 Signaltransduktionskaskaden (Abb. 1).

A.2.1 Smad abhängige TGFβ-1 Signaltransduktion

A.2.1.1 Charakteristika der Smad-Proteine

Intrazellulär ist den aktivierten TGFβ Rezeptoren hauptsächlich die Smad-Protein Signalkaskade nachgeschaltet. Dazu stehen in Vertebraten acht verschiedene

Smad-Proteine zur Verfügung, die in drei Subtypen unterteilt werden: Rezeptor-Smads (R-Smads), Common-partner Smads (Co-Smads) und inhibitorische Smads (I-Smads). (Heldin, Miyazono et al. 1997; Miyazono, ten Dijke et al. 2000; Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001). Im Fall von TGFβ-1 dienen Smad2 und Smad3 als R-Smads, Smad4 als Co-Smad und Smad7 als I-Smad. Strukturell sind sich R-Smads und Smad4 sehr ähnlich. Sie besitzen im N-und C-terminalen Bereich konservierte MH1 und MH2 Domänen, die durch eine Linker-Region verbunden sind. Dagegen ist bei den I-Smads nur die MH2 Domäne konserviert, der N-terminale Bereich ist strukturell verschieden zu den restlichen Smads.

A.2.1.2 TGFβ-1 - vermittelte Smad Aktivierung und Transkription

Zur Aktivierung der intrazellulären Smad Signalkaskade werden die R-Smads zunächst durch Wechselwirkung mit membranassoziierte Proteinen, darunter dem „Smad anchor for receptor activation“ (SARA) (Tsukazaki, Chiang et al. 1998), in räumliche Nähe zu den Rezeptoren gebracht. Dabei bindet ein Homodimer von SARA an die MH2 Domänen eines Smad2/3 Heterodimers. So kann das Smad2/3 Heterodimer effizient an die GS-Domäne des Rezeptorkomplexes gebunden werden (Wu, Hu et al. 2001). Die aktivierte TβRI Kinase phosphoryliert die letzten zwei Serin Reste am C-terminalen S-S-X-S Motiv der R-Smads. Daraufhin bilden Smad2/3 mit Smad4 über ihre MH2 Domänen einen heteromeren Komplex und translozieren mithilfe von nukleären Lokalisationssignalen (NLS) in den Nukleus (Wrana 2000; Reguly and Wrana 2003) (Abb. 1).

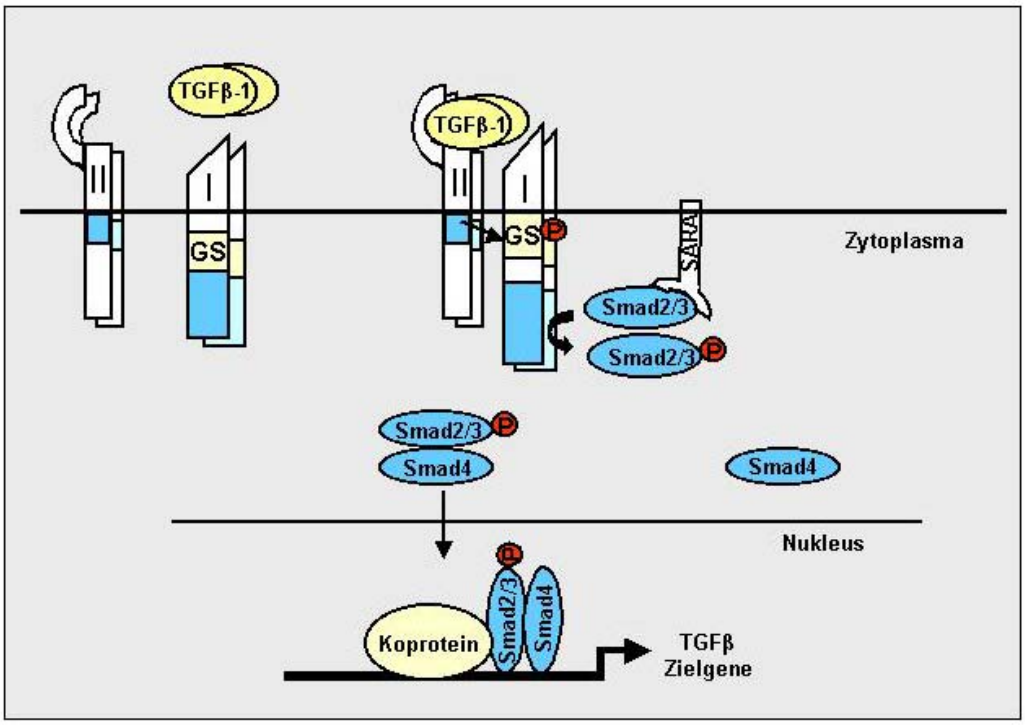


Abbildung 1: TGFβ-1 - vermittelte Signaltransduktion
TGFβ-1 bindet an die transmembranen Rezeptoren TβRI und TβRII, wodurch die intrazelluläre Smad Signaltransduktionskaskade aktiviert wird. Smad2/3 translozieren im Komplex mit Smad4 in den Nukleus. Der aktivierte Smad Komplex reguliert in Kooperation mit transkriptionellen Koproteinen die Expression von TGFβ-1 - Zielgenen.

Im Zellkern wird das TGFβ-1 Signal in die Smad - vermittelte transkriptionelle Regulation von mehreren hundert Zielgenen umgesetzt (Kang, Chen et al. 2003). Hierfür binden Smad3 und Smad4 über eine hochkonservierte β-Haarnadelschleife ihrer MH1 Domäne direkt an das Smad Bindungselement (SBE) der Zielpromotoren, während die verbreitetste Spleißvariante von Smad2 diese Fähigkeit durch eine Insertion an der MH1 Domäne verloren hat (Shi, Wang et al. 1998; Moren, Itoh et al. 2000). Um transkriptionell aktiv zu werden, rekrutiert der Smad-Komplex, der selbst nur eine sehr geringer Affinität zu der 5´-CAGAC-3` Konsensussequenz des SBE aufweist, Trankriptionsfaktoren und transkriptionelle Koaktivatoren bzw. Korepressoren (Abb. 1). Deren Bindung erfolgt hauptsächlich über die MH1 und MH2 Domäne der Smads. Zahlreiche transkriptionelle Koproteine, mit denen der Smad Komplex physikalisch und funktionell kooperative

Interaktionen eingeht, wurden bereits identifiziert. Dabei vermitteln Koaktivatoren bzw. Korepressoren wie z.B. CBP/p300 und TGIF ihre Aktivität über Histon-Actetyltransferasen (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen (HDAC) (Derynck, Zhang et al. 1998; Feng, Zhang et al. 1998; Janknecht, Wells et al. 1998; Wotton, Lo et al. 1999). Daneben spielt auch die Wechselwirkung mit sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1 bei der Selektion und transkriptionellen Regulation der Zielgene von TGFβ-1 eine wichtige Rolle.
Je nach Zelltyp und Zellkontext variieren die Expression und der Aktivitätsstatus der Smad-Partnerproteine, wodurch jeweils unterschiedliche Zielgene positiv oder negativ reguliert werden können. Dies spiegelt sich in den verschiedenartigen zellulären Effekten die das TGFβ-1 Signal zur Folge haben kann, wider (Massague, Blain et al. 2000).

A.2.1.3 Das inhibitorische Smad7 Protein

Ein zentrales Gen, dessen Expression durch die TGFβ-1 Signalkaskade induziert wird, ist das inhibitorische Smad7 Protein. Smad7 bildet einen Komplex mit den E3 Ubiquitin Ligasen Smurf1 und Smurf2. Mithilfe der N-terminalen C2 Domäne von Smurf1 und Smurf2 wird der Komplex zur Membran gebracht, wo Smad7 direkt mit TβRI interagiert und weitere Phosphorylierung der R-Smads unterbindet (Kavsak, Rasmussen et al. 2000; Suzuki, Murakami et al. 2002). Im Membrankomplex vermittelt Smurf1 außerdem direkt die Ubiquitinylierung und den Abbau des Rezeptors im Proteasom. Smad7 wird bei diesem Schritt ebenfalls ubiquitinyliert und abgebaut (Ebisawa, Fukuchi et al. 2001; Tajima, Goto et al. 2003). Auf diese Weise induziert TGFβ-1 über Smad7 eine autokrine, negative Rückkoppelung des eigenen Signals und ermöglicht somit, dass eine erneute Aktivierung der TGFβ-1 Signalkaskade stattfinden kann.

A.3 Smad unabhängige TGFβ-1 Signaltransduktion

Obwohl die Smad-Proteine als die zentralen Signaltransduktionsmoleküle von TGFβ-1 betrachtet werden, belegen viele Studien, dass auch andere Signalkaskaden direkt oder indirekt durch TGFβ-1 beeinflusst werden und damit Teil der TGFβ-1 Antwort sind.

Wichtige Repräsentanten von TGFβ-1 Effektor Proteinen sind die Mitglieder der Rho-ähnlichen GTPasen RhoA, Rac und Cdc42. Diese vermitteln TGFβ-1 - induzierte Veränderungen in der Organisation des Cytoskelettes, wie z. B. die Ausbildung von Stressfasern (Bishop and Hall 2000; Bhowmick, Ghiassi et al. 2001; Bakin, Rinehart et al. 2002; Edlund, Landstrom et al. 2002). Eine rasche und transkriptionsunabhängige Aktivierung durch das TGFβ-1 Signal erfolgt auch bei den MAP Kinasen Erk JNK und p38. Neben Smad unabhängigen Effekten können die MAPK Signaltransduktoren auch mit den Smad-Proteinen zusammenwirken oder, je nach Zellkontext, den Smad Signalweg negativ beeinflussen (Zavadil, Bitzer et al. 2001; Bakin, Rinehart et al. 2002; Yu, Hebert et al. 2002). Auf transkriptioneller Ebene regulieren die MAPK Proteine die Expression von TGFβ-1 - Zielgenen durch die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und ATF3, die dann entweder Smad unabhängig oder als Smad Partnerproteine an die jeweiligen Promotoren binden (Massague 2000; Moren, Itoh et al. 2000; Moustakas, Souchelnytskyi et al. 2001).

A.3.1 Non-Smad abhängige TGFβ-1 Genregulation

Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfakoren, welche die zelluläre Antwort von TGFβ-1 kontrollieren, lässt sich als die non-Smad TGFβ-1 Signaltransduktoren zusammenfassen. Diese sind Transkriptionsfaktoren die durch das TGFβ-1 Signal induziert werden. Im Vergleich zur schnellen, direkten Smad - vermittelten Signaltransduktion, repräsentiert die transkriptionell regulatorische Aktivität der non-Smads eine indirekte, zeitlich verzögerte Antwort auf TGFβ-1. Viele solcher Transkritpionsfaktoren, darunter TIEG2, ATF3, Runx2, ZEB, JunB und c-Jun (Jonk, Itoh et al. 1998; Wong, Rougier-Chapman et al. 1999; Comijn, Berx et al. 2001; Kang, Chen et al. 2003; Ellenrieder, Buck et al. 2004; Miyazono, Maeda et al. 2004) sind bereits beschrieben. Non-Smads werden nicht notwendigerweise durch Smad unabhängige Signalwege induziert. So sind Smad-Proteine an der Expression von c-Jun, JunB, ATF3 und Runx2 beteiligt. Non-Smad ihrerseits gehen häufig mit Smad-Proteinen Transkriptionskomplexe ein.

A.4 TGFβ-1 in der Tumorprogression

Während der Tumorprogression geht die hemmende Wirkung von TGFβ-1 auf das Zellwachstum verloren. In fortgeschrittenen Stadien weisen die Tumorzellen zwar erhöhte TGFβ-1 Sekretion auf, diese wird jedoch mit erhöhter Tumorzellinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht. TGFβ-1 ist dabei an entscheidenden Prozessen der Tumorentwicklung beteiligt.

A.4.1 TGFβ-1 - vermittelte tumorfördernde Effekte

A.4.1.1 Epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung

Die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration und Invasion beruht u. a. auf dem Verlust der Zell-Zell-Kontakten und dem Erwerb fibrolastoider Charakteristika. Dieser Prozess wird als epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) bezeichnet (Siegel and Massague 2003). Die Tumorzellen verlieren als Antwort auf TGFβ-1 ihre epithliale Morphologie und nehmen eine fibroblastoide Gestalt an. Intrazellulär verändert sich das Zytosklett und die Zell-Zell-Adhäsion geht verloren. So vermittelt TGFβ-1 unter anderem die Reprimierung der Expression der Intermediärfilamente Zytokeratin 8 und 18, sowie der Zell-Zell-Adhäsionsproteine E-Cadherin und ZO-1, während das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin hochreguliert wird (Miettinen, Ebner et al. 1994; Oft, Heider et al. 1998; Ellenrieder, Hendler et al. 2001). Für Tumorzellen, welche eine TGFβ-1 - vermittelte EMT aufweisen, wurden oftmals gleichzeitig erhöhte Migrationsraten gefunden (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001; Ellenrieder, Hendler et al. 2001).

A.4.1.2 Veränderung der Tumorumgebung durch TGFβ-1

Auch in der Umgebung des Tumors bewirkt TGFβ-1 einige Veränderungen die dem Tumorwachstum förderlich sind. So wird durch die Expression entsprechender Proteasen die Degradation der extrazellulären Matrix erreicht (Edwards, Murphy et al. 1987; Ellenrieder, Hendler et al. 2001; Hagedorn, Bachmeier et al. 2001). Des weiteren stellt die TGFβ-1 - vermittelte Neo-Angiogenese einen entscheidenden Schritt für das Tumorwachstum und die Metastasierung stellt (Roberts, Sporn et al. 1986; Pertovaara, Kaipainen et al.

1994; Hasegawa, Takanashi et al. 2001; Larsson, Goumans et al. 2001). In Gegenwart von TGFβ-1 findet außerdem eine Hemmung der Proliferation von Lymphozyten und deren Immunfunktionen statt, so dass der Tumor dem Immunsystem entgeht (Torre-Amione, Beauchamp et al. 1990; Botti, Seregni et al. 1998).

A.4.2 Ursachen des tumorfördernden Charakters von TGFβ-1

Die oben beschriebenen Phänomene durch die TGFβ-1 zur Tumorprogression beiträgt, sind auf vielfältige genetische und epigenetische Ursachen zurückzuführen.

A.4.2.1 Genetische Ursachen

Die tumorsupprimierenden Eigenschaften von TGFβ-1 gehen verloren, wenn inaktivierende Mutationen der Gene der TGFβ Rezeptoren oder der Smads vorliegen, so dass keine Smad - vermittelte Signaltransduktion mehr stattfinden kann. So werden somatische Mutationen von *TGFβR2* (Markowitz, Wang et al. 1995; Myeroff, Parsons et al. 1995), inaktivierende *TGFβR1* Mutationen, (Goggins, Shekher et al. 1998) und die Deletion des für *SMAD4/DPC4* kodierenden Chromosomenabschnitts 18q21 (Hahn, Schutte et al. 1996), mit Tumorprogression und verkürzter Überlebensdauer assoziiert. (Heinmoller, Dietmaier et al. 2000). Weniger häufig liegen, vor allem im kolorektalem Krebs und im Lungenkarzinom, inaktivierende *SMAD2* Mutationen vor (Eppert, Scherer et al. 1996; Uchida, Nagatake et al. 1996).

A.4.2.2 Epigenetische Ursachen

Wie bereits beschrieben ist die TGFβ-1 Signaltransduktion in ein komplexes Netzwerk von zellulären Signalkaskaden eingebunden, deren Veränderungen, z.B. durch Mutagenese während der Tumorprogression, eine Modifizierung des korrekten Smad Signalweges zur Folge haben kann. Eine solche Modifizierung des TGFβ-1 Signalweges stellt beispielsweise die Überexpression von Smad7 dar, welche in Pankreaskarzinomzellen mit dem Verlust der Wachstumshemmung in

Verbindung gebracht wird (Kleeff, Ishiwata et al. 1999; Boyer Arnold and Korc 2005).

Bezüglich des Einflusses onkogener Signalkaskaden belegen einige Studien, dass onkogenes Ras die Smad Signaltransduktion unterbrechen kann indem es durch Phosphorylierung der Linker-Region von Smad2/3 deren nukleäre Lokalisation verhindert oder auch die Degradation von Smad4 bewirkt (Kretzschmar, Doody et al. 1999; Saha, Datta et al. 2001). Demgegenüber konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Translokation der Smad-Proteine in Ras transformierten Zellen oder Zellen mit aktivierten MAPK Signalweg intakt ist und die beiden Signalwege bei der Induktion der EMT zusammenwirken (Oft, Peli et al. 1996; Oft, Heider et al. 1998; Ellenrieder, Hendler et al. 2001; Janda, Lehmann et al. 2002).

Die TGFβ-1 Signalkaskade kann während der Tumorgenese noch durch eine ganze Reihe anderer Signalwege wie z.B. HGF/EGF RTKs, JNK, CamIIK, PI3K verändert werden, bzw. selbst auf diese Einfluss nehmen (de Caestecker, Parks et al. 1998; Engel, McDonnell et al. 1999; Wicks, Lui et al. 2000; Peron, Rahmani et al. 2001).

Darüber hinaus ist eine Abänderung der TGFβ-1 Antwort auch auf transkriptionellem Level möglich, wenn onkogene Signalkaskaden ein bestimmtes Set an Transkriptionsfaktoren aktivieren bzw. reprimieren, die dann an onkogenen Zielpromotoren als Partnerproteine der Smads fungieren. Auf diese Weise ist der TGFβ-1 Signalweg z.B. über die Bindung der Smads an TCF/Lef mit dem Wnt Signalweg verknüpft (Labbe, Letamendia et al. 2000; Eger, Stockinger et al. 2004). Auch die oxygen-regulierte Gentranskription ist zur transkriptionellen Aktivierung des pro-Angiogense Faktors VEGF durch die Interaktion von HIF-1α mit Smad3 auf transkriptioneller Ebene mit dem TGFβ-1 Signalweg synergistisch verbunden (Sanchez-Elsner, Botella et al. 2001).

A.5 Rolle des Transkriptionsfaktors Sp1 im Tumor

Ein wichtiger Interaktionspartner der Smad-Proteine bei der Induktion tumorfördernder Gene ist der Transkriptionsfaktor Sp1.

A.5.1 Familie der Sp1/Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren

Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Sp1 wurde Anfang der 80er Jahre isoliert und begründete die Familie der Sp1/Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren (Dynan and Tjian 1983; Briggs, Kadonaga et al. 1986). Mitglieder der Sp1 Familie binden über drei tandemartige Cys2His2 Zinkfinger Motive an die DNA Konsensussequenzen 5`-GGCGGG-3` bzw. 5`-CACCC-3`. Inzwischen umfasst die Familie über 20 Mitglieder. Strukturell sind die sechs Sp Proteine und 15 Krüppel Proteine im hochkonservierten C-Terminus homolog. Dennoch binden die Sp Proteine vor allem an 5`-GGCGGG-3` während die Krüppel Proteine die Sequenz 5`-CACCC-3` bevorzugen. Der Aminoterminus der Sp/Krüppel Proteine ist sehr variabel und kann transkriptionelle Aktivator- oder Repressordomänen enthalten. Das NLS, bislang nur in den Krüppel Proteinen identifiziert, ist in deren Zinkfingerdomäne bzw. direkt daran angrenzend lokalisiert (Shields and Yang 1997; Song, Patel et al. 2002).

A.5.2 Allgemeine Charakteristika von Sp1

Der Transkriptionsfaktor Sp1 ist ein starker transkriptioneller Aktivator der an seine glutaminreichen Aktivatordomänen Koaktivatoren wie z.B. TAFII130 (Hoey, Weinzierl et al. 1993) und CRSP rekrutieren kann (Ryu, Zhou et al. 1999). Der Koaktivator p300 interagiert dagegen mit dem C-Terminus von Sp1 und verstärkt dadurch die Affinität der Sp1-DNA-Bindungsdomäne zum Zielpromotor (Suzuki, Kimura et al. 2000). Aktivität und Stabilität von Sp1 werden außerdem durch Phosphorylierung, Glycosilierung und Acetylierung beeinflusst. So regulieren eine Reihe von Kinasen und Phosphatasen wie CamKII, PKC, PKA, CyclinA/cdk2, und PP2A, meist über die Modifikation der DNA Bindung, die transkriptionelle Aktivität von Sp1 (Armstrong, Barry et al. 1997; Rohlff, Ahmad et al. 1997; Pal, Claffey et al. 1998; Garcia, Cereghini et al. 2000 ; Fojas de Borja, Collins et al. 2001; Haidweger, Novy et al. 2001).

A.5.3 Sp1 - vermittelte tumorfördernde Effekte

Funktionell ist der Transkriptionsfaktor Sp1 u. a. in die zelluläre Wachstumsregulation während der Embryogenese und der Krebsentstehung eingebunden (Marin, Karis et al. 1997; Black, Jensen et al. 1999; Black, Black et al. 2001). In epidermalen Tumoren korrelieren erhöhte Sp1 Level und dessen verstärkte DNA Bindung mit der Tumorprogression (Kumar and Butler 1999). Beim Magenkarzinom scheint die Expression von Sp1 als prognostischer Marker verwendbar zu sein (Wang, Wei et al. 2003; Zhang, Zhu et al. 2005). Dies wird auf eine Beteiligung von Sp1 an der Induktion von tumorfördernden Genen wie *VEGF* und *CTSB* zurückgeführt. So weisen Patienten mit Magenkarzinom neben einem erhöhten Sp1 Level eine gesteigerte Expression von VEGF auf (Yao, Wang et al. 2004; Loeffler, Fayard et al. 2005), während die Sp1 - vermittelte Expression von Cathepsin B zum Abbau der extrazellulären Matrix und damit verstärkter Tumorinvasion beiträgt (Szpaderska, Silberman et al. 2004).
Eine Verknüpfung von Sp1 mit dem TGFβ-1 Signalweg konnte bereits bei der Regulation einiger tumorrelevanter Gene nachgewiesen werden. So interagieren Smad3/4 mit Sp1 unter anderem um die Promotoren für die β5 Integrin Untereinheit und Pai-1 zu induzieren (Datta, Blake et al. 2000; Lai, Feng et al. 2000). Ferner konnten Wagner et al. bei der Aktivierung des VEGF Promotors eine ActivinA - vermittelte Wechselwirkung von Smad2 mit Sp1 nachweisen (Wagner, Peters et al. 2004).

A.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war, die Bedeutung des Trankriptionsfaktors Sp1 für die TGFβ-1/Smad - induzierte Genexpression und für die daraus resultierenden promalignen Prozesse im Pankreaskarzinom zu untersuchen. Durch Expressionsprofilanalysen von Pankreaskarzinomzellen sollte die Beteiligung von Sp1 an der TGFβ-1 - vermittelten Genexpression quantifiziert und neue Zielpromotoren identifiziert werden. Anhand dieser Zielpromotoren sollte der genaue Mechanismus der Wechselwirkung von Sp1 mit den Smad-Proteinen bei der transkriptionellen Regulation untersucht werden. Darüber hinaus sollte in funktionellen Assays

überprüft werden, inwiefern Sp1 für die TGFβ - induzierte EMT und Migration in Pankreaskarzinomzellen von Bedeutung ist.

B Material und Methoden

B.1 Zellkulturtechniken

B.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, sowie deren Abstammung, Herkunft und Kultivierungsmedien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungsmedium	Herkunft
Panc-1	Pankreastumor	DMEM	ATCC, American Type Culture Collection, Manassas (VA), USA
Paca 3	Pankreastumor	DMEM	H. P. Elsaesser Abteilung der Anatomie und Zellbiologie, Universität Marburg, Deutschland
MiaPaCa-2	Pankreastumor	DMEM	ECACC - European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK
Sk-PC-1	Pankreastumor	DMEM	F.X. Real, Insitute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien
IMIM-PC2	Pankreastumor	DMEM	F.X. Real, Insitute Municipale de Investigacion Medica, Barcelona, Spanien
TD2	Muriner Pankreastumor	RPMI1640	R.M. Schmid , Medizinische Klinik II, TU München, Deutschland
S028	Lebermetastase/ Pankreastumor	DMEM	T. Iwamura, Miyazaki Medical Colleges, Japan
S007	Lebermetastase/ Pankreastumor	DMEM	T. Iwamura, Miyazaki Medical Colleges, Japan
CAPAN-1	Lebermetastase/ Pankreastumor	RPMI1640	CLS - Cell line service, Eppelheim, Deutschland
CHO	Chinese Hamster Ovary	F12	ECACC - European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

Zelllinie	Abstammung	Kultivierungsmedium	Herkunft
Hek293	Human Embryonic Kidney	DMEM	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
HeLa	Zervixkarzinom	DMEM	DKFZ - Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland
Cos7	African Green Monkey Kidney	DMEM	DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

DMEM = Dulbecco`s modified minimal essential medium (Fa. GIBCO, Invitrogen), RPMI1640 = Roswell Park Memorial Institute medium (Fa. GIBCO, Invitrogen), F12 = Ham`s F12 medium (Fa. GIBCO, Invitrogen).

Die in Tabelle 1 aufgeführten Medien wurden jeweils mit 10 % fötalem Kälberserum (Fa. GIBCO, Invitrogen) und 100U/ml Streptomycin/ 100µg/ml Penicillin (Fa. BiochromAG) versetzt, zu den Zellen gegeben und diese bei 37°C/ 5% CO2 inkubiert. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS Puffer gewaschen, mit Trypsin /EDTA (Fa. BiochromAG) vereinzelt, bei 1000 rpm abzentrifugiert und ca. ein drittel der Zellen weiterkultiviert. Die Zellen wurden außerdem in verschiedenen Versuchen mit 5 bzw. 10mg/ml TGFβ-1 (Fa. PromoCell GmbH) und den angegebenen Konzentrationen an Mithramycin A (Fa. Sigma-Aldrich) behandelt.

PBS Puffer (1L):

8g NaCl

0,2g KCL

1,44g Na_2HPO_4

0,24g KH_2PO_4

pH7,4

B.1.2 Transfektion der Zelllinien

B.1.2.1 Verwendete Transfektionsreagenzien

Zur transienten Transfektion von DNA Konstrukten wurden Panc-1 und TD-2 Zellen mit Transfast™ Reagenz (Fa. PromegaA), IMIM-PC2 und Hek293 mit jetPEI™ (Fa. Qbiogene) und CHO Zellen mit FuGENE6™ (Ra. Roche Diagnostics) jeweils nach den Herstellerprotokollen behandelt.
Small interfering RNA (siRNA) wurde mittels Transmessenger™ (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers in Panc-1 Zellen transfiziert. Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurde die Transfektion nach 24 h wiederholt.

Tabelle 2: In Transfektionen eingesetzte DNA Konstrukte

DNA Konstrukte	Plasmid	Insert	Herkunft/ Referenz
3TPLux	pGL3 Reportergen: Luciferase	TRE des PAI-I-Promotors;	J. Massague (Sloan Kettering Institute, New York, NY, USA)
pGL725-Luc	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor- 613 bis +112	R. Heuchel (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden)
pGL725-delSBE	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor- 613 bis +112 : Deletion des SBE	R. Heuchel (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden)
pGL725-delGC	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor- 613 bis +112: Deletion der GC Boxen	R. Heuchel (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden)
pGL725-delSBE/GC	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor - 613 bis +112: Deletion der GC Boxen, des SBE	AG Gress/ Anita Buck
pGL80-mut	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor –129 bis –209 jeweils GGCGGG zu AACGGG mutiert	AG Gress/ Anita Buck
pGL80-wt	pGL3 Basic Reportergen: Luciferase	muriner Smad7 Promotor: –129 bis –209	AG Gress/ Anita Buck

DNA Konstrukte	Plasmid	Insert	Herkunft/ Referenz
pSp1-Luc	pGVB2	drei hintereinandergeschaltene GC-Boxen	S.Toshiyuki (Kyoto University, Japan)
pMMP2wt	pGL2	humaner MMP2 Promotor -1659 bis -1	Douglas D. Boyd (Department of Cancer Biology, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA)
pVimwt	pGL3	humaner Vimentin Promotor: 1417 - +71	J.-M. Foidart (Laboratory of Tumor and Developmental Biology, University of Liege, CHU Sart-Tilman, B23, Belgium)
RSV	pRL Reportergen: Luciferase	Rous-Sarkom-Virus-Promotor	R. Urrutia (GI-Research Unit, Mayo Clinic, MI, USA
pSp1-Luc	pGVB2	drei hintereinandergeschaltene GC-Boxen	S.Toshiyuki (Kyoto University, Japan)
caTGFβRI	pCMV5	Sequenz des humanen, konstitutiv aktiven TβRI	Liliana Attisano (Department of Biochemistry, University of Toronto, Kanada)
Flag-Smad2	pCS2	humane Smad2 Sequenz	Lisa Choy (Departments of Growth and Development, and Anatomy, UCSF, San Fransisco, CA, USA)
Flag-Smad3	pRK5	humane Smad3 Sequenz	R. Derynck (Departments of Growth and Development, and Anatomy, UCSF, San Fransisco, CA, USA)
Flag-Smad4	pCMV5	humane Smad4 Sequenz	J. Massague (Sloan Kettering Institute, New York, NY, USA)
Myc-Sp1	pCMV3	humane Sp1 Sequenz	selbst hergestellt

B.1.2.2 In Transfektion eingesetzte siRNA Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete siRNA Oligonukleotide

siRNA Oligonukleotide	Sequenz	Hersteller
Vimentin	5`-GGCGAGGAGAGCAGGAUUUtt-3`	Ambion, Austin, TX, USA
Sp1#1	5`-GGUAGCUCUAAGUUUUGAUtt-3`	Ambion, Austin, TX, USA
Sp1#2	5`-GGUCAUUUCUUUGCUUAUGtt-3`	Ambion, Austin, TX, USA
Kontrolle	Silencer Negative Control #2 siRNA	Ambion, Austin, TX, USA

B.2 Arbeiten mit DNA

B.2.1 Klonierung des Myc-Sp1 Konstrukts

Um das Myc-Sp1 Konstrukt herzustellen, wurde das volle-Länge-Sp1 Konstrukt pGEX-3/Sp1 (erhalten von Gina Ciocco-Schmitt Department of Microbiology and Molecular Cell Biology, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA, USA) über die EcoRI Restriktionsschnittstelle in das pCMV-Tag 3A Plasmid (Fa. Stratagene) umkloniert.

B.2.2 Restriktionsverdau

In der vorliegenden Arbeit wurden Ausgangsplasmid und Zielvektor in dem folgendem Restriktionsverdau geschnitten:

Ansatz (90µl):

10µg DNA

9µl Puffer2 (Fa. NEB)

3µl EcoRI (Fa. NEB)

Inkubation: 2h bei 37°C

B.2.3 Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des Vektors zu verhindern wurde dessen 5` Ende dephosphoryliert.

Ansatz (50µl):

5µg Vektor

5µl Puffer (Fa. Roche Diagnostics)

2µl Alkalische Phosphatase (Fa. Roche Diagnostics)

Inkubation: 1h bei 37°C

50µl H_2O

25µl STE Puffer

5µl 10% SDS

Inkubation: 15 min bei 68°C

STE Puffer

10mM Tris pH 7,5

1mM EDTA

150mM NaCl

B.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von DNA wurden Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde zu dem jeweiligen Ansatz ein gleiches Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, dieses vermischt, 1 min bei 13000rpm zenrifugiert, die obere, wäßrige Phase abgenommen und der Schritt genauso wiederholt. Anschließend wurde die obere wäßrige Phase mit dem gleichen Volumen an Chloroform /Isoamylalkohol (24:1) versetzt und abzentrifugiert und wiederum die obere, wässrige, DNA-haltige Phase abpipettiert.

B.2.5 Fällung von DNA

Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 3x Volumen an 100% EtOH und 1/10 Volumen an 3M NaAcetat versetzt, mindestens 30 min bei –80°C inkubiert,

mindestens 30 min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert, die Flüssigkeit abgenommen, mit 1 Volumen an 70% EtOH gewaschen und in der SpeedVac getrocknet.

B.2.6 Ligation

Zur Ligation des Inserts mit dem geschnittenen Vektor wurde folgender Ansatz gewählt:

Ansatz (20µl):

0,1pmol	Insert
0,04pmol	Vektor
2µl	Ligase Puffer (Fa. Roche Diagnostics)
1µl	T4 DNA Ligase (Fa. Roche Diagnostics)

Inkubation: über Nacht bei 16°C

B.2.7 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte über ein 1%, mit 5µl/100ml Etidiumbromid (Fa. Sigma) versetztes TAE-Agarosegel bei 80-130mV. Als Laufpuffer diente 1xTAE.

1% Agarosegel

1g	Agarose (Fa. Biozym Diagnostik)
100ml	1xTAE Puffer

1x TAE Puffer

40mM	TrisBase
20mM	Acetat
1mM	EDTA

B.2.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung wurde die DNA aus den Agarosegelen ausgeschnitten und über den „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen) nach Instruktionen des Herstellers isoliert.

B.2.9 Transformation

B.2.9.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* des DH5α Stamms wurde nach der Methode von Morrison, 1975, durchgeführt. Dabei wurde ein Aliquot des Stammes auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert, davon eine Einzelkolonie gepickt und wiederum über Nacht in 10ml LB-Medium inkubiert. 5ml von diesem Ansatz wurden in 200ml LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD_{550} von etwa 0,5 bei 200rpm geschüttelt. Der Ansatz wurde dann für 3 min auf Eis geschwenkt und anschließend 5 min bei 5000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 50ml eiskaltem 0,1M $MgCl_2$ resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Es erfolgte eine Resuspendierung in 5ml eiskaltem 0,1M $CaCl_2$. Daraufhin wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 9ml 0,1M $CaCl_2$ und 1,3ml 14%igem Glycerol aufgenommen, in Reaktionsgefäße aliquotiert, in Flüssig-N_2 schockgefroren und bei –80°C gelagert.

LB-Flüssigmedium (1L)

5g NaCl
5g Hefeextrakt
10g Trypton

B.2.9.2 Transformation

Der komplette Ligationsansatz wurde in den kompetenten *E.coli* Stamm DH5α transformiert. Dazu wurden 200µl Bakterien auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz

hinzu pipettiert und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließen erfolgte für 45 sek ein Hitzeschock bei 42°C, dann wurde 300µl LB-Medium hinzugegeben, die Bakterien für 1 h bei 37°C und 120rpm inkubiert und anschließend auf einer Kanamycin - LB - Medium Platte (1ml/L Kanamycin) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Kanamycin-haltige LB-Festmedium für die Bakterienplatten wurde hergestellt, indem Flüssigmedium mit 2% Agar (Fa. Duchefa Biochemie) und 1ml/L Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich) versetzt wurden.

B.2.10 Plasmidpräparation

Einzelne Kolonien die auf der Kanamycin - LB - Medium Platte gewachsen waren wurden gepickt und in 1ml LB/Kanamycin Flüssigmedium überführt. Dieses wurde über Nacht bei 37°C bei 120rpm inkubiert und die Plasmide am nächsten Tag mittels des „NucleoSpin Plasmid Kits“ (Fa. Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers aus den Bakterien aufgereinigt. Zur Isolierung von DNA Plasmiden in größerem Maßstab wurde der „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ (Fa. Qiagen) herangezogen.

B.2.11 Sequenzierung

Aufegreinigte Plasmide wurden von der Firma MWG mittels T3 Forward-Primern (5´ AATTAACCCTCACTAAAGGG 3´) bzw. T7 Reverse-Primern (Reverse: 3´ CGGGATATCACTCAGCATAATG 5´) sequenziert.

B.3 Luciferase Reportergen Assay

Für den Luciferase Reportergen Assay wurden jeweils $5x10^4$ Zellen in 24-well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden 50ng - 100ng der entsprechenden Konstrukte in einem Dreifachansatz in die Zellen transfiziert. Dabei diente die Luciferase aus *Photinus pyralis* („Firefly“) als Reportergen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden stets 15ng des „Renilla“ Reporterkonstrukts, welches die Luciferase der *Renilla reformis* exprimiert, kotransfiziert. 48 h später wurden die Zellen geerntet, mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 100µl 1x Passive Lysis Buffers (Fa. Promega) unter 15 min Schütteln bei

Raumtemperatur lysiert. Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Substrate für beide Luciferaseenzyme aus dem „Dual-Luciferase®-Reporter Assay System“ (Fa. Promega) nacheinander zugegeben und die Werte mittels eines DLReady™ Luminometer (Fa. Berthold Technologies) photometrisch bestimmt. Die relative Luciferaseaktivität ergab sich dabei aus dem Quotient: Fireflywert/ Renillawert. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen wurden jeweils mit Berechnung der Standarabweichung dargestellt.

Wurde der Reportergenassay in Rahmen einer transienten siRNA Transfektion ausgeführt, wurden je $1{,}5x10^5$ Zellen in 6-well Platten ausgesät, diese in einem ersten Schritt mit den enstprechenden siRNA Oligonukleotiden transfiziert und bei dem sich anschließendem Mediumwechsel eine Reportergentransfektion durchgeführt. Hier wurden entsprechend 0,5µg - 1µg Konstrukte und 150ng Renilla transfiziert. 24 h später wurde die Transfektion der siRNA Oligonukleotid wiederholt.

B.4 Migrationsassay

Um die Zellmigration zu analysieren wurden jeweils $5x10^4$ Zellen in ein 24-well Insert ausgesät und diese mit 300µl serumfreiem bzw. TGFβ-1 versetztem, serumfreien Medium inkubiert. An der Insertunterseite wurden 700µl serumhaltiges Medium in die einzelnen wells zupipettiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und an der Insertunterseite für mindestens 15 min mit Kristallviolett angefärbt. Die im Insert verbliebenen Zellen wurden ausgewischt und die angefärbten, migrierten Zellen an der Insertunterseite im Durchlichtmikroskop (Fa. Zeiss) mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach der Ernte innen ausgewischt und die Insertunterseite für 20 min in 100µl „CellTiterGlo“ Puffer (Fa. Promega) inkubiert. Mit einem DLReady™ Luminometer (Fa. Berthold Technologies) wurde der ATP Gehalt und damit indirekt die Menge der migrierten Zellen photometrisch bestimmt.

Kristallviolettlösung (500ml)

2,5g Kristallviolett (Fa. Sigma)

20% MetOH

B.5 Proliferationsassay

B.5.1 Kristallvoilett-Färbung

Zellen, die parallel zu den Inserts des Migrationsassays in 24 - well Platten ausgesät worden waren, wurden zur Ernte mit 1xPBS gewaschen, mit Kristallviolett angefärbt, 20 min bei RT inkubiert, mit 1xPBS gewaschen, getrocknet und mit 100µl 10% Acetat abgelöst. Die Zellzahl wurde über die Farbintensität der Acetatlösung in einem ELIZA Gerät (Fa. SLT.Spectra) photometrisch bestimmt.

B.5.2 Durchflußzytometer

Für die Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen, trypsiniert und zur Fixierung mit 70% EtOH mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Aufbereitung wurden die Proben einmal mit 1xPBS gewaschen und bei 1500rpm 3 min abzentrifugiert Das Zellpellet wurde in 250µl Puffer B gelöst, 10min unter 100rpm bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, 350µl Puffer C hinzu gegeben und wiederum 10 min unter 100rpm bei RT inkubiert. Die Proben wurden an einem „FACSCalibur“ Durchflußzytometer (Fa. Becton Dickinson) mittels der CellQuest™ Software gemessen und mittels der ModFit LT for MC V2.0™ Software ausgewertet.

Puffer B (350ml)

175mg Trypsininhibitor (Fa. Sigma-Aldrich)

35mg RibonukleaseA (Fa. Sigma-Aldrich)

pH7,6

Puffer C (500ml)

208mg Propidiumiodid (Fa. Sigma-Aldrich)

580mg Spermintetrahydrochlorid (Fa. Sigma-Aldrich)
pH 7,6

B.6 Proteinanalyse

B.6.1 Isolierung von Zellproteinen

Um Proteine aus Zellen zu isolieren wurde bei der Zellernte das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und 250µl Lysepuffer pro 6 - well bzw. 1ml Lysepuffer pro 10mm Dish direkt auf die Zellen gegeben und mindestens 5 min inkubiert. Die Zellen wurden in dem Lysepuffer abgeschabt, in 1,5ml Eppendorf Gefäße überführt und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und bei –20°C gelagert.

Lysepuffer (500ml):
25ml 1M HEPES pH7.5
15ml 5M NaCl
2,5ml 200mM EGTA
100ml 50% Glycerol
5ml Triton100
2,1g NaF
2,23g $Na_4P_2O_7$ $10H_2O$
1 Complete Proteaseinhibitor Tablette (Fa. Roche Diagnostics) pro 10ml: frisch zugeben

B.6.2 Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Bestimmung von Proteinen erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Das Bradford Reagenz (Fa. Biorad) wurde 1:5 verdünnt, je 1ml zu 1µl bis 10µl der zu bestimmenden Probe, bzw. zu 1µg bis 12µg eines BSA-Proteinstandards gegeben und die Lösung bei 595nm im Photometer gemessen.

Die Proteinkonzentration der Probe wurde aufgrund der Eichgeraden des BSA-Standards berechnet.

B.6.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden Panc-1 Zellysate mit Agarosebeads gekoppelten anti-Flag M2 Antikörpern (Fa. Sigma-Aldrich) für drei h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz dreimal mit HNGT Puffer gewaschen, mit 1x Lämmli Puffer versetzt, 5 min. aufgekocht, aufs Western Blot Gel geladen oder bei –20°C aufbewahrt.

HNGT Puffer:

200mM	HEPES pH7,5
600nM	NaCl
40%	Glycerin
0,4%	Triton-X-100

5x Lämmli Puffer:

225nM	Tris/HCL pH6,8
50%	Glycerin
5%	SDS
0,02%	Bromphenolblau (Fa. Sigma-Aldrich)
100mM	DTT

B.6.4 Western Blot Analyse

Protein Extrakte oder Immunpräzipitate wurden auf ein 10% SDS Polyacrylamidgel geladen, durch Elektrophorese in 1x SDS Laufpuffer aufgetrennt, und mittels dem „Semidry Blot“ Verfahren bei 25mA in 1x Blotting Puffer auf eine Nitrocellulose Membran (Fa. Schleicher & Schuell) übertragen. Die Membranen wurden mit 5% Milchpulver für 1 h geblockt, und daraufhin mit dem jeweiligen primären Antikörper für 3 h – über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper waren

1:200 – 1:1000 in 5% Milchpulver verdünnt. Danach wurde die Membran 3x mit 1xTTBS gewaschen, für 1 h der sekundäre, mit „Horseraddish“ Peroxidase (HRP) – gekoppelte Antikörper (Verdünnung in 5% Milchpulver: 1:10000) zugegeben und anschließend nochmals 3x mit 1x TTBS gewaschen. Durch 5-minütige Inkubation mit dem „Lumi-Light Western Blotting Substrate“ (Fa. Roche Applied Science) konnte das darin enthaltene chemilumineszierende Substrat von der HRP umgesetzt und damit die an die Antikörper gekoppelten Proteine auf einem „Cronex“ (Fa AGFA) Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Sekundäre Antikörper	Hersteller
anti-Smad2/3	Fa. Upstate Biotechnology	anti-rabbit	Fa. Amersham Biosciences
anti-Smad4	Fa. Upstate Biotechnology	anti-rabbit	Fa. Amersham Biosciences
anti-β-actin	Fa. Sigma-Aldrich	anti-mouse	Fa. Sigma-Aldrich
anti-Sp1	Fa. Santa Cruz Biotechnology	anti-mouse	Fa. Sigma-Aldrich
anti-Vimentin	Fa. Sigma-Aldrich	anti-mouse	Fa. Sigma-Aldrich
anti-Flag	Fa. Sigma-Aldrich	anti-mouse	Fa. Sigma-Aldrich
anti-Myc anti Vimentin	Fa. Santa Cruz Biotechnology Fa. BD Pharmingen	anti-mouse anti-mouse	Fa. Sigma-Aldrich Fa. Sigma-Aldrich

Trenngel (5ml)

10%	Acrylamid (Acrylamid:N,N-Methylenbisacrylamid;29:1)
1,3ml	Trenngelpuffer
50µl	10% SDS
25µl	10% APS
1,5µl	TEMED

Sammelgel (1,25ml)

140µl	Acrylamid (Acrylamid:N,N-Methylenbisacrylamid;29:1)
325µl	Sammelgelpuffer
12,5µl	10% SDS
6,25 µl	10% APS

1,25µl TEMED

Trenngelpuffer

1,5M Tris/HCL pH8,8

Sammelgelpuffer:

0,5M Tris/HCl pH 6,8

1x SDS Laufpuffer

0,1% SDS

25mM TrisBase

200mM Glycin

5% Milchpulver

5g Milchpulver (Fa. Roth)

100ml 1xTTBS

1x TTBS Puffer

140mM NaCl

2,5mM KCl

25mM TrisBase

pH 7,4

0,1% Tween R 20

1x Transblot Puffer (1L):

14,4g Glycin

3g TrisBase

100ml MetOH

B.6.5 Fluoreszenzmikroskopie

Panc-1 Zellen wurden auf Deckgläschen bzw. „Chamberslides“ (Fa. Falcon) ausgesät und je nach Protokoll transfiziert und/ oder mit TGFβ-1 behandelt. Zur Ernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100% Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen primären (siehe Tabelle 4) und sekundären mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelten (Alexa488, Alexa568, Fa. Invitrogen) Antikörpern, bzw. mit AlexaFluor488 Phalloidin (Fa. Eugene). Die Färbung und die Mikroskopie wurde in Kooperation mit Herrn PD Dr Martin Wagner, Innere Medizin I, bzw. in Kooperation mit Herrn Dr Götz v. Wichert Innere Medizin I ausgeführt.

B.7 DNA-Pulldown Assay

Zellysate wurden mit 2µg biotynilierten doppelsträngigen Oligonukleotiden für 3 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden mit Streptavidin gekoppelte Agarosebeads (Fa. Sigma-Aldrich) hinzugefügt, und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 4°C überkopf geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz bei 1500rpm 1 min abzentrifugiert, 3x mit 1ml Zellysepuffer gewaschen, mit 50µl 2x Lämmli Puffer 5 min. aufgekocht und im Western Blot analysiert.

verwendete Oligonukleotidsequenz aus dem Smad7 Promotor:
5´-AGGGAAGGGGGCGGAGGCGGGAGGCCTTGC-3`

B.8 RNA Analyse

B.8.1 RNA Extraktion

RNA wurde aus den Zellen nach dem Protokoll des Herstellers mittels des „RNeasy Midi Kits“ (Fa. Qiagen) isoliert.

B.8.2 Quantitative Real-Time PCR

B.8.2.1 DNaseI Verdau

Als erster Schritt wurde die im RNA Lysat befindliche DNA nach folgendem Ansatz verdaut:

Ansatz (50µl):

5µl PCR Puffer (Fa. Applied Biosciences)
10µg Gesamt RNA
2µl RNasin (Fa. Promega)
1µl DNase I (Fa. Roche Diagnostics)
Inkubation: 2h bei 37°C

Die Aufreinigung der RNA erfolgte über „RNeasy Mini Säulchen“ (Fa. Qiagen) nach Instruktionen des Herstellers. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA wie unter B1.5. bereits für DNA beschrieben.

B.8.2.2 Reverse Transkription

Zu der gefällten RNA, die in 11µl H_2O aufgenommen wurde, wurde 0,5µg Random Hexamer Oligonukleotide gegeben, der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und folgende Substanzen zugegeben:

Ansatz:

4µl First strand buffer (Fa. Invitrogen Life Technologies)
2µl 0,1 MDTT (Fa. Invitrogen)
1µl dNTP (10mM) (Fa. PEQLAB Biotecnologie)
Inkubation 2 min bei 42°C
1µl Superscript II reverse transcriptase (Fa. Invitrogen)
Inkubation: 1 h bei 42°C, dann 10 min bei 72°C

Die cDNA wurde zur Kontrolle auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

B.8.2.3 Quantitative Real-Time PCR Analyse

Die quantitative Real -Time PCR (qRT-PCR) wurde mittels des „SYBR Green PCR Master Mix“ (Fa. Applied Biosystems) nach den Protokollen des Herstellers angesetzt und mithilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systems analysiert. Spezifische Primer Paare wurden mittels de PrimerExpress® Software (Fa. Applied Biosystems) ausgewählt. CyclophilinA diente als das Referenzgen.

Tabelle 5: In qRT-PCR eingesetzte Primerpaare:

Primer	Sequenz
Smad7 forward	5`-tgctcccatcctgtgtgttaag-3`
Smad7 reverse	5`-tcagcctaggatggtaccttgg-3`
Sp1 forward	5`-aggacccccttgagcttgtc-3`
Sp1 reverse	5`-gccaccaactccttttttcaattt-3`
Vim forward	5`-gccatcaacaccgagttgaag-3´
Vim reverse	5`-cgatgtagttggcgaagcg-3`
CyclinD1 forward	5`-tcttattgcgctgctaccgtt-3`
CyclinD1reverse	5`-actgatcctccaatagcagcaaa-3`
MMP2 forward	5`-gctctacagctaatcagcattctca-3`
MMP2 reverse	5`-tggaatcttaaattaccaggtaggagtg-3`
Fibronectin-1 forward	5`-gttaccgtgggcaactctgtc-3`
Fibronectin-1 reverse	5`-caacggcataatgggaaactg-3`
COL1A1 forward	5`-tgtcttgatgtgtcaccggg-3`
COL1A1 reverse	5`-caccccacccatcacatagat-3`
E-Cadherin forward	5`-acagacatgagccactgcacc-3`
E-Cadherin reverse	5`-cgatggagcgaaactgtctctta-3`
CyclophilinA forward	5`-atggtcaaccccaccgtgt-3`
CyclophilinA reverse	5`-tctgctgtctttgggaccttgtc-3`

B.8.3 Northern Blot

B.8.3.1 Probenvorbehandlung

20µg RNA wurden gefällt, in 15µl Probenpuffer aufgenommen, 6 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde 4µl Ladepuffer zugegeben.

Probenpuffer (1ml):

500µl Formamid deionisiert

167µl Formaldehyd

100µl MOPS Puffer

233µ l H_2O

Ladepuffer:

100µl Ladepuffer

10µl Etbr

B.8.3.2 Gelelektrophorese

Die Proben wurden auf ein 1% Formaldehyd Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese in 1xMOPS Laufpuffer aufgetrennt. Die RNA in dem Gel wurde durch einen Kapillarblot in 20xSSC Puffer über Nacht auf eine Nylon- Hybond^{TM}-N^+ Membran (Fa. Amersham) übertragen. Auf der Membran wurde die 18S und 28S Bande markiert und die RNA durch eine UV Strata Linker (Fa. Stratgene) kovalent an die Membran gebunden.

Northern Blot Gel:

1,5g	Agarose
111ml	H_2O
15ml	10x MOPS
24ml	Formaldehyd

10xMOPS (1L, sterilfiltriert):

42g	3-(N-morpholino)propansulfonsäre
20ml	0.5M EDTA pH8
16,7ml	3M NaAc pH8,8

20xSSC

3M	NaCl
300mM	Nacitrat, pH7

B.8.3.3 Radioaktive Markierung einer DNA Sonde

Für die radioaktive Markierung von DNA Sonden wurde das „Megaprime™ DNA Labelling System“ (Fa. Amersham Biosciences) verwendet und die Sonde nach Angaben des Herstellers mit [α-^{32}P]dCTP (Fa. Amersham) radioaktiv markiert. Anschließend wurde die Sonde über eine „NICK™ Column“ (Fa. Amersham Biosciences) aufgereinigt.

B.8.3.4 Hybridisierung

Die Membran wurde über Nacht in Prähybridisierungspuffer bei 42°C vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und zum Prähybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach wurde die Membran 2x 10 min in 2x SSC/0,1%SDS bei Raumtemperatur und 2 mal 10 min in 0,2SSC/0,1%SDS bei 68°C gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht bei –80°C. Dazu wurden „Cronex“ Röntgenfilme der Fa. AGFA verwendet.

Prähybridisierungspuffer:

50%	Formamid deionisiert
6x	SSC
5x	Denhardt`s
0,5%	SDS
50mM	$NaPO_4$
100µg/ml	tRNA (Fa. Sigma-Aldrich)
75µg/ml	ssDNA (Fa. Sigma-Aldrich)

50x Denhardt`s

1%	Ficoll
1%	Polyvinylpyrrolidon

1% BSA

B.8.3.5 Herstellung der Northern Blot Sonden

Die Northern Blot Sonden wurden durch „TouchDown PCR“, bei der in jedem Zyklus die Annealing Temperatur um 0,2°C verringert wird, hergestellt. Der gesamte PCR Ansatz wurde über ein 1% Agrosegel aufgereinigt.

Ansatz (100µl):

1µl Template
1µl Forward primer (20pmol/µl)
1µl Reverse primer (20pmol/µl)
2µl dNTP
1µl TaqPolymerase
10µl 10xPuffer

PCR Programm

3 Minuten	95°C	
30 Sekunden	95°C	39 Zyklen
30 Sekunden	Annealing Temperatur	
30 Sekunden	72°C	
5 Minuten	72°C	

Tabelle 6: Spezifische Bedingungen und Materialien zur Herstellung der Northern Blot Sonden

Sonde	PCR-Template	Ausgangs-Annealing Temperatur	Forward primer	Reverse primer
Sp1	cDNA (Paca7)	56°C	5`-caatggcttctgagatcagg-3	5`-caaggcatgatggctttag-3`
Vimentin	cDNA (Panc-1)	63°C	5`-tggcacgtcttgaccttgaa-3`	5`-ggtcatcgtgatgctgagaa-3`

B.9 Expressionsprofilanalyse

B.9.1 cDNA Arrays

Für die Expressionsprofilanalyse wurden cDNA Arrays aus den Beständen unserer Arbeitsgruppe verwendet. Dabei handelt es sich um Nylon- Hybond^{TM}-N^{+} Membranen (Fa. Amersham Biosciences), auf die, über PCR amplifizierte, cDNA Klone jeweils doppelt übertragen („gespottet“) wurden. Insgesamt wurden cDNA Klone von 350 ETSs (= expressed sequence tag; Sequenzen, die noch keinem Gen zugeordnet sind) und 2085 verschiedenen Genen auf die Membranen gespottet. Die auf den Arrays aufgebrachten Gene sind im Einzelnen unter www.uni-ulm.de/klinik/medklinik/innere1/passwortschutz/interna/smad_Sp1_complexes.html (user name: Innere1; password: gadler) aufgeführt.

B.9.2 Hybridisierung

Die zu hybridisierenden Sonden wurden aus 10µg Gesamt-RNA isoliert und aus den fogenden drei Gruppen von Zellysaten hergestellt: 1)TGFβ-1 unbehandelte Panc-1 Zellen, 2)TGFβ-1 behandelte Panc-1 Zellen und 3)TGFβ-1/ Mithramycin A behandelte Panc-1 Zellen. Die cDNA wurde mittels Oligo $(dT)_{12\text{-}18}$ Primern und „MMLV Reverse Transkriptase“ (Fa. Ambion) hergestellt. Die radioaktive Markierung wurde unter Verwendung von [α-^{32}P]dATP mittels des Strip-EZ^{TM} RT Kit (Fa. Ambion) durchgeführt. Danach wurde die verbliebende RNA durch Zugabe von 1µl RNaseH (Fa. Invitrogen) für 30 min bei 37°C verdaut und die Sonden über den Nucleotide Removal Kit (Fa. Qiagen) nach Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Vor der Zugabe zu den Membranen wurden die markierten Sonden mit einem „Kompetitionsmix“ versehen, um repetitive Sequenzen auf den zu hybridisierenden cDNA-Molekülen zu maskieren und dadurch eine höhere Bindungsspezifität zu erreichen. Die Hybridisierung wurde in ULTRArray Hyb Puffer (Fa. Ambion) bei 50°C für mindestens 14 h ausgeführt. Anschließend wurden die Filter mit 2 x SSC/ 0.5 % SDS für 5 min bei RT dann mit 0,5 x SSC/ 0.5 % SDS für 15 min bei 67°C und abschließend mit 0.5 x SSC/ 0.5 % SDS für 15 min bei 67°C gewaschen. Alle Hybridisierungen wurden dreifach ausgeführt.

Kompetetionsmix:

50µl	20xSSC
70µl	10mM Tris/HCl pH8
45µl	Human Cot I-DNA (1mg/ml)
20µl	1% SDS

B.9.3 Signalanalyse, Bioinformatik und Statistik

Die radioaktiven Hybridisierungssignale wurden mittels des Storm 8600 PhosphorImager™ (Fa. Molecular Dynamics) aufgezeichnet. Die Bildanalyse und die Quantifizierung erfolgten durch die ArrayVision™ Software. Um den Vergleich mehrere Experimente zu ermöglichen wurde in der Auswertung mit normalisierten Intensitätswerten der Signale gearbeitet. Zur Normalisierung wurde die Differenz zwischen der Signalintensität und dem Hintergrund durch den Mittelwert aller Signale dividiert. Mittelwerte und Standardabweichung, die sich aus den normalisierten Intensitätswerten der Dreifachexperimente ergaben, wurden in Microsoft Excel® berechnet. Gene wurden als differentiell exprimiert definiert, wenn die folgenden Kriterien erfüllt waren: 1) wenn die mittlere, normalisierte Signalintensität in mindestens einer der drei experimentellen Gruppen (TGFβ-1 unbehandelt, TGFβ-1 behandelt und TGFβ-1/Mithramycin A behandelt) über 0.5 lag, 2) wenn das Verhältnis der Signalintensitäten der TGFβ-1 behandelten Gruppe und der unbehandelten Gruppe mindestens 2-fach verschieden war und 3) keine überlappende Standardabweichung der mittleren Intensitätswerte zwischen den beiden ersten Gruppen vorhanden war. Die Cluster Analyse wurde mit der Genesis Software (http://genome.tugraz.at) durchgeführt.

C Ergebnisse

C.1 Vorversuche

C.1.1 Auswahl einer Modellzelllinie

Die Rolle von Sp1 in der TGFβ-1 - vermittelten Transkription während der Pankreastumorgenese sollte an einer Modellzelllinie untersucht werden, die folgende Kriterien erfüllt:

1. Hohe, endogene Expressionslevel von Sp1 und den Smad-Proteinen
2. Intakter, TGFβ-1 induzierbarer Smad Signalweg
3. Gute Transfektionseffizienz

Zur Auswahl einer geeigneten Zelllinie wurden zunächst die mRNA Level von Sp1 in neun verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinen, sowie zur Kontrolle auch in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und in den epithelialen CHO-, Cos7- und Hek293 Zellen untersucht.

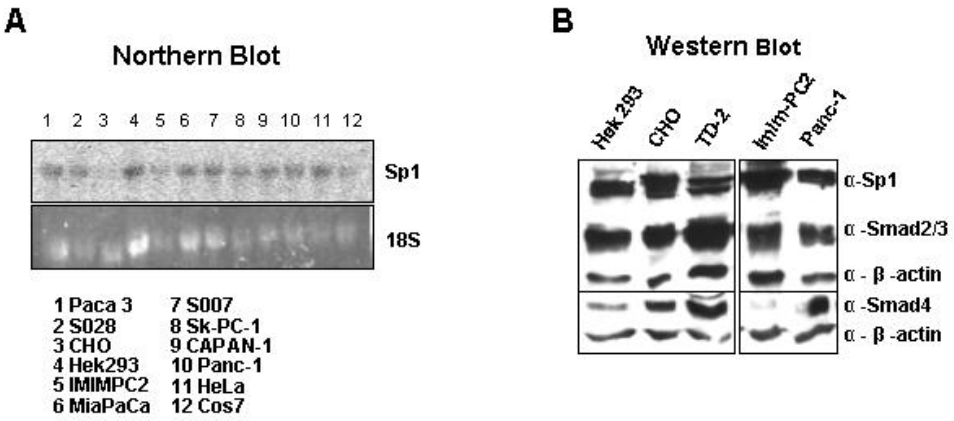


Abbildung 2: Expression von Sp1 und Smad-Proteinen in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien
(A) Northern Blot: Aus den zwölf in der Abbildung genannten Zelllinien wurde mRNA extrahiert und im Northern Blot eingesetzt. Der Northern Blot wurde mit einer spezifischen, humanen Sp1-Sonde hybridisiert. Als Ladungskontrolle diente die 18S RNA Bande. (B) Western Blot: Aus den fünf in der Abbildung genannten Zelllinien wurde Gesamtzellysat isoliert und in einem Western Blot eingesetzt. Der Blot wurde anschließend mit Antikörpern gegen Sp1, Smad2/3, Smad4 und, als Ladungskontrolle, β-actin inkubiert.

Der Northern Blot in Abbildung 2A zeigt, dass sich die Expressionslevel von Sp1, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Beladung, sehr ähnlich waren. Lediglich CHO und Cos7 Zellen wiesen kaum detektierbare Signale auf, was auf die human-spezifische Sp1 Sonde zurückzuführen sein könnte. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Western Blot Analyse, in der mit speziesübergreifenden Antikörpern die endogenen Proteinlevel von Smad2, Smad3, Smad4 und Sp1 in den gut transfizierbaren Zelllinien Panc-1, TD-2, IMIM-PC2, Hek293 und CHO analysiert wurden (Abb. 2B). Hierin war Sp1 und auch Smad2 und Smad3 in allen Zelllinien etwa gleich stark exprimiert, der einzig auffällige Unterschied zwischen den fünf Zelllinien bestand in der fehlenden Expression von Smad4 in den IMIM-PC2 Zellen.

Folglich zeigte sich für diese Zelllinie auch keine Aktivierbarkeit des Smad-responsiven Reporters p3TP-Lux durch TGFβ-1 (Abb. 3A).

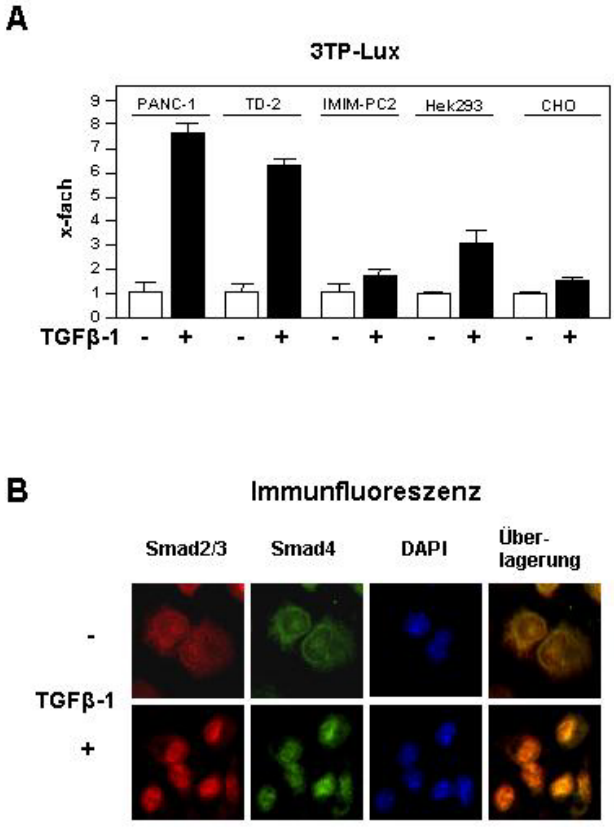


Abbildung 3 (vorherige Seite): Funktioneller TGFβ-1/ Smad Signalweg in Panc-1 Zellen
Reporterassay: Panc-1, TD-2, IMIM-PC2, Hek293 und CHO Zellen wurden mit dem 3TP-Lux Reporterkonstrukt transfiziert, 24 h danach mit 5ng/ml TGFβ-1 behandelt und 24 h später geerntet und lysiert. Dargestellt ist jeweils die durch TGFβ-1 erreichte x-fache Steigerung der Luciferasewerte, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. (B) Immunfluorszenzmikroskopie: Panc-1 Zellen wurden für 24h serumfrei gesetzt, nach einstündiger Behandlung mit 5ng/ml TGFβ-1 fixiert und mit spezifischen ant-Smad2/3 und anti-Smad4 Antikörpern inkubiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt, rote Färbung= Smad2/3, grüne Färbung= Smad4.

Ähnlich schwach waren die relativen Luciferasewerte für die CHO Zellen, und auch in den Hek293 Zellen konnte nur eine ca. 3-fache Aktivierung des Reporterkonstrukts erzielt werden. Dagegen war in den TD-2 Zellen eine ca. 6-fache und in den Panc-1 Zellen eine ca. 8-fache Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Der im Reporterassay nachweislich intakte, gut induzierbare Smad Signalweg der Panc-1 Zellen, ließ sich in Immunfluoreszenzstudien bestätigen (Abb. 3B). Hier zeigte sich, dass Smad2/3 mit Smad4, nach einstündiger Inkubation der Zellen mit TGFβ-1, im Nukleus kolokalisierten.
Zusammenfassend waren sich die Zelllinien bezüglich der Expressionslevel von Sp1 und den Smad-Proteinen, mit Ausnahme von IMIM-PC2, sehr ähnlich. Aufgrund der im Vergleich zu den übrigen, gut transfizierbaren Zelllinien, besten Induzierbarkeit des Smad Signalwegs durch TGFβ-1 und ihrer guten Transfektionseffizienz wurde schließlich die Zelllinie Panc-1 für die folgenden Versuche ausgewählt.

C.1.2 Expression von Sp1 nach TGFβ-1 Behandlung von Panc-1 Zellen

Um festzustellen, ob Sp1 in die Gruppe der Non-Smad Transkriptionsfaktoren eingeteilt werden kann, d.h. ob dessen eigene Transkription durch TGFβ-1 induziert wird und Panc-1 Zellen spezifische TGFβ-1 Effekte über eine vermehrte Sp1 Expression vermitteln können, wurden die Zellen mit 10ng/ml TGFβ-1 behandelt und zu drei verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Aus den Western Blots in Abbildung 4 ist ersichtlich, dass die Expression von Sp1 durch TGFβ-1

unbeeinflusst blieb und Sp1 somit nicht den Non-Smad Transkriptionsfaktoren zugerechnet werden kann.

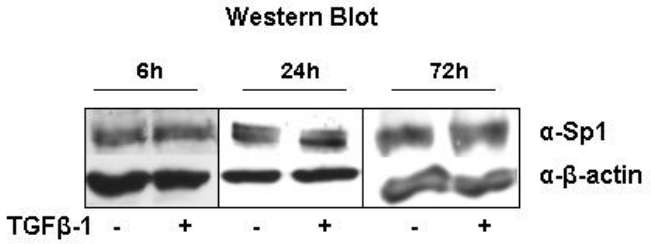


Abbildung 4: Expression von Sp1 in TGFβ-1 behandelten Panc-1 Zellen
Panc-1 Zellen wurden jeweils 6 h, 24 h und 72 h mit 10ng/ml TGFβ-1 behandelt. Das Gesamtzellysat wurde im Western Blot eingesetzt und dieser mit einem spezifischen ant-Sp1 Antikörper inkubiert. Die β-actin Färbung diente als Ladungskontrolle.

C.1.3 Interaktion zwischen Sp1 und den Smad-Proteinen

Vorraussetzung für eine gemeinsame Genregulation von Sp1 und dem TGFβ-1/ Smad Signalweg ist die direkte oder indirekte Wechselwirkung von Sp1 mit den Smad-Proteinen. Um dies zu überprüfen wurden zunächst Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, in denen sich zeigte, dass die Smad-Proteine in Gegenwart von TGFβ-1 in den Nukleus translozieren, wo sie mit Sp1 kolokalisieren (Abb. 5A). Darüber hinaus konnte endogenes Sp1 aus den Lysaten von Panc-1 Zellen mit zuvor transfiziertem Flag-Smad2, Flag-Smad3 und Flag-Smad4 koimmunpräzipitiert werden (Abb 5B). Die physikalische Interaktion der Smad-Proteine mit Sp1 sowie deren nukleäre Kolokalisation weisen auf eine gemeinsame transkriptionelle Aktivität hin.

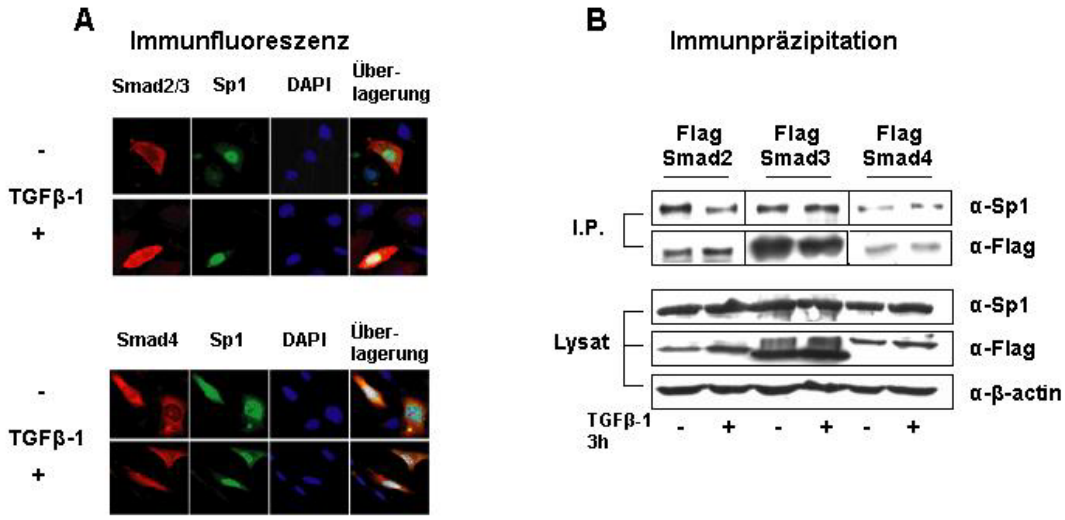


Abbildung 5: Kolokalisation und physikalische Interaktion von Sp1 mit Smad-Proteinen
(A) Immunfluoreszenzmikroskopie: Panc-1 Zellen wurden mit Flag-Smad2,-3,-4 und Myc-Sp1 transfiziert, 24 h serumfrei gesetzt, nach einstündiger Behandlung mit 5ng/ml TGFβ-1 fixiert und mit spezifischen anti-Smad2/3, anti-Smad4 und anti-Sp1 Antikörpern inkubiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt; rote Färbung= Smad2/3, Smad4; grüne Färbung=Sp1. (B) Immunpräzipitation: Panc-1 Zellen wurden in drei verschiedenen Ansätzen jeweils mit Flag-Smad2, Flag-Smad3 und Flag-Smad4 transfiziert. 24 h später wurden die Zellen serumfrei gesetzt und am folgenden Tag nach dreistündiger TGFβ-1 (10ng/ml) Inkubation geerntet, lysiert und die Smad-Proteine über einen an Agarosebeads gekoppelten, Flag spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Im Western Blot wurde an die Smad-Proteine gebundenes Sp1 nachgewiesen. Dargestellt ist außerdem die Western Blot Analyse von Sp1, den Smad-Proteine und β-actin aus den eingesetzten Gesamtzellysaten.

C.2 Regulation früher TGFβ-1 - Zielgene durch Smad-Proteine und Sp1

Um die Beteiligung von Sp1 an der Expression von TGFβ-1 - Zielgenen zu quantifizieren und um neue Zielgene für nähere Promotorstudien zu identifizieren, wurde ein Expressionsprofil von Panc-1 Zellen erstellt. Damit sichergestellt war, dass nur die direkte, Smad - vermittelte Genregulation erfasst wurde, beschränkte sich der Versuchsansatz darauf, die frühen Zielgene von TGFβ-1 zu analysieren. Die transkriptionellen Effekte von Sp1 wurden durch dessen Hemmung mit dem

Wirkstoff Mithramycin A untersucht. Mithramycin A, ein aus *Streptomyces spec*. gewonnenes Antibiotikum, hemmt durch die spezifische Bindung an GC-reiche DNA Elemente die Bindung von Sp1-artigen Transkriptionsfaktoren an ihre Zielpromotoren (Miller, Polansky et al. 1987).

C.2.1 Dosisbestimmung/ Funktionelles Mithramycin A

Zur Bestimmung der optimalen Dosis von Mithramycin A wurden Panc-1 Zellen mit dem artifiziellen Reporterkonstrukt pSp1-Luc transfiziert, welches drei hintereinander geschaltete Sp1 Bindungselemente enthält. Die Aktivierung des Reporters durch kotransfiziertes Sp1 wurde in diesem Ansatz mit steigenden Konzentrationen an Mithramycin A jeweils komplett antagonisiert (Abb. 6). Die minimalste Mithramycin A Konzentration (100nM), die diesen Effekt hervorrief, wurde in der Expressionsprofilanalyse eingesetzt.

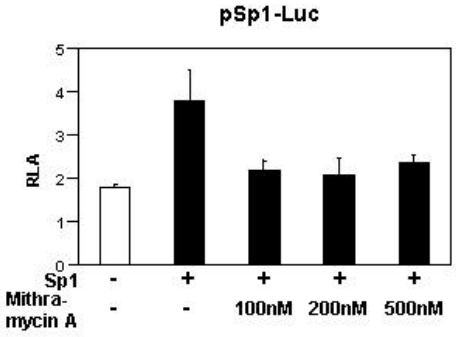


Abbildung 6: Einfluss von Mithramycin A auf die transkriptionelle Aktivität von Sp1
Reporterassay: Panc-1 Zellen wurden mit dem pSp1-Luc Reporterkonstrukt und dem Myc-Sp1 Konstrukt transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Mengen an Mithramycin A inkubiert, 48 h später geerntet, und im Zellysat die relative Luciferaseaktivität bestimmt.

C.2.2 Expressionsprofilanalyse

Die Expressionsprofilanalyse wurde mit speziell angefertigten Arrays unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Diese beinhalten 2435 unterschiedliche Gene, welche aufgrund ihrer Beteiligung an der Kanzerogenese ausgewählt wurden. Die Gene stammen dabei hauptsächlich aus den vier Bereichen: Zellzyklus, Transkription, Signaltransduktion, und extrazelluläre Matrix. Drei verschiedene Gruppen von mRNA aus Panc-1 Lysaten wurden auf den Arrays hybridisiert: 1) unbehandelte Kontrollysate, 2) Lysate aus Zellen, die 1 h vor der Ernte mit TGFβ-1 behandelt worden waren, und 3) Zellysate aus Zellen, bei denen zusätzlich zur einstündigen TGFβ-1 Behandlung eine 20-stündige Vorbehandlung mit Mithramycin A erfolgt war. Die Rohdaten aus dem Ergebniss der Expressionsprofilanalyse sind unter:
www.uni-ulm.de/klinik/medklinik/innere1/passwortschutz/interna/smad_Sp1_complexes.html (user name: Innere1; password: gadler)
abrufbar. Insgesamt waren 43 Gene nach der TGFβ-1 - Behandlung differentiell exprimiert, davon 11 hochreguliert und 32 herunterreguliert (Abb. 7). Für die Mehrheit dieser Gene war der TGFβ-1 Effekt durch die Mithramycin A-Vorinkubation beträchtlich abgeschwächt, was darauf hinweist, dass Sp1 bei deren transkriptioneller Regulation beteiligt sein könnte. In die Gruppe der durch TGFβ-1 hochregulierten Gene fielen einige bekannte TGFβ-1 - Zielgene, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden, darunter die extrazelluläre Martix degradierende, membranassoziierte Matrixmetalloproteinase *MMP11*, das Zellzyklus-regulierende Onkogen *CCND1* und das inhibitorische *SMAD7*.

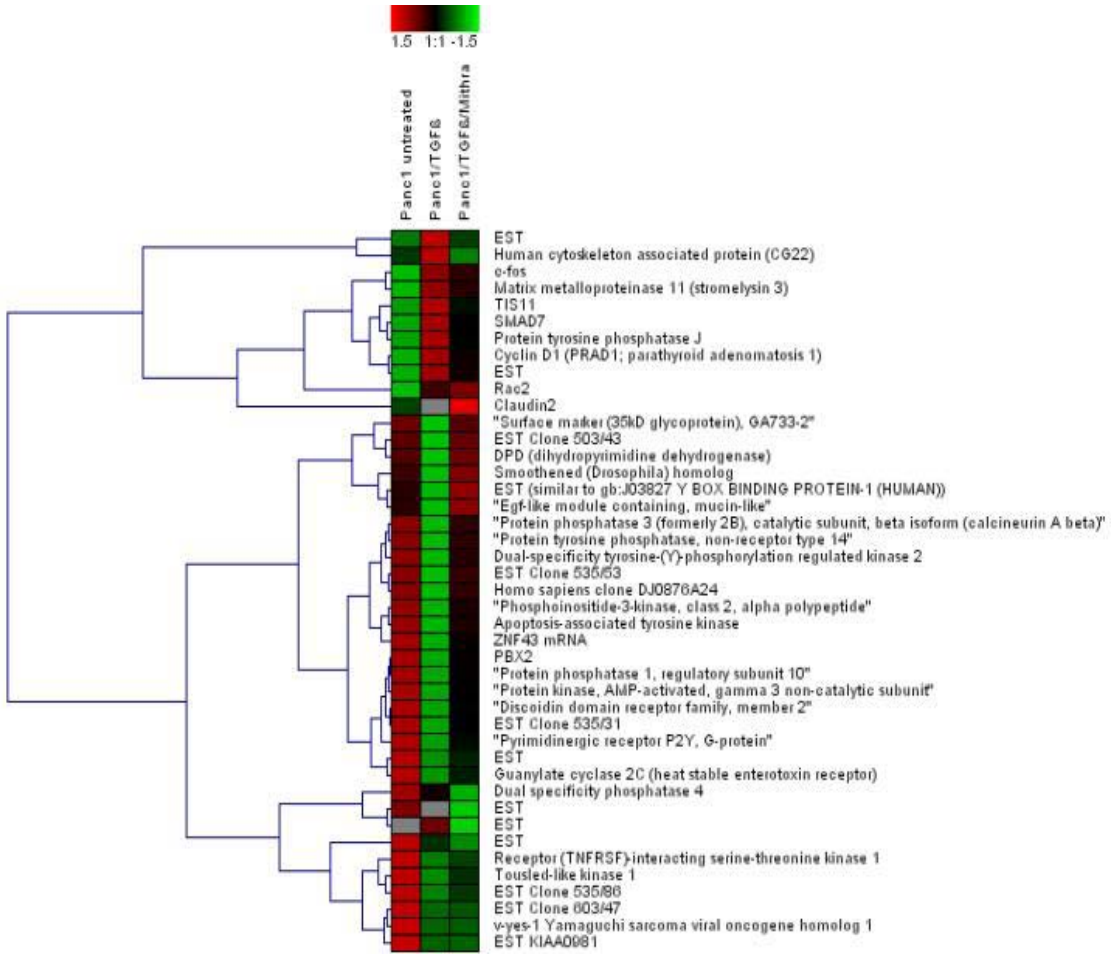


Abbildung 7: Expressionsprofilanalyse von TGFβ-1/ Mithramycin A behandelten Panc-1 Zellen

Panc-1 Zellen wurden jeweils unbehandelt, nach einstündiger TGFβ-1 Behandlung (10ng/ml) bzw. nach zwanzigstündiger Vorinkubation mit 100nM Mithramycin A und anschließender, einstündiger TGFβ-1 Behandlung (10ng/ml) geerntet. Die aus den Zellen extrahierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und auf den unter Material und Methoden beschriebenen Arrays hybridisiert. Gene die nach der TGFβ-1 Behandlung differentiell reguliert waren, wurden in einem hierarchischen Cluster analysiert, wobei die Pearson Korrelation als Ähnlichkeitsmaß herangezogen wurde. Die einzelnen Gensignale wurden bezogen auf die durchschnittlichen Signalintensitäten der Arrays normalisiert. Grüne Kästchen entsprechen einer niedrigen Expression, rote Kästchen einer hohen Expression, und schwarze Kästchen einer mittelmäßigen Expression.

C.2.3 Quantitative RT-PCR zur Bestätigung des Expressionsprofils

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Expressionsprofilanalyse wurden die mRNA Level von CylinD1 und Smad7 in einem unabhängigen Ansatz, mittels der quantitativen RT-PCR, analysiert. Auch mit dieser Methode zeigte sich eine deutliche Beeinflussung des TGFβ-1 Effektes durch Mithramycin A, im Falle von *S*mad7 wurde die TGFβ-1 - vermittelte Induktion der mRNA sogar vollständig aufgehoben (Abb. 8).

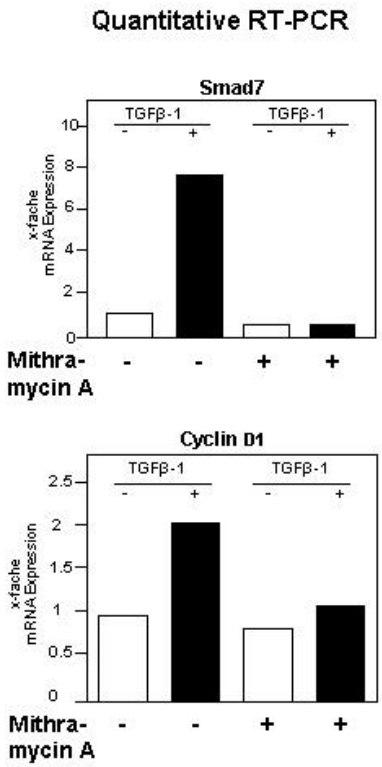


Abbildung 8: Quantitative RT-PCR von TGFβ-1/ Mithramycin A behandelten Panc-1 Zellen
cDNA aus Zellen die wie unter (Abb. 7) beschrieben mit TGFβ-1 und Mithramycin A behandelt worden waren, wurden in quantitativen RT-PCRs eingesetzt, in denen die relative mRNA Expression von Smad7 (oben) bzw. CyclinD1 (unten) ermittelt wurde.

C.3 Transkriptionelle Regulation von Smad7

Aus den differentiell regulierten Genen der Expressionsprofilanalyse wurde repräsentativ *SMAD7* ausgewählt, um an dessen Promotor den genauen Mechanismus der Regulation früher TGFβ-1 - Zielgene näher zu bestimmen. Smad7 ist in vielen Pankreaskarzinomzellen, welche die TGFβ-1 - vermittelte Wachstumsinhibition verloren haben, überexprimiert und wird mit vermehrter Tumorprogression in Verbindung gebracht (Kleeff, Ishiwata et al. 1999). Der genaue Mechanismus der zu der transktiptionellen Aktivierung von Smad7 in Pankreaskarzinomzellen führt ist noch nicht vollständig geklärt und sollte daher im Rahmen der folgenden Experimente detailliert untersucht werden.

C.3.1 Bedeutung von Smad-Proteinen, Sp1 und deren Bindungselemente für die Regulation des Smad7 Promtors

Der murine Smad7 Promotor beinhaltet, wie von Brodin et al. beschrieben, ein Smad Bindungselement (SBE) und vier GC-reiche Sp1 Bindungsstellen (Brodin, Ahgren et al. 2000)(Abb. 9A). Deren Bedeutung für die Aktivierbarkeit des Smad7 Promotors sollte zunächst in Reporterassays untersucht werden. Für die Promotorstudien stand das pGL725-Luc Reporterkonstrukt zur Verfügung, welches die Basenpaare –613 - +112 des proximalen Smad7 Promotors umfasst (Abb. 9A). Dieses Konstrukt konnte in Panc-1 Zellen durch die Behandlung mit TGFβ-1 signifikant aktiviert werden (Abb. 9B). Weitere Reporterassays zeigten außerdem dass diese Aktivierung durch die Smad-Proteine vermittelt wurde, (Abb. 9C,D) und dass eine Kotransfektion aller drei Smad-Proteine, verglichen mit der Smad3/4 Kombination, keine Steigerung der Reporteraktivität erbrachte (Abb. 9C). Daraus lässt sich schließen dass Smad2 zu der Induktion des Smad7 Promotors keinen wesentlichen Beitrag leistet. Somit konzentrierten sich die folgenden Versuche darauf, die Interaktion von Smad3 und Smad4 mit Sp1 am Smad7 Promotor zu analysieren.

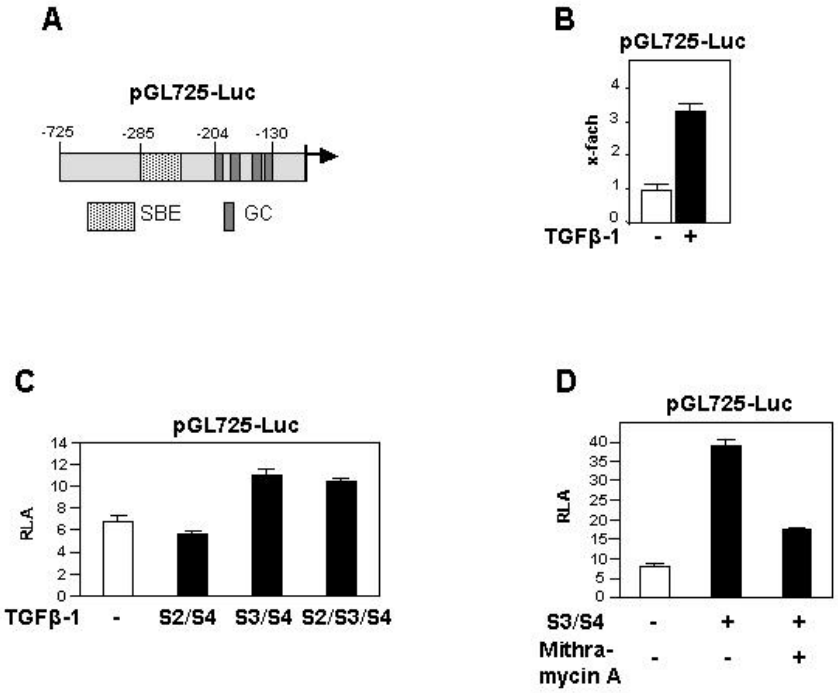


Abbildung 9: Bedeutung von TGFβ-1, Smad-Proteinen und Sp1 für die Regulation des Smad7 Promotors
(A) Schema des pGL725 Smad7 Reporterkonstruktes, SBE= Smad Bindungselement, GC= GC-reiche Sp1 Bindungselemente.
Reporterassays: (B) Panc-1 Zellen wurden mit dem pGL725-Luc Repoterkonstrukt transfiziert und für 24 h mit 10ng/ml TGFβ-1 behandelt. (C) Zusätzlich zum pGL725-Luc Reporterkonstrukt, wurden Smad-Proteine in den unter dem Diagramm bezeichneten Kombinationen kotransfiziert. (D) Nach der Transfektion des pGL725 mit Flag-Smad3 und Flag-Smad4 wurden die Panc-1 Zellen mit 100nM Mithramycin A behandelt. Die Zellen aus den Reprterassays in (B), (C), und (D) wurden jeweils 48 h nach der Transfektion lysiert und die Luciferaseaktivität entweder als x-fache Induktion durch TGFβ-1 (B) oder als relative Luciferaseaktivität dargestellt (C,D).

Als erster Schritt sollte die in den vorangegangenen Versuchen gefundene hemmende Wirkung von Mithramycin A auf die TGFβ-1 - vermittelte Induktion der Smad7 mRNA Expression (Abb. 8) auf Promotorebene, im Reporterassay, bestätigt werden. Der Versuchsansatz aus Abbildung 9D zeigt, dass durch Mithramycin A die Smad3/4 - vermittelte Aktivierung des Smad7 Reporterkonstruktes um ca. 60% gehemmt wurde.

Um die Bedeutung der Sp1 Bindungselemente direkt zu erfassen, wurden in den folgenden Reporterassays Deletionskonstrukte des pGL725-Luc verwendet, bei

denen jeweils das SBE, die GC-Boxen bzw. beide Promotorelemente deletiert sind (Abb 10A). Die Kotransfektion dieser Konstrukte mit Smad3/4 in Panc-1 Zellen ergab, dass eine maximale Aktivierung nur mit dem Wildtypkonstrukt zu erzielen war. Die Deletion des SBEs führte zu einer ca. 50% Reduktion der Aktivierbarkeit durch Smad3/4. Am meisten Einfluss hatte jedoch die Deletion der Sp1 Bindungselemente: Die Smad3/4 - vermittelte Aktivität des pGL725delGC blieb knapp unter dem Basallevel des Wildtypkonstruktes. Dass beide Elemente für die Induktion des Smad7 Promotors essentiell sind, zeigt das Ergebnis des Doppeldeletionskonstrukts. Hier sank der Basallevel auf 1/4 des Smad7 Wildtyppromotors und eine Smad3/4 - vermittelte Induktion war nicht mehr möglich (Abb. 10B).

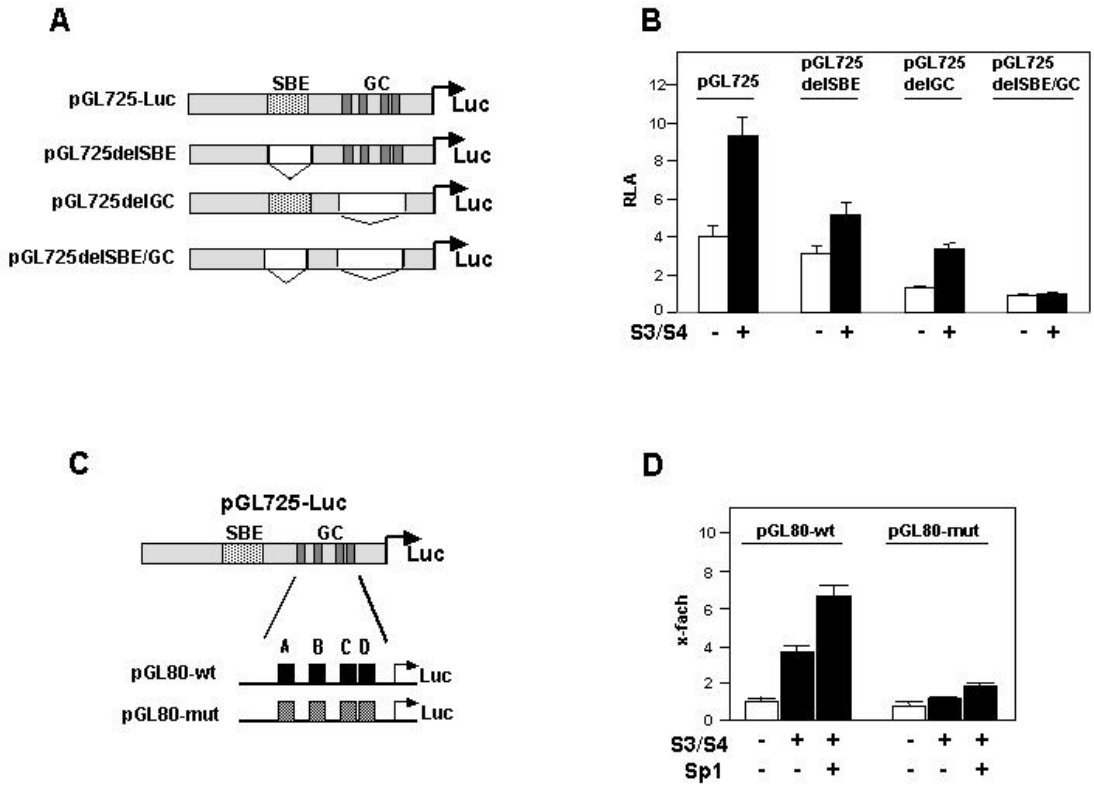


Abbildung 10 (vorherige Seite): Bedeutung der Sp1- und Smad Bindungselemente für die Regulation des Smad7 Promotors
Reporterassays: (A) Schema des pGL725-Luc zusammen mit den daraus klonierten Deletionskonstrukten. SBE= Smad Bindungselement, GC= GC-reiche Sp1 Bindungselemente. (B) Panc-1 Zellen wurden jeweils mit den unter (A) schematisierten Smad7 Konstrukten und gegebenenfalls (+) mit Flag-Smad3 und Flag-Smad4 transfiziert. In den 48 h später geernteten Zellysaten wurde die relative Luciferasewerteaktivität bestimmt. (C) Darstellung der Reporterkonstrukte pGL80-wt und pGL80-mut, die nur den proximalen Smad7 Promotor einschließlich der vier GC-Boxen (A-D) beinhalten, welche in pGL80-mut durch Punktmutationen (grau gepunktet) inaktiviert wurden (D). Reporter: Panc-1 Zellen wurden mir dem unter (C) schematisierten pGL80-wt und pGL80-mut und verschiedenen Kombinationen an Smad3/4 und Sp1 kotransfiziert. Im Diagramm ist die x-fache Luciferaseaktivität gegenüber der pGL80-wt Kontrolle dargestellt.

Die funktionelle Relevanz der Sp1 Boxen wurde durch den Einsatz der Reporterkonstrukte pGL80-wt und pGL80-mut näher untersucht. Das pGL80-wt Reporterkonstrukt beinhaltet die vier GC-Boxen des Smad7 Promotors, welche im pGL80-mut durch Punktmutationen inaktiviert sind (Abb. 10C). Aus dem Diagramm in Abbildung 10D ist ersichtlich, dass pGL80-wt, ähnlich dem S7delSBE, trotz fehlendem SBE durch Smad3/4 aktivierbar war. Die Kotransfektion von Sp1 führte zu einer signifikant Steigerung dieser Aktivierung. Das pGL80-mut Konstrukt hingegen war weder durch Smad3/4 noch durch Sp1 aktivierbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Beteiligung von Sp1 an der Smad - vermittelten Aktivierung des Smad7 Promotors hin. Da die Smad-Proteine selbst nicht an GC-reiche Promotorelemente binden können, lässt insbesondere der Reporterassay in Abbildung 10D eine indirekte Bindung der Smad-Proteine an den Smad7 Promotor vermuten. Dass diese indirekte DNA Bindung der Smads u.a. durch Sp1 vermittelt sein könnte, legt der Reporterassay unter Einsatz von Mithramycin A (Abb. 9D) nahe, in welchem durch die Hemmung der Sp1 - DNA Bindung, die Smad3/4 - vermittelte Aktivierung des pGL725-Luc stark abgeschwächt wurde.

C.3.2 Einfluss von TGFβ-1 auf die Bindung von Sp1 an den Smad7 Promoter

Nach Erhebung der Reporterdaten wurde die Smad3/4-Sp1 Interaktion an der Smad7 Promotor Sequenz mittels der DNA-Pulldown Methode detailliert

untersucht. Dazu wurde ein DNA-Oligonukleotid, welches die GC-Boxen A und B des Smad7 Promotors umfasst, mit Zellysat von TGFβ-1 behandelten bzw. unbehandelten Panc-1 Zellen inkubiert. Anschließend wurden die an das Oligonukleotid gebundenen Proteine im Western Blot nachgewiesen. In Abbildung 11 wird deutlich, dass die Stimulation der Zellen mit TGFβ-1 zur Bindung von Smad3/4 an das Smad7-Promotor Oligonukleotid führt und gleichzeitig die Bindung von Sp1 verstärkt wird.

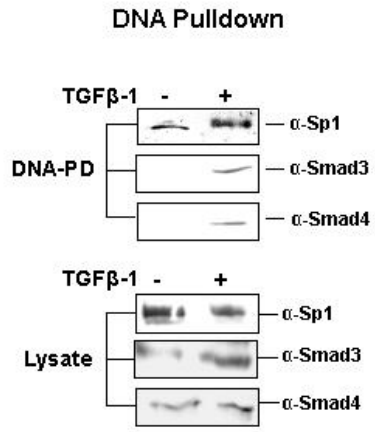


Abbildung 11: Einfluss von TGFβ-1 auf die Bindung von Sp1 an den Smad7 Promotor
DNA-Pulldown: Ausgehungerte Panc-1 Zellen wurden nach einstündiger TGFβ-1 Behandlung geerntet, die Lysate mit einem biotinyliertem Oligonukleotid dass die GC-Boxen A und B des Smad7 Promotors umfasst, inkubiert und durch Streptavidin-gekoppelte Agaorsebeads präzipitiert. Das Präzipitat wurde im Western Blot mittels der entsprechenden Antikörper auf Sp1, Smad3 und Smad4 hin untersucht. Darunter ist der Kontroll- Western Blot gezeigt, in dem die Gesamtmengen an Sp1, Smad3 und Smad4 im Zellysat bestimmt wurden.

C.3.3 Bedeutung von endogenem Sp1 für die Regulation des Smad7 Promotors

Um die Relevanz von endogenem Sp1 für die Aktivierung des Smad7 Promotors zu ermitteln, wurde endogenes Sp1 mittels der siRNA Methode ausgeschalten (Abb. 12). Die transiente Transfektion von Sp1-spezifischen siRNA Oligonukleotiden führte auf Proteinebene vor allem durch Transfektion des

Sp1siRNA#1 Oligonukleotids zu einer deutlichen Reduktion der Sp1 Level. Sp1siRNA#1 wurde daher in den folgenden Versuchen verwendet.

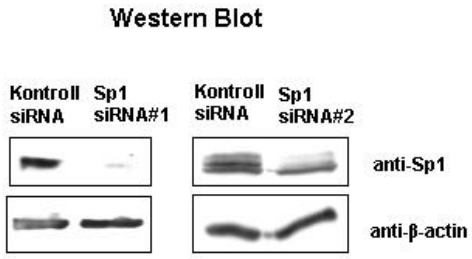


Abbildung 12: Etablierung der transienten Sp1siRNA Transfektion
Gesamtzellysat von Panc-1 Zellen, die zuvor mit KontrollsiRNA bzw. Sp1siRNA#1 und Sp1siRNA#2 Oligonukleotiden transfiziert worden waren, wurde auf die Expression des Sp1 Proteins hin untersucht.

Der Beitrag, den Sp1 zu der TGFβ-1 - vermittelten Aktivierbarkeit des Smad7 Promotors leistet, wird aus dem Reporterassay in Abbildung 13A ersichtlich. Endogenes Sp1 war nötig um die basale Aktivierung des pGL725-Luc aufrecht zu erhalten. Die Smad3/4 - vermittelte Induktion des Smad7 Promotors erreichte ohne Sp1 nur ca. 30% der Induktion der mit KontrollsiRNA transfizierten Zellen.

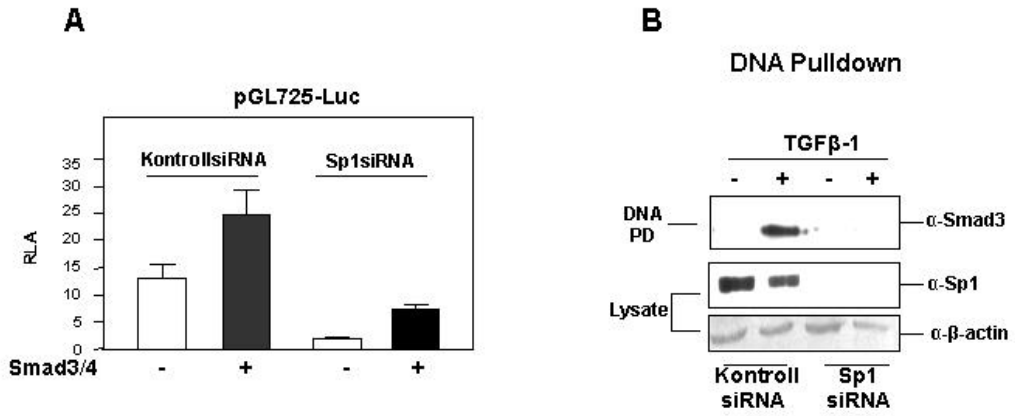


Abbildung 13 (vorherige Seite): Bedeutung von endogenem Sp1 für die Smad - vermittelte Aktivierung des Smad7 Promotors
(A) Reporterassay: Panc-1 Zellen wurden mit KontrollsiRNA bzw. Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert und anschließend das pGL725 Reprterkonstrukt gegbenenfalls (+) zusammen mit Flag-Smad3 und Flag-Smad4 kotransiziert. Aus den lysierten Zellen wurden die relativen Luciferasewerte ermittelt. (B) DNA-Pulldown: Panc-1 Zellen wurden nach Transfektion von Kontroll- und Sp1siRNA nach dreistündiger TGFβ-1 Behandlung geerntet, die Lysate mit einem biotinyliertem Oligonukleotid, das die GC-Boxen A und B des Smad7 Promotors umfasst, inkubiert und durch Streptavidin-gekoppelte Agarosebeads präzipitiert. Das Präzipitat wurde im Western Blot mittels des entsprechenden Antikörpers auf Smad3 hin analysiert. Unter dem Pulldown Ergebnis ist der Kontroll- Western Blot gezeigt, in dem die Gesamtmenge an endogenem Sp1 im Zellysat bestimmt wurde.

Ohne endogenes Sp1 war es darüber hinaus nicht mehr möglich im DNA-Pulldown Experiment eine Bindung von Smad3 an die Promotorboxen A und B nachzuweisen (Abb. 13B). Dies spricht, zusammen mit den vorausgegangenen Ergebnissen (Abb. 9D, Abb. 10D), für eine indirekte Bindung von Smad3/4 an den Smad7 Promotor, welche durch Sp1 vermittelt wird. Die Bildung des Smad3/4-Sp1 Komplexes führt zu einer vermehrten Bindung von Sp1 an die GC-Boxen A/B (Abb. 11) und nur so ist die maximale Induktion des Smad7 Promotors durch TGFβ-1 gewährleistet.

C.4 Bedeutung von endogenem Sp1 für die Prozesse der TGFβ-1 - vermittelten Tumorgenese

Wie bereits in Einleitung erwähnt, ist TGFβ-1 an vielen Prozessen der Tumorprogression beteiligt, darunter an der EMT und an der Zellmigration. Im Folgenden sollte daher analysiert werden, ob Sp1 an diesen TGFβ-1 - vermittelten Prozessen mitwirkt und welche transkriptionelle Mechanismen zugrunde liegen.

C.4.1 Migration

Zur Bestimmung des Anteils von Sp1 an der TGFβ-1 - vermittelten Migration wurde die transiente Sp1siRNA Transfektion im Migrationsassy angewandt. Es zeigte sich, dass eine Reduktion des endogenen Sp1 Levels mit einer

signifikanten Verminderung der TGFβ-1 - vermittelten Migration in Panc-1 Zellen einherging (Abb. 14A).

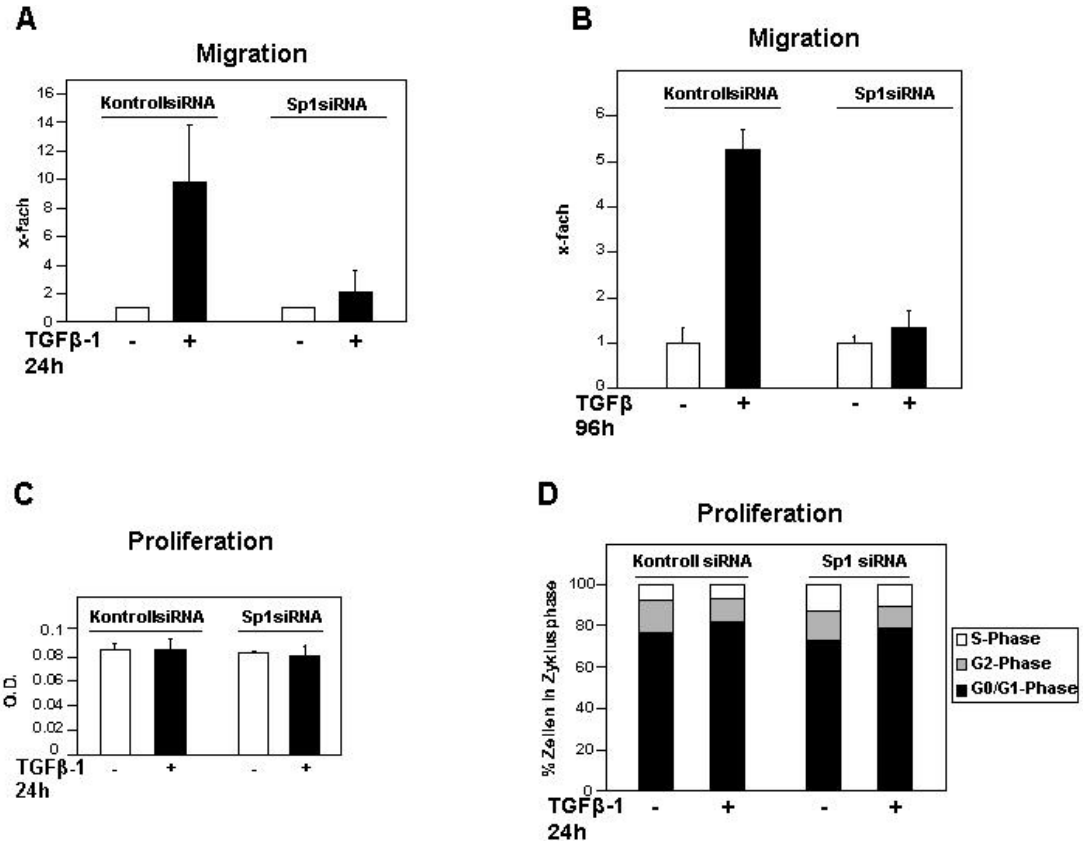


Abbildung 14: Bedeutung von endogenem Sp1 für die TGFβ-1 - vermittelte Zellmigration
(A) Migrationsassay: Panc-1 Zellen wurden mit KontrollsiRNA und Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert, und 24 h nach der letzten Transfektion serumfrei gesetzt, anschließend trypsiniert und in einem Dreifachansatz jeweils $5x10^4$ Zellen pro Insert ausgesät. Die Zellen wurden 24h lang mit oder ohne 10ng/ml TGFβ-1 inkubiert, danach fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und die migrierten Zellen an der Insertunterseite ausgezählt. Dargestellt sind die relativen Migrationsraten bezogen auf die TGFβ-1-unbehandelte Kontrollen (weiß) aus zwei unabhängigen Ansätzen. (B) Migrationsassay: Panc-1 Zellen wurden mit KontrollsiRNA und Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert, und 24 h nach der letzten Transfektion serumfrei gesetzt, gegebenenfalls (+) 72 h mit 10 ng/ml TGFβ-1 behandelt, anschließend trypsiniert und in einem Dreifachansatz jeweils $5x10^4$ Zellen pro Insert ausgesät. Die Zellen wurden weitere 24h mit oder ohne TGFβ-1 inkubiert, danach fixiert, mit Kristallviolett angefärbt und die migrierten Zellen an der Insertunterseite ausgezählt. Auch hier sind die Migrationsraten relativ zu den TGFβ-1 unbehandelten Kontrollen (weiß) aufgeführt. (C) Proliferationsassay: Panc-1 Zellen wurden, wie in (A) beschrieben transfiziert, anschließend 24 h lang mit 10ng/ml TGFβ-1 behandelt, fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und deren Proliferationsrate durch die Messung der optischen Dichte (O. D.) bestimmt. (D) Proliferationsassay. Panc-1 Zellen wurden wie unter (C) beschrieben transfiziert, mit TGFβ-1 inkubiert, mit 70% EtOH fixiert und, zur Bestimmung der Zellzyklusphasen, in der Durchflußzytometrie eingesetzt.

Dieser Effekt hielt bis zu 96h nach der Sp1siRNA Transfektion an (Abb. 14B). Wie die parallel durchgeführten Proliferationsassays zeigten, waren die Migrationseffekte nicht auf eine Änderung der Zellproliferation zurückzuführen (Abb. 14C,D). Vielmehr scheint die transkriptionelle Regulation von TGFβ-1 - Zielgenen, die an der Migration beteiligt sind, durch die Abwesenheit von Sp1 gestört zu sein. Diese Hypothese sollte als nächstes für mehrere Gene überpfüft, und gegebenenfalls deren transkriptionelle Regulation genau untersucht werden

C.4.2 Expression von EMT/Migrations - relevanten Gene

Im Folgenden wurde die Expression von fünf EMT- bzw. Migrations-assoziierten Genen mittels quantitativer RT-PCR hinsichtlich des Einflusses von Sp1 an deren TGFβ-1 - vermittelter transkriptioneller Regulation überprüft (Abb. 15).

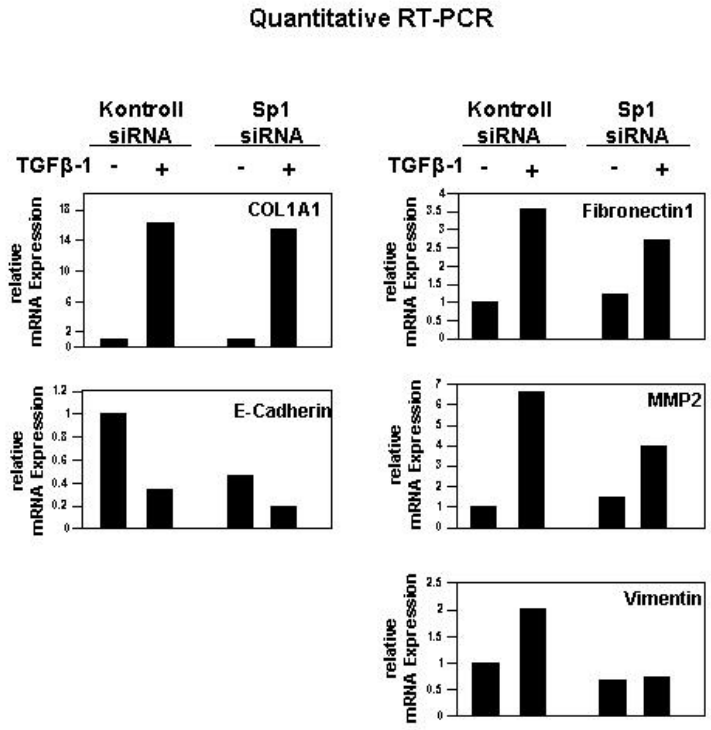


Abbildung 15: Bedeutung von endogenem Sp1 für die TGFβ-1 - vermittelte Expression EMT- und migrationsrelevanter Gene
cDNA aus der mRNA von Panc-1 Zellen, die zuvor mit den KontrollsiRNA bzw. Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert und anschließend mit TGFβ-1 behandelt worden waren, wurde zur Analyse der relativen mRNA Expression von Fibronectin-1, MMP2, Vimentin, Collagen1A1 und E-Cadherin eingesetzt.

Da die verminderte Zellmigration in Gegenwart von Sp1siRNA frühestens nach 24-stündiger TGFβ-1 Behandlung zu beobachten war, wurde in diesem Versuchansatz, nach der transienten Transfektion von Sp1siRNA, die gleiche Inkubationszeit gewählt. Von den untersuchten Genen wurde *Col1A1*, kodierend für die α1-Untereinheit von Collagen1, stark durch TGFβ-1 induziert, was durch das Ausschalten von Sp1 nahezu unbeeinflusst blieb. Im Falle von E-Cadherin, zeigte sich eine Herunterregulation der mRNA durch TGFβ-1. Hier führte die Gegenwart von Sp1siRNA zu einer deutlichen Abnahme des basalen mRNA Levels, doch der TGFβ-1 Effekt blieb unbeeinflusst. Dagegen wiesen Fibronectin1 (FN1), die Matrixmetalloproteinase2 (MMP2), und Vimentin durch die Transfektion von Sp1siRNA eine Reduktion der TGFβ-1 - vermittelten Induktion der jeweiligen mRNA auf. Hierbei war der Anstieg der Expression im Vergleich zur Negativkontrolle für FN1 etwa um 30% und für MMP2 um ca. 50% reduziert, während der basale mRNA Level von Vimentin in Gegenwart von Sp1siRNA reprimiert wurde und durch TGFβ-1 nicht mehr induziert werden konnte.

C.5 Transkriptionelle Regulation und funktionelle Bedeutung von Vimentin in Pankreaskarzinomzellen

C.5.1 Auswahl des Vimentin Promotors

Wie aus C.4.2. hervorgeht, wurde die TGFβ-1 - vermittelte Expression unter allen untersuchten Genen am deutlichsten bei *MMP2* und *VIM* durch Sp1siRNA gehemmt. Daher wurde als nächstes überprüft, ob die Promotoren dieser beiden Gene für nähere Studien über den transkriptionellen Mechanismus ihrer Regulation geeignet wären. Die jeweiligen Promotorsequenzen beinhalten in beiden Fällen mehrere potentielle, GC-reiche Sp1 Bindungsstellen. Während der Vimentin Promotor darüber hinaus ein vollständiges Smad Bindungselement enthält (5`-CAGAC-3`), weist der MMP2 Promotor nur verkürzte putative SBE (5`-CAGA-3`) auf (Abb. 16A).

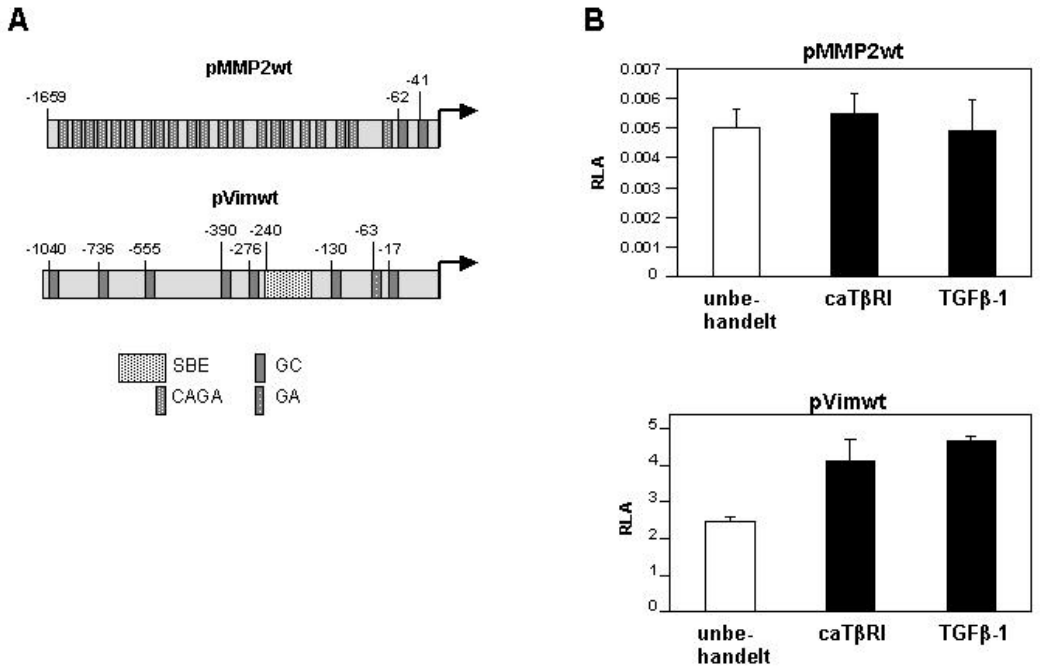


Abbildung 16: TGFβ-1 - vermittelte Aktivierung der MMP2- und Vimentin-Reporterkonstrukte
(A) Schematische Darstellung des pVimwt und des pMMP2wt Reporterkonstrukts. SBE= Smad Bindungselement, GC= GC-reiches Sp1 Bindungselement, CAGA= verkürztes Smad Bindungselement, GA= GA-reiches Sp1 Bimdungselement.
(B) Reporterassays: Panc-1 Zellen wurden mit dem pMMP2 bzw. dem pVimwt Reporterkonstrukt transfiziert, mit dem konstitutiv aktivem TβRI (caTβRI) kotransfiziert, bzw. mit 10ng/ml TGFβ-1 behandelt. In Zellysaten wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt.

In Reporterassays zeigte sich, dass die Aktivität des Vimentin Wildtyp Reporterkonstruktes durch Kotransfektion von konstitutiv aktivem TβRI bzw. durch Behandlung mit TGFβ-1 verdoppelt werden konnte (Abb. 16B). Dagegen wurde das MMP2 Wildtyp Reporterkonstrukt weder durch Kotransfektion von konstitutiv aktivem TβRI noch durch TGFβ-1 Behandlung aktiviert. Aufgrund dieser Ergebnisse konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf den Mechanismus der transkriptionellen Regulation des Vimentin Promotors durch TGFβ-1 und Sp1 sowie auf die funktionelle Bedeutung von hochreguliertem Vimentin in Pankreaskarzinomzellen.

C.5.2 Regulation der TGFβ-1 - vermittelten Transkription von Vimentin

C.5.2.1 Einfluss von endogenem Sp1 auf die TGFβ-1 - vermittelte Expression von Vimentin

Die hemmende Wirkung von Sp1siRNA auf die TGFβ-1 - vermittelte Induktion der Vimentin mRNA zeigte sich neben der quantitativen RT-PCR aus Abbildung 15 auch in der Northern Blot Analyse (Abb. 17A). Hier fand sich zwar ein leichtes Anheben des mRNA Levels von Vimentin durch TGFβ-1 in Gegenwart von Sp1siRNA, dieses war jedoch deutlich schwächer als in der untransfizierten Kontrolle.

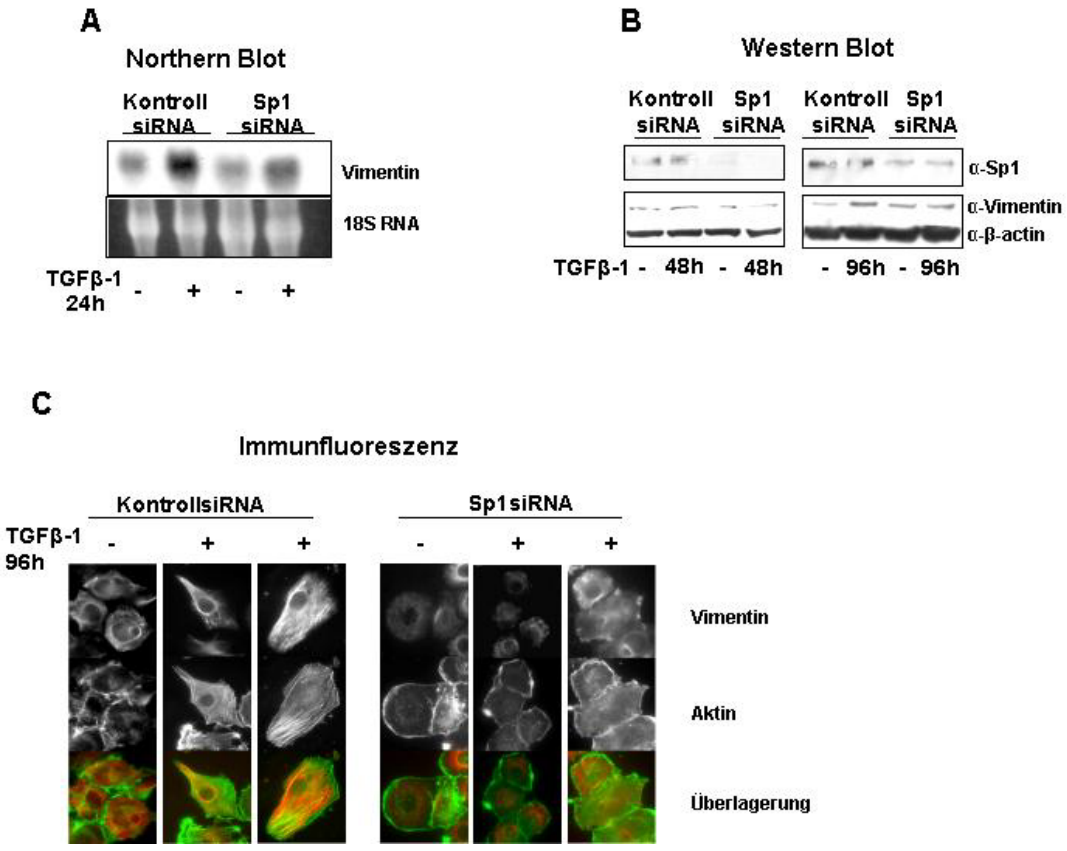


Abbildung 17 (vorherige Seite): Bedeutung von endogenem Sp1 für die TGFβ-1 - vermittelte Expression von Vimentin
(A) Northern Blot: Panc-1 Zellen, wurden mit den KontrollsiRNA bzw. Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert, 24 h nach der zweiten Transfektion serumfrei gesetzt und 8 h später über Nacht mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Die aus den Zellen extrahierte mRNA, wurde im Northern Blot eingesetzt und mit einer Vimentin - spezifischen Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle ist die 18S RNA Bande dargestellt. (B) Western Blot: Panc-1 Zellen wurden wie unter (A) transfiziert und jeweils 24 h bzw. 96 h mit 10 ng/ml TGFβ-1 behandelt. Die Gesamtzellysate wurden im Western Blot aufgetragen und die Expression von Sp1 bzw. Vimentin mittels spezifischer Antikörper bestimmt. Als Ladekontrolle erfolgte jeweils ein β-actin Nachweis. (C) Immunfluorszenzmikroskopie: Panc-1 Zellen wurden wie unter (A) transfiziert und 96h mit TGFβ-1 behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen anti-Vimentin Antikörper bzw. mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin inkubiert, rote Färbung= Vimentin, grüne Färbung = Aktin.

Auf Proteinebene wurde die Expression von Vimentin in Western Blots überprüft. Panc-1 Zellen wurden jeweils nach transienter Transfektion mit Sp1siRNA 48h bzw. 96h mit TGFβ-1 behandelt. Für beide Zeitpunkte ließ sich ein deutliches Absenken der Sp1 Protein Level durch Sp1siRNA beobachten (Abb. 17B). Die Expression von Vimentin wies nach 48h TGFβ-1 Behandlung keine signifikante Änderung auf. Auch der Einsatz von Sp1siRNA zeigte zu diesem Zeitpunkt kaum Einfluss. Nach 96 h erhöhte sich die Proteinexpression von Vimentin durch TGFβ-1, was in Panc-1 Zellen mit niedrigem Sp1 Level nicht möglich war. Dieses Ergebnis konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (Abb. 17C). In diesem Experiment war in Gegenwart von siRNASp1 ebenfalls keine TGFβ-1 bedingte Induktion von Vimentin zu beobachten. Darüber hinaus wird in Abbildung 17C deutlich, dass Anzeichen der TGFβ-1 - induzierten EMT, wie die Ausbildung von Aktin Stressfasern und die Auflösung des Zellverbandes, nach Ausschalten von Sp1 unterbleiben.

Es scheint, dass eine signifikante, TGFβ-1 - vermittelte Expression von Vimentin Intermediärfilamenten erst nach über 48h sichtbar wird. Der späte, hemmende Effekt der Sp1siRNA ist darauf zurückzuführen, dass zunächst der Sp1 Level ausreichend gesenkt werden muss, bevor sich dieser auf die Sp1/ Smad - vermittelte Aktivierung des Vimentin Promotors auswirkt. Aus den Ergebnissen in Abbildung 17 wird insgesamt deutlich, dass Sp1 in der TGFβ-1 - vermittelten Expression von Vimentin eine wichtige Rolle spielt.

C.5.2.2 Bedeutung der Smad-Proteine und Sp1 für die Aktivierung des Vimentin Promotors

Mithilfe des Vimentin Wildtyp Reporterkonstruktes (pVimwt), das die Basenpaare -1417 - +71 des proximalen Promotors umspannt, wurde zunächst geprüft ob der Smad Signalweg zur TGFβ-1 - vermittelten Induktion des Promotors genutzt wird. Dazu wurden verschiedene Kombinationen an Smad2, Smad3 und Smad4 mit dem pVimwt in Panc-1 Zellen kotransfiziert (Abb. 18A). Es zeigte sich, dass die Smad-Proteine in der Lage waren pVimwt zu aktivieren und eine Kombination aller drei Smad-Proteine dabei am wirkungsvollsten war.

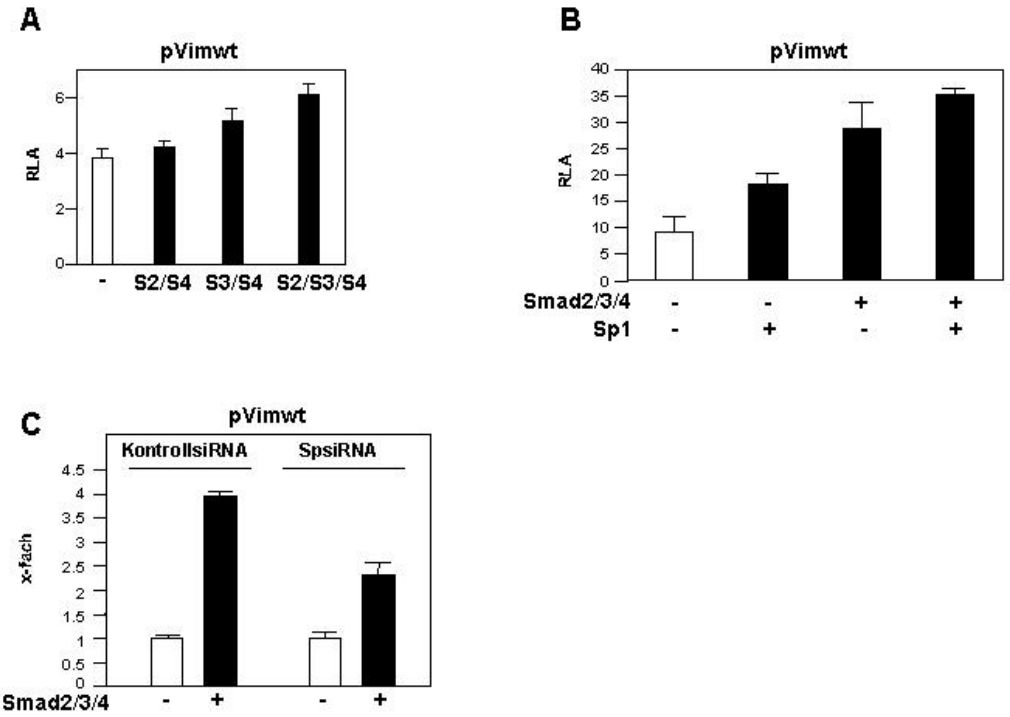


Abbildung 18: Bedeutung von Sp1 und den Smad-Proteinen für die Regulation des Vimentin Promotors
Reporterassays: (A) Panc-1 Zellen wurden mit pVimwt transfiziert, mit verschiedenen Kombinationen an Flag-Smad Konstrukten kotransfiziert und nach der Zellyse die relative Lucifreaseaktivität bestimmt. (B) Zusätzlich zu pVimwt wurden die angegebenen Flag-Smad Konstrukte und das Myc-Sp1 Konstrukt in verschiednen Kombinationen kotransfiziert. Anschließend wurde die relative Lucifreaseaktivität gemessen. (C) Reporterassay: Panc-1 Zellen wurden mit KontrollsiRNA bzw. Sp1siRNA Oligonukleotiden transfiziert und anschließend das pVimwt Reprterkonstrukt gegebenenfalls (+) zusammen mit Flag-Smad2, Flag-Smad 3 und Flag-Smad4 kotransfiziert. Im Diagramm ist die x-fache Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (weiß) dargestellt.

Im folgenden Versuch wurde gemessen wieviel die Smad-Proteine und Sp1 jeweils zu der TGFβ-1 - vermittelten Aktivierung des Vimentin Promotors beitragen. Aus Abbildung 18B geht hervor, dass durch eine Kotransfektion von pVimwt mit den Smad-Proteinen und Sp1, mit einer ca. vierfachen Steigerung der Luciferaseaktivität gegenüber der Kontrolle die effizienteste Aktivierung des Reporters erzielt werden konnte. Demgegenüber wiesen die Smad-Proteine bzw. Sp1 einzeln für sich transfiziert nur eine Verdoppelung bzw. eine Verdreifachung der Reporteraktivität auf. Dass endogenes Sp1, im Umkehrschluss, für die maximale Aktivierbarkeit des Vimentin Promotors durch die Smad-Proteine essentiell war, ist aus dem Reporterassay in Abbildung 18C ersichtlich. Hierin reduzierte sich die Smad - vermittelte Induktion von pVimwt durch das Absenken endogener Sp1 Level mithilfe von Sp1siRNA, um ca. 50%.

C.5.3 Bedeutung von endogenem Vimentin für die TGFβ-1 - vermittelte Migration

In den unter C.4.1. beschriebenen Migrationassays sind Panc-1 Zellen in ihrer TGFβ-1 - vermittelten Motilität von Sp1 abhängig. *VIM*, ein Gen das vor allem als mesenchymaler Marker der EMT von Bedeutung ist, wurde von einigen Arbeitsgruppen ebenfalls mit Migration in Verbindung gebracht. Um zu überprüfen, ob der in Abbildung 14 beobachtete Effekt unter anderem mit der Herunterregulation von Vimentin in Zusammenhang steht, wurde die transiente Transfektion eines Vimentin-spezifischen siRNA Oligonukleotids (VimsiRNA) in Panc-1 Zellen etabliert, und anschließend in Migrationsassays eingesetzt.
Aus Abbildung 19 geht hervor, dass mit der gewählten VimsiRNA Sequenz eine deutliche Abschwächung der endogenen mRNA von Vimentin erreicht werden konnte. In der quantitativen RT-PCR Analyse war ein Absinken des mRNA Levels um ca. 50% zu beobachten (Abb. 19A); im Northern Blot wird die abgeschwächte Expression besonders in der TGFβ-1 - vermittelten Induktion deutlich (Abb. 19B). Ein ähnliches Muster zeigte sich in der Western Blot Analyse (Abb. 19C). Auch hier sank in Gegenwart von VimsiRNA die basale Proteinexpression und stieg auch nach 72-stündiger TGFβ-1 Behandlung nicht an.

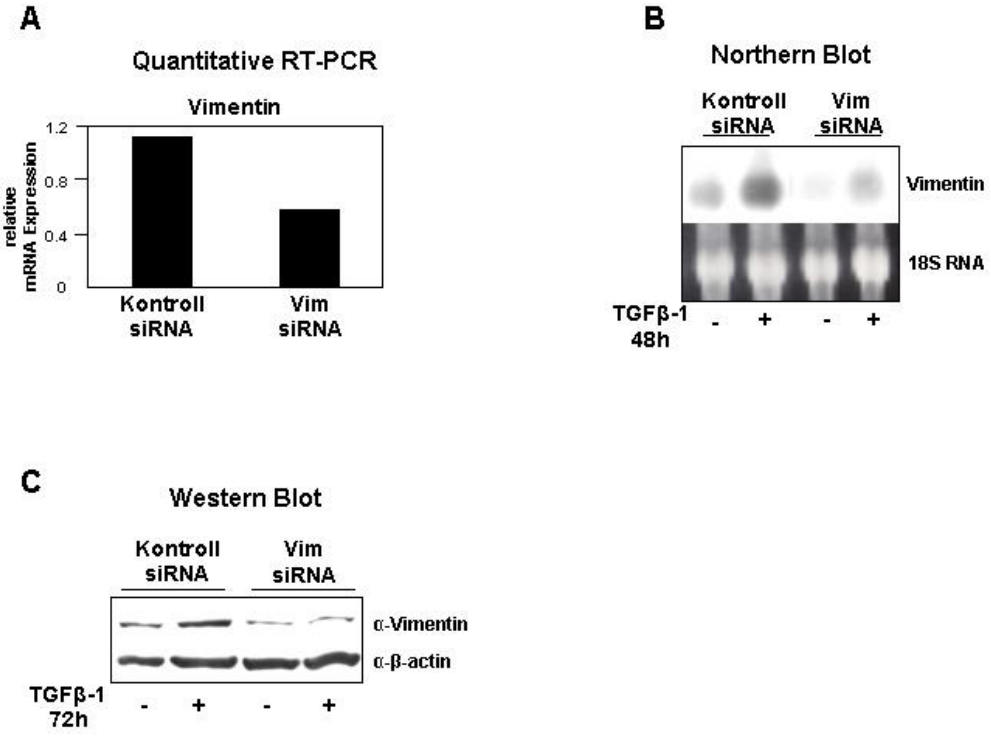


Abbildung 19: Etablierung der transienten VimsiRNA Transfektion
(A) Quantitative RT-PCR: cDNA aus der mRNA von Panc-1 Zellen, die zuvor mit KontrollsiRNA bzw. VimsiRNA Oligonukleotiden transfiziert worden waren, wurde zur Analyse der mRNA Expression von Vimentin in der quantitativen RT-PCR eingesetzt. (B) Northern Blot: Panc-1 Zellen, wurden mit KontrollsiRNA und VimsiRNA Oligonukleotiden transfiziert, 24 h nach der zweiten Transfektion serumfrei gesetzt und für 48 h mit 10 ng/ml TGFβ-1 inkubiert. Die aus den Zellen extrahierte mRNA, wurde im Northern Blot eingesetzt und mit einer Vimentin-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle ist die 18S RNA Bande dargestellt. (C) Western Blot: Die Zellen wurden wie unter (B) beschrieben transfiziert. Die TGFβ-1 Behandlung erfolgte über 72 h. Aus den Zellen wurde Gesamtzellysat gewonnen und im Western Blot eingesetzt. Dieser wurde mit anti-Vimenin und, als Ladekontrolle, mit anti-β-actin Antikörpern inkubiert.

Eingesetzt in den Migrationsassay, wiesen die mit VimsiRNA transfizierten Panc-1 Zellen eine schlechtere Induktion der Migrationsrate durch TGFβ-1 gegenüber der Negativkontrolle auf (Abb. 20). Es scheint daher dass Vimentin auch in den Panc-1 Zellen für die TGFβ-1 - vermittelte Migration von Bedeutung ist.

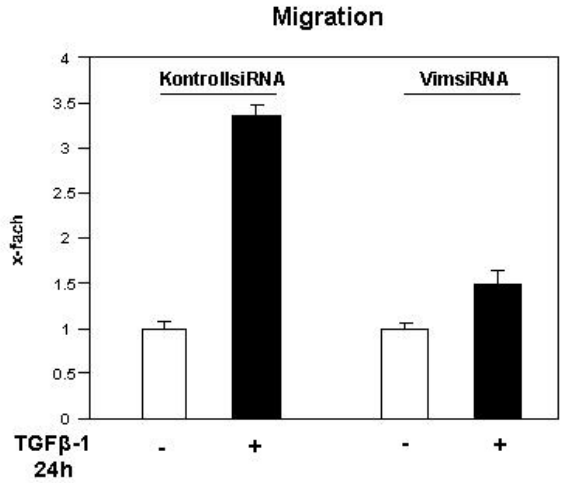


Abbildung 20: Einfluss von endogenem Vimentin auf die TGFβ-1 - vermittelte Zellmigration
Migrationsassay: Panc-1 Zellen wurden mit KontrollsiRNA bzw. VimsiRNA Oligonukleotiden transfiziert, 24 h nach der letzten Transfektion serumfrei gesetzt, anschließend trypsiniert und jeweils $5x10^4$ Zellen pro Insert ausgesät. Die Zellen wurden 24 h lang mit oder ohne 10ng/ml TGFβ-1 inkubiert, danach durch Cell Titer Glow an der Insertunterseite fixiert und die Zellzahl photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die relativen Migrationsraten bezogen auf die TGFβ-1-unbehandelten Kontrollen (weiß).

Da ein ähnlicher Effekt auch nach dem Ausschalten der Sp1 Expression beobachtet wurde (Abb. 14) und in der Folge nachgewiesen wurde, dass Sp1 an der Smad - vermittelten Induktion von Vimentin beteiligt ist, könnte der durch Sp1siRNA verursachte Migrationsdefekt teilweise durch die Dysregulation des Vimentin Promotors erklärt werden.

D Diskussion

TGFβ-1 ist ein multifunktionales Cytokin, welches auf gesunde Epithelzellen und während früher Tumorstadien antiproliferativ wirkt. Im fortschreitenden Tumor geht der wachstumshemmende Effekt von TGFβ-1 verloren und das Cytokin trägt aktiv zu promalignen Prozessen wie der EMT, Tumorzellinvasion und -migration bei. Die Ursachen dieser veränderten Wirkungsweise von TGFβ-1 sind neben genetischen Mutationen von Mitgliedern der TGFβ-1 Signalkaskade vor allem in einer Modulation des transkriptionellen Kontextes zu suchen. Da zur Smad - vermittelten Regulation von TGFβ-1 - Zielgenen transkriptionelle Partnerproteinen erforderlich sind, ist die zelluläre Antwort auf TGFβ-1 abhängig von den in der jeweiligen Zelle vorhandenen aktiven Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren, die an den Zielpromotoren mit den Smad-Proteinen transkriptionell aktive Komplexe eingehen können. Im Laufe der Tumorentstehung führen vielschichtige Veränderungen im Netzwerk der Signaltransduktionskaskaden, in das der TGFβ-1 Signalweg eingebunden ist, zu einer neuen Zusammensetzung von aktiven Transkriptionsfakotren, die als Partnerproteine der Smad-Proteine eine tumorfördernde, TGFβ-1 - vermittelte Genregulation begünstigen. Ein Smad Partnerprotein, das u. a. mit karzinogener Genregulation in Verbindung gebracht wird, ist der Transkriptionsfaktor Sp1 (Lou, O'Reilly et al. 2005; Wang, Guan et al. 2005; Zannetti, Del Vecchio et al. 2005). Einige Promotoren, deren Regulation die Smad-Proteine gemeinsam mit Sp1 steuern, wurden bereits beschrieben (Datta, Blake et al. 2000; Feng, Lin et al. 2000; Pardali, Kurisaki et al. 2000; Zhang, Ou et al. 2000; Poncelet and Schnaper 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von Sp1 als Smad Partnerprotein in der promalignen Genregulation von Pankreaskarzinomzellen aufgeklärt werden. Dazu wurden neue, tumorrelevante Gene identifiziert, an deren TGFβ-1 - vermittelter Induktion Sp1 beteiligt ist, sowie der detaillierte Mechanismus der gemeinsamen transkriptionellen Aktivität untersucht.

D.1 Sp1 - artige Transkriptionsfaktoren sind im Pankreaskarzinom an der TGFβ-1 - vermittelten Genregulation beteiligt

Die Rolle von Sp1 in der TGFβ-1/Smad - vermittelten Genregulation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Zelllinie Panc-1 untersucht, da diese alle wichtigen Kriterien einer Modellzelllinie, d. h. einen intakten TGFβ-1/Smad Signalweg und eine hohe endogene Expression von Sp1 und den Smad-Proteinen, erfüllt. Darüber hinaus konnte sicher gestellt werden, dass TGFβ-1 nicht in die Expression von Sp1 eingreift und ein solcher Einfluss in den folgenden Experimenten nicht berücksichtigt werden musste.

Mittels der Expressionsprofilanalyse wurden einige interessante frühe TGFβ-1 - Zielgene identifiziert, bei deren Expression Sp1 potentiell von Bedeutung ist. Bei 37 von 43 TGFβ-1-regulierten Genen hatte eine Vorbehandlung mit Mithramycin A einen antagonisierenden Effekt. Dies lässt darauf schließen, dass die DNA-Bindungsaktivität von Sp1-artigen Transktriptionsfaktoren für die korrekte TGFβ-1 - vermittelte Regulation dieser Gene essentiell ist. Im Falle der 32 durch TGFβ-1 supprimierten Gene ist denkbar, dass Mithramycin A die Bindung von Sp1-artigen transkriptionellen Repressoren an die jeweiligen GC-Boxen der Promotoren hemmt. Eine Vorinkubation der Panc-1 Zellen mit Mithramycin A führte außerdem bei 10 der insgesamt 11, durch TGFβ-1 aktivierten Gene zu einer, um durchschnittlich 51%, abgeschwächten Expression, was mit einer Inhibition der Sp1 Bindung an die Promotoren dieser Gene in Zusammenhang stehen könnte. In dieser Gruppe befanden sich auch onkologisch bedeutsame Gene: die ECM degradierende Proteinase *MMP11*, das Zellzyklus-regulierende Onkogen *CCDN1* und das inhibitorische *SMAD7*. MMP11 wird hauptsächlich im Stroma von invasiven Tumoren exprimiert, was vor allem im Mamma-, Basalzell-, Kolorektal-, und Kopf-Hals-Karzinom mit schlechten Prognosen assoziiert ist (Basset, Bellocq et al. 1990; Polette, Clavel et al. 1993; Porte, Chastre et al. 1995; Unden, Sandstedt et al. 1996). Einer Studie von Marschall et al. zufolge, wird MMP11 im Pankreaskarzinom zu ca. 30% von den Tumorzellen selbst produziert und ist in einigen Pankreaskarzinomzelllinien, darunter Panc-1, überexprimiert (von Marschall, Riecken et al. 1998). Bislang konnte nur in Osteoblasten und

Fibroblasten eine Induktion durch TGFβ-1 nachgewiesen werden (Delany and Canalis 2001). Zwei GC-reiche Boxen im proximalen Mauspromotor lassen dabei auf eine Beteiligung von Sp1 schließen (Ludwig, Basset et al. 2000).

Cyclin D1, ein Zellzyklusprotein welches den Übergang von der G0 in die G1 Phase reguliert, ist in einigen Pankreaskarzinomzelllinien überexprimiert (Gansauge, Gansauge et al. 1997; Kornmann, Ishiwata et al. 1998). In der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 konnte bereits eine erhöhte Cyclin D1 Expression durch TGFβ-1 nachgewiesen werden (Kornmann, Tangvoranuntakul et al. 1999). Einige Studien zeigen darüber hinaus, dass Sp1 an der Induktion von Cyclin D1 mitwirkt (Castro-Rivera, Samudio et al. 2001; Grinstein, Jundt et al. 2002; Hilton, Li et al. 2005). Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass in der Expressionsprofilanalyse eine Abschwächung des TGFβ-1 Effektes durch eine spezifische Hemmung der Sp1 Bindung an die Promotoren von MMP11 und Cyclin D1 stattgefunden hat.

Erhöhte Smad7 Expressionslevel sind vor allem im Pankreaskarzinom und u. a. auch in Kolonkarzinomzellen, beim Magenkarzinom und beim Plattenepithelkarzinom des Osöphaguses, mit dem Verlust der TGFβ-1 - vermittelten Wachstumshemmung, vermehrter Tumorbildung und schlechter Prognose, assoziiert (Kleeff, Ishiwata et al. 1999; Kim, Lee et al. 2004; Osawa, Nakajima et al. 2004; Halder, Beauchamp et al. 2005). So führt die Überexpression von Smad7 in der Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 zu verstärktem und von der Matrixverankerung unabhängigen Wachstum. Darüber hinaus ist eine Resistenz gegenüber der TGFβ-1 - induzierten Wachstumsinhibition, und verstärkte Tumorbildung im Nacktmausmodell zu beobachten (Kleeff, Ishiwata et al. 1999). Die Ursachen hierfür sind zum einen, aufgrund der Smad7 innewohnenden Funktion, in einer Abschwächung des TGFβ-1/Smad Signals und damit in einer veränderten TGFβ-1 - vermittelten Genregulation zu suchen. Stabile Überexpression von Smad7 führt in Kolonkarzinomzellen zu einer verminderten Bildung des Smad2/3/4 Komplexes, während p38 MAP, Erk und c-Jun als Antwort auf TGFβ-1 phosphoryliert werden. Parallel zu überxprimiertem Smad7 ist keine TGFβ-1 - vermittelte Suppression der Expression von c-Myc, CDK4 und CyclinD1 bzw. Induktion der Expression von

p21 mehr zu beobachten (Halder, Beauchamp et al. 2005). Eine ähnliche wachstumsfördernde Genregulation mit abgeschwächter p15 und p21 Expression sowie einer Hochregulation von Cdc25 als Antwort auf TGFβ-1 fanden Hill et al. in Panc-1 Zellen (Nicolas and Hill 2003). Nicolas und Hill schlagen vor, dass aufgrund erhöhter Smad7 Expression die endogenen TβRI Level reduziert werden, so dass zwar noch eine intakte Komplexbildung von Smad2/3/4 stattfinden kann, aber der Aufenthalt dieses Komplexes im Zellkern zeitlich stark verkürzt ist und dadurch die korrekte Genregulation beeinflusst wird. Der Smad Signaltransduktionsweg ist auch in Smad7 überexprimierenden Colo357 Zellen noch intakt (Boyer Arnold and Korc 2005). Die Daten aus dieser Arbeit legen nahe, dass Smad7 neben seiner Funktion als TGFβ-1-Rezeptordegradator auch durch die Dysregulation von hyperphosphoryliertem Retinoblastomaprotein zum Verlust der TGFβ-1 - induzierten Wachstumshemmung beitragen könnte. Darüber hinaus scheint Smad7 bei der TGFβ-1 - vermittelten Aktivierung der GTPase Cdc42, welche eine Umorganisierung der Aktin Filamente und damit die Ausbildung von Stressfasern zur Folge hat, eine Rolle zu spielen (Edlund, Landstrom et al. 2002).

Zum anderen gibt es Hinweise, dass sich Smad7, trotz fehlendem DNA bindendem β-hairpin, selbst als Transkriptionsfaktor betätigt und beispielsweise an der Expression des tumorfördernden Thioredoxins beteiligt sein könnte (Itoh, Landstrom et al. 1998; Arnold, Ketterer et al. 2004).

Zusammenfassend ist die TGFβ-1-vermitttelte Expression von Smad7 in Pankreaskarzinomzellen für die Tumorprogression von großer Bedeutung. Aufgrund dieser Tatsache und den Ergebnissen vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe in denen interessanterweise nachgewiesen wurde, dass in Pankreaskarzinomzellen die transkriptionelle Suppression des Smad7 Promotors durch den TGFβ-1-Non-Smad Signaltransduktor KLF11 verlorengegangen ist (Ellenrieder, Buck et al. 2004), wurde der Smad7 Promotor ausgewählt um daran den detaillierten Mechanismus der TGFβ-1/ Sp1 - vermittelten transkriptionellen Aktivierung zu untersuchen.

D.2 Die transkriptionelle Aktivierung von Smad7 durch Smad3/4 wird über Sp1 vermittelt

Die transkriptionelle Aktivierung von Smad7 ist ein zentrales Ereignis der negativen Rückkoppelung in der TGFβ-1 Signalkaskade und wurde in diesem Zusammenhang schon eingehend untersucht. So wurde das SBE des murinen Smad7 Promotors erstmals 1999 von Nagarajan et al. beschrieben und die Bindung der Smad-Proteine daran seitdem in den unterschiedlichsten Zelllinien bestätigt (Brodin, Ahgren et al. 2000; Denissova, Pouponnot et al. 2000; Hua, Miller et al. 2000; Stopa, Anhuf et al. 2000; von Gersdorff, Susztak et al. 2000). Auch die in den Panc-1 Zellen vorliegende, für die Aktivierung des Smad7 Promotors relevante Smad3/4 Konstellation, wurde bereits in einigen dieser Arbeiten gefunden (Nagarajan, Zhang et al. 1999; Brodin, Ahgren et al. 2000; Denissova, Pouponnot et al. 2000; Hua, Miller et al. 2000). Jedoch liegen zu der Smad - vermittelten transkriptionellen Aktivierung des Smad7 Promotors im Verbund mit dem Partnerprotein Sp1 bislang nur ungenaue Daten vor. Brodin et al. haben zwar beschrieben, dass Sp1 einen gewissen Anteil an der TGFβ-1 - vermittelten Induktion hat, ohne jedoch den detaillierten Mechanismus aufzuklären (Brodin, Ahgren et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mittels entsprechender Deletionsreporterkonstrukte die Relevanz der auf dem Smad7 Promotor befindlichen SBE bzw. GC-reichen Boxen untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Brodin et al., wurde festgestellt, dass sowohl die GC-Boxen als auch das SBE für die maximale Aktivierung des Smad7 Promotors von Bedeutung ist. Allerdings war die Smad3/4 - vermittelte Aktivierung in Panc-1 Zellen, in denen endogenes Sp1 mit Hilfe der siRNA Technologie ausgeschalten bzw. mittels Mithramycin A an der DNA Bindung gehindert wurde, erheblich eingeschränkt. Interessanterweise wiesen die Ergebnisse weiterer Reporterassays darauf hin, dass eine Induktion des Smad7 Promotors durch Smad3/4 allein über die GC-reichen Boxen, ohne direkte Bindung der Smad-Proteine an die DNA, stattfinden könnte. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationsstudien und DNA-Pulldown Experimente bekräftigen diese Hypothese: Sp1, welches mit den Smad-Proteinen

physikalische Wechselwirkungen einging, band in Gegenwart von Smad3 und Smad4 verstärkt an die GC-reichen Abschnitt des Smad Promotors. Zwar wurde der Einfluss, den TGFβ-1 auf GC-reiche Elemente ausüben kann, indem Smad-Proteine, teilweise unabhängig ihrer eigenen DNA Bindung, die Affinität von Sp1 an den Zielpromotor verstärken, bereits mehrfach an anderen Promotoren beschrieben (Datta, Blake et al. 2000; Pardali, Kurisaki et al. 2000; Poncelet and Schnaper 2001; Wagner, Peters et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch erstmals endogenes Smad3 aus dem Lysat des zu untersuchenden Zellsystems an einem GC-reichen Promotorelement nachgewiesen werden. Zudem beweist das DNA-Pulldown Experiment unter Einsatz von siRNASp1, dass diese Bindung von Smad3 an den Smad7 Promotor spezifisch über endogenes Sp1 erfolgt.

D.3 Der Transkriptionsfaktor Sp1 trägt zur TGFβ-1 - vermittelten Migration und EMT bei

Mithilfe der siRNA Technologie wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, welchen Anteil endogenes Sp1 an TGFβ-1 - vermittelten Prozessen der Tumorprogression hat. Dazu wurde einerseits die Zellmigration untersucht und andererseits die Regulation von Genen, welche für eine, der Migration vorangehenden Änderung des zellulären Phänotyps, der EMT, charakteristisch sind. Zunächst wurde in Migrationsassays erstmals direkt nachgewiesen, dass endogenes Sp1 für die TGFβ-1 - vermittelte Zellmigration in Pankreaskarzinomzellen essentiell ist. In bisherigen Arbeiten war diese Bedeutung von Sp1 nur indirekt, durch dessen Beteiligung an der TGFβ-1 - vermittelten Expression von migrationsrelevanten Genen, wie z.B. den Integrinen, beschrieben worden (Lai, Feng et al. 2000; Kintscher, Lyon et al. 2002).

Bezüglich der Beteiligung von Sp1 an der TGFβ-1 - vermittelten Regulation von EMT- bzw. Migrations-assoziierten Genen, wurde die Expression von fünf Genen mittels qRT-PCR analysiert. Bei *COL1A1*, *FN1* und *MMP2*, welche an der Umgestaltung bzw. Auflösung der extrazellulären Matrix mitwirken, zeigte sich, dass alle, wie in der Literatur beschrieben, durch TGFβ-1 induzierbar waren

(Gress, Menke et al. 1998; Taipale, Saharinen et al. 1998). Das Ausschalten von endogenem Sp1 hatte im Falle von *FN1* und *MMP2* eine verringerte TGFβ-1 - vermittelte Induktion zur Folge.

E-Cadherin, ein wichtiger Marker der EMT, der zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten beiträgt und dessen Suppression mit der Invasivität der Zellen korreliert, wurde, ebenfalls wie erwartet, durch TGFβ-1 herunterreguliert (Miettinen, Ebner et al. 1994; Mareel, Boterberg et al. 1997). Sp1 hatte Anteil an der Aufrechterhaltung des basalen mRNA Levels von E-Cadherin, jedoch keinen Einfluss auf die TGFβ-1-vemittelte Regulation.

Aus der Gruppe der Intermediärfilamente, von denen während der EMT die Zytokeratine durch Typ III Intermediärfilamente ersetzt werden, zeigte sich im Falle von Vimentin eine komplette Aufhebung der TGFβ-1 - vermittelten Induktion in Gegenwart von siRNASp1.

Insgesamt hatte endogenes Sp1 auf die TGFβ-1 - vermittelte Induktion von MMP2 und Vimentin den meisten Einfluss. Da auf Promotorebene das MMP2-Reporterkonstrukt, vermutlich aufgrund methodischer Probleme, durch TGFβ-1 nicht aktivierbar war, konzentrierten sich die folgenden Experimente auf die Analyse der Expression und der Funktion des Intermediärfilaments Vimentin.

D.4 Die TGFβ-1 - vermittelte transkriptionelle Aktivierung von Vimentin erfolgt durch Smad2/3/4 und ist abhängig von endogenem Sp1

Mittels Northern Blot Analyse, der Immunfluoreszenzmikroskopie und dem Western Blot Verfahren konnten bestätigt werden, dass endogenes Sp1 zur TGFβ-1 - vermittelten Expression von Vimentin nötig ist. In Übereinstimmung mit bisherigen Arbeiten, war eine Steigerung des Vimentinlevels in Panc-1 Zellen durch TGFβ-1 auf mRNA Ebene erst nach 24h bzw. auf Proteinebene erst nach 48-72 h deutlich nachweisbar (Ellenrieder, Hendler et al. 2001; Nakajima, Doi et al. 2004). Die späte Expression erklärt auch weshalb Vimentin in der Expressionsprofilanalyse, in welcher die differentielle Genexpression bereits nach einstündiger TGFβ-1 Inkubation untersucht wurde, nicht erfasst wurde.

In Untersuchungen zur Induktion von Vimentin konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass TGFβ-1 den Promotor über eine Kombination aus Smad2, Smad3 und Smad4 transaktiviert. Im Einklang mit den Expressionsstudien führte die Überexpression von Sp1 zu einer zusätzlichen Steigerung der Promotoraktivität. Im Umkehrexperiment war nach Ausschalten von Sp1 die Smad - vermittelte Induzierbakeit des Vimentin Reporterkonstrukts stark abgeschwächt. Diese Ergebnisse belegen, dass endogenes Sp1 für die maximale TGFβ-1/ Smad - vermittelte Induktion des Vimentin Promotors nötig ist. Der Vimentin Promotor enthält einige Elemente über welche Sp1 bzw. die Smad-Proteine potentiell an die DNA binden und die Transaktivität ausüben könnten. Proximal des Startsignals befinden sich ein SBE und sieben putative GC-reiche Sp1 Konsensussequenzen. An Position - 63 — - 55, einem für die Sp1 Bindung untypischen DNA Element mit der Sequenz 5`-GGGAGGGGA-3`, konnte bereits die Bindung von Sp1 und dessen essentielle Bedeutung für die Transaktivierung von Vimentin nachgewiesen werden (Izmailova, Wieczorek et al. 1999; Wu, Zhang et al. 2003; Zhang, Diab et al. 2003). Somit ist denkbar, dass dieses Element, zusammen mit dem SBE, auch in der TGFβ-1 - vermittelten Aktivierung des Vimentin Promotors von Bedeutung ist. Da, wie bereits in den Vorversuchen gezeigt, Sp1 in Panc-1 Zellen mit den Smad-Proteinen interagieren kann, ist zu vermuten, dass die Proteine einen Komplex eingehen um den Vimentin Promotor zu transaktivieren. Einer Studie von Wu et al. zufolge kann Sp1 zur Induktion des Vimentingens auch mit c-Jun wechselwirken (Wu, Zhang et al. 2003). Aufgrund der Zugehörigkeit von c-Jun zur Non-Smad Transkriptionsfaktorfamilie und unter Berücksichtigung der zeitlich verzögerten Expression von Vimentin als Antwort auf TGFβ-1 könnte, neben den Smad-Proteinen, die gesteigerte Expression von c-Jun einen weiteren Weg der TGFβ-1-Sp1 - vermittelten Aktivierung des Vimentin Promotors darstellen.

D.5 Vimentin hat eine Rolle in der TGFβ-1 - vermittelten Zellmigration

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Transfektion von siRNAVimentin nachgewiesen, dass Vimentin in Panc-1 Zellen an der TGFβ-1 - vermittelten Migration beiteiligt ist, und damit, neben seiner Rolle als Marker der EMT, auch eine funktionelle Bedeutung hat.

In einigen Studien wurde bereits beobachtet, dass die Expression von Vimentin mit der Zellinvasion korreliert (Hendrix, Seftor et al. 1996; Polette, Gilles et al. 1998; Singh, Sadacharan et al. 2003). Dass Vimentin darüber hinaus speziell mit der Zellmigration in Zusammenhang steht, wurde schon u. a. in Wound Healing Assays an Vimetin „knockout" Mäusen, sowie an aus diesen Mäusen stammenden Fibroblasten, durch Vimentin - antisense Experimente in der Mammakarzinom-zellinie MCF10A, und in Prostatakrebszelllinien gezeigt (Eckes, Dogic et al. 1998; Gilles, Polette et al. 1999; Eckes, Colucci-Guyon et al. 2000; Lang, Hyde et al. 2002). Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird Vimentin erstmals auch im Pankreaskarzinom direkt mit der Zellmigration in Verbindung gebracht.

Bisher ist wenig darüber bekannt wie Vimentin funktionell zur Zellmigration beitragen könnte. Nach allgemeiner Auffassung besteht die Hauptaufgabe von Vimentin darin, der Zelle mechanische Stabilität zu verleihen, indem es das Zytoskelett versteift und mechanische Zugkräfte abfängt. Maniotis et al. zeigten, dass Vimentin zum mechanischen Signaltransfer zwischen Integrinen und dem endothelialen Nukleus dient, und den Nukleus, wenn Zugkräfte an der Zelle wirken, in Position hält (Maniotis, Chen et al. 1997). Eine verschlechterte mechanische Stabilität könnte schwächere kontraktile Kräfte und damit eine sinkende Motilität zur Folge haben.

Vimentin scheint aber auch für die Organisation des an der Migration beteiligten Mikrofilamets Aktin von Bedeutung zu sein: So findet in PDGF behandelten Endothelien eine gleichzeitige Umverteilung von Vimentin und Aktin statt (Valgeirsdottir, Claesson-Welsh et al. 1998). Inber et al. zeigten, dass die Versteifung des Zytoskeletts durch Vimentin für die Ausbildung von polygonalen Aktinnetzewerken, von denen aus die Filopodien auswärts polymerisieren, wichtig

ist (Ingber, Dike et al. 1994). Fibroblasten aus *vim* -/- Mäusen wiesen außerdem ungewöhnlich gebündelte Atkinfilamente auf und zeigten eine geringere Anzahl an Adhäsionskontakten (Eckes, Dogic et al. 1998).

Überdies scheint Vimentin in der Lage, an der Ausbildung und Organisation von Fokalkontakten mitzuwirken. In Fokalkontakten verbinden Integrine während der Zellmigration das Cytoskelett des Leitsaums mit der extrazellulären Matrix. Schon vor einiger Zeit wurden außer Aktinfilamenten auch Vimentin in räumlicher Nähe von Fokalkontakten gesichtet (Bershadsky, Tint et al. 1987; Klymkowsky, Bachant et al. 1989). In Fibrolasten aus Vimentin „knockout“ Mäusen ist die räumliche Anordnung von Proteinen der Fokalkontakte, darunter Vinculin, Talin und Pallixin verändert. Studien von Seifert et al. weisen auf eine Kolokalisation von Vimentin mit Vinculin, Plectin in Fokalkontakten von Rattengliomas hin (Seifert, Lawson et al. 1992). Auch wenn Integrine in erster Linie mit dem Aktinfilament verküpft sind, gibt es Beispiele für eine Assoziation mit Vimentin: Studien von Homan et al. belegen, dass das α6β4 Integrin in Endothelzellen mit Vimentin assoziiert ist und Plectin unter Umständen als Adapterprotein fungieren könnte (Homan, Martinez et al. 2002). Darüber hinaus zeigten Tsuruta et al., dass Vimentin die Strukturen von Fokalkontakten mit αvβ3 Integrinen reguliert (Tsuruta and Jones 2003). Über diesen Einfluss auf Fokalkontakte kann Vimentin die Zelladhäsion stabilisieren und damit an der Zellmigration mitwirken.

Zwar ist Vimentin zweifellos nur ein Protein unter vielen, welches zur TGFβ-1 - induzierten, zellulären Motilität beiträgt. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die Expression von Vimentin über die Smad-Proteine in Kooperation mit Sp1 gesteuert wird, könnte die Dysregulation von Vimentin eine der möglichen Ursachen dafür sein, dass die TGFβ-1 - vermittelten Zellmigration in Panc-1 nach Ausschalten von endogenem Sp1 stark vermindert war.

D.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Expressionsprofilanalyse, qRT-PCR und der Migrationsassays nach Hemmung bzw. dem Ausschalten von endogenem Sp1 lassen darauf schließen, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 im Pankreaskarzinom an der

Regulation vieler TGFβ-1 - Zielgene beteiligt ist. Konkret konnte dies am Promotor des *SMAD7* Gens, welches mit dem Verlust der TGFβ-1 - induzierten Wachtumshemmung in Verbindung gebracht wird, und am Promotor des *VIM* Gens, das bislang in erster Linie als Markergen der EMT bekannt ist, bestätigt werden. Darüber hinaus konnte für Vimentin in Panc-1 Zellen eine wichtige Beiteiligung an der TGFβ-1 - induzierten Migration beschrieben werden. Somit trägt Sp1 zu den unterschiedlichsten Prozessen der TGFβ-1 - vermittelten Tumorprogression bei.

Am Smad7 Promotor konnte erstmals der detaillierte Mechanismus der Smad/Sp1 - vermittelten Induktion aufgeklärt werden. Danach wird der Promotor durch einen Komplex aus Smad3, Smad4 und Sp1 transaktiviert. Die Wechselwirkung der Smad-Proteine mit Sp1 führt dabei zu einer verstärkten Bindung von Sp1 an die DNA, während eine direkte Bindung der Smad-Proteine an das SBE für die Aktivierung des Smad7 Promotors nicht notwendigerweise erforderlich ist. Ob ein ähnlicher Mechanismus die Transaktivierung des Vimentin Promotors steuert, muss noch geprüft werden. Jedenfalls ist für die maximale Transaktivierung des Vimentin Promotors durch Smad2/3/4 ebenfalls endogenes Sp1 nötig.

Unter dem Aspekt, dass Sp1 für die korrekte, Smad - vermittelte Transaktivierung vieler TGFβ-1 - Zielgenen essentiell ist, und darüber hinaus eine Bindung der Smad-Proteine an die DNA zur TGFβ-1 - vermittelten Transaktivierung nicht unbedingt erforderlich ist, stellen die Smad-Proteine die eigentlichen transkriptionellen Kofaktoren dar, die ihre Wirkung entfalten indem sie, wie z. B. im Falle von Sp1, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA verstärken. Bezüglich der Sp1/Smad - vermittelten Transaktivierung muss überdies berücksichtigt werden, dass Smad-Sp1 Komplexe auch die antiproliferative Wirkung von TGFβ-1, z. B. durch die Induktion von p21 und p15, umsetzen (Feng, Lin et al. 2000; Pardali, Kurisaki et al. 2000). Die Spezifität des Sp1-Smad Komplexes ist daher, ähnlich den Smad-Proteinen per se, vom zellulären Kontext, das heißt z. B. vom Phosphorylierungsstatus, und von der Gegenwart weiterer antagonistischer bzw. kooperativer transkriptioneller Partnerproteine, abhängig. Indem der Aktivierungsstatus solcher transkriptionellen Partnerproteine, auch von TGFβ-1 unabhängigen Signaltransduktionkaskaden abhängt, kommt eine

spezifische Genregulation, über die Bildung entsprechender Transkriptionskomplexe welche die Informationen der jeweiligen aktiven Signaltransduktionwege an den Promotoren integrieren, zustande. Intensive Forschung ist daher noch nötig um die Zusammenhänge der Smad/Sp1 - vermittelten promalignen Genregulation zu verstehen damit diese gezielt inhibiert werden kann.

E Zusammenfassung

TGFβ-1 ist ein Cytokin, welches bei der Progression des Pankreaskarzinoms eine duale Rolle spielt. Während TGFβ-1 in frühen Tumorstadien antiproliferativ wirkt, geht diese Funktion im Laufe der Tumorentstehung verloren bis das Cytokin schließlich aktiv an promalignen Prozessen, wie der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung (EMT), der Zellmigration und der Zellinvasion beteiligt ist. Das TGFβ-1 Signal wird intrazellulär über die Smad-Signaltransduktionskaskade in den Nukleus zu den Promotoren der Zielgene übermittelt. Zur Regulation dieser Gene benötigen die Smad-Proteine transkriptionelle Koproteine. Ein solches Koprotein ist der Transkriptionsfaktor Sp1, welcher in Tumorzellen unter anderem mit einer promalignen Genregulation in Zusammenhang gebracht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der detaillierte Mechanismus der kooperativen transkriptionellen Regulation von Sp1 mit den Smad-Proteinen an TGFβ-1 Zielpromotoren aufgeklärt, sowie die Rolle von Sp1 in TGFβ-1/Smad - vermittelten Prozessen der Tumorprogression in Pankreaskarzinomzellen untersucht werden. Expressionsprofilanalysen ergaben, dass TGFβ-1 in Panc-1 Zellen insgesamt 43 Gene differentiell reguliert, wovon 11 Gene durch TGFβ-1 induziert und 37 Gene supprimiert werden. Des weiteren ist der Transkriptionsfaktor Sp1 an der Expression von 10 der 11 Gene, welche durch TGFβ-1 induziert werden, potentiell beteiligt. In dieser Gruppe von Genen befand sich das inhibitorische *SMAD7*, das im Pankreaskarzinom mit dem Verlust der TGFβ-1 - vermittelten Wachstumshemmung assoziiert ist. In Promotorstudien wurde nachgewiesen, dass der Smad7 Promotor über einen Komplex aus Sp1 und Smad3/4 akiviert wird. Infolge dieser Komplexbildung findet eine verstärkte Bindung von Sp1 an GC-reiche Boxen des Smad7 Promotors statt, während eine direkte Interaktion von Smad3/4 mit der DNA für die Transaktivierung nicht notwendigerweise erforderlich ist. Im zweiten Teil der Arbeit wurde mittels der siRNA Technologie gezeigt, dass endogenes Sp1 Anteil an der TGFβ-1-induzierten Zellmigration sowie der TGFβ-1 - vermittelten Expression von EMT - relevanten Genen hat. Aus diesen Genen wurde das TypIII

Intermediärfilament Vimentin für nähere Untersuchungen ausgewählt. Analog zum Smad7 Promotor war auch für die korrekte Smad2/3/4 - vermittelte Induktion des Vimentin Promotors endogenes Sp1 erforderlich. Interessanterweise war die Expression von Vimentin für die maximale TGFβ-1 - vermittelte Migration in Panc -1 Zellen nötig, so dass sich der Einfluss von Sp1 auf die TGFβ-1 - induzierte Migration unter anderem aus der gemeinsamen Regulation des Vimentin Promotors erklären ließe. Zusammenfassend zeigte sich, dass Sp1 in Pankreaskarzinomzellen durch eine kooperative Genregulation mit den Smad-Proteinen an den unterschiedlichsten Prozessen der TGFβ-1 - vermittelten Tumorprogression beteiligt ist.

F Literaturverzeichnis

Ahrendt, S. A. and H. A. Pitt (2002). "Surgical management of pancreatic cancer." Oncology (Huntingt) **16**(6): 725-34; discussion 734, 736-8, 740, 743.

Armstrong, S. A., D. A. Barry, et al. (1997). "Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity." J Biol Chem **272**(21): 13489-95.

Arnold, N. B., K. Ketterer, et al. (2004). "Thioredoxin is downstream of Smad7 in a pathway that promotes growth and suppresses cisplatin-induced apoptosis in pancreatic cancer." Cancer Res **64**(10): 3599-606.

Bakin, A. V., C. Rinehart, et al. (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration." J Cell Sci **115**(Pt 15): 3193-206.

Basset, P., J. P. Bellocq, et al. (1990). "A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas." Nature **348**(6303): 699-704.

Bershadsky, A. D., I. S. Tint, et al. (1987). "Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts." Cell Motil Cytoskeleton **8**(3): 274-83.

Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." Mol Biol Cell **12**(1): 27-36.

Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J **348 Pt 2**: 241-55.

Black, A. R., J. D. Black, et al. (2001). "Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer." J Cell Physiol **188**(2): 143-60.

Black, A. R., D. Jensen, et al. (1999). "Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation." J Biol Chem **274**(3): 1207-15.

Blobe, G. C., W. P. Schiemann, et al. (2000). "Role of transforming growth factor

beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-8.

Botti, C., E. Seregni, et al. (1998). "Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression." Int J Biol Markers **13**(2): 51-69.

Boyer Arnold, N. and M. Korc (2005). "Smad7 abrogates transforming growth factor-beta1-mediated growth inhibition in COLO-357 cells through functional inactivation of the retinoblastoma protein." J Biol Chem **280**(23): 21858-66.

Briggs, M. R., J. T. Kadonaga, et al. (1986). "Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1." Science **234**(4772): 47-52.

Brodin, G., A. Ahgren, et al. (2000). "Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter." J Biol Chem **275**(37): 29023-30.

Castro-Rivera, E., I. Samudio, et al. (2001). "Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements." J Biol Chem **276**(33): 30853-61.

Comijn, J., G. Berx, et al. (2001). "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." Mol Cell **7**(6): 1267-78.

Cui, W., D. J. Fowlis, et al. (1996). "TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors,

but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice." Cell **86**(4): 531-42.

Datta, P. K., M. C. Blake, et al. (2000). "Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1." J Biol Chem **275**(51): 40014-9.

de Caestecker, M. P., W. T. Parks, et al. (1998). "Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases." Genes Dev **12**(11): 1587-92.

de Caestecker, M. P., E. Piek, et al. (2000). "Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer." J Natl Cancer Inst **92**(17): 1388-402.

Delany, A. M. and E. Canalis (2001). "The metastasis-associated metalloproteinase stromelysin-3 is induced by transforming growth factor-beta in osteoblasts and fibroblasts." Endocrinology **142**(4): 1561-6.

Denissova, N. G., C. Pouponnot, et al. (2000). "Transforming growth factor beta - inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6397-402.

Derynck, R. and X. H. Feng (1997). "TGF-beta receptor signaling." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F105-50.

Derynck, R., Y. Zhang, et al. (1998). "Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses." Cell **95**(6): 737-40.

Dynan, W. S. and R. Tjian (1983). "The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter." Cell **35**(1): 79-87.

Ebisawa, T., M. Fukuchi, et al. (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." J Biol Chem **276**(16): 12477-80.

Eckes, B., E. Colucci-Guyon, et al. (2000). "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin." J Cell Sci **113 (Pt 13)**: 2455-62.

Eckes, B., D. Dogic, et al. (1998). "Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts." J Cell Sci **111 (Pt 13)**: 1897-907.

Edlund, S., M. Landstrom, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA." Mol Biol Cell **13**(3): 902-14.

Edwards, D. R., G. Murphy, et al. (1987). "Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor." Embo J **6**(7): 1899-904.

Eger, A., A. Stockinger, et al. (2004). "beta-Catenin and TGFbeta signalling

cooperate to maintain a mesenchymal phenotype after FosER-induced epithelial to mesenchymal transition." Oncogene **23**(15): 2672-2680.

Ellenrieder, V., A. Buck, et al. (2004). "KLF11 mediates a critical mechanism in TGF-beta signaling that is inactivated by Erk-MAPK in pancreatic cancer cells." Gastroenterology **127**(2): 607-20.

Ellenrieder, V., S. F. Hendler, et al. (2001). "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation." Cancer Res **61**(10): 4222-8.

Ellenrieder, V., S. F. Hendler, et al. (2001). "TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system." Int J Cancer **93**(2): 204-11.

Engel, M. E., M. A. McDonnell, et al. (1999). "Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription." J Biol Chem **274**(52):

37413-20.

Eppert, K., S. W. Scherer, et al. (1996). "MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma." Cell **86**(4): 543-52.

Feng, X. H., X. Lin, et al. (2000). "Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta." Embo J **19**(19): 5178-93.

Feng, X. H., Y. Zhang, et al. (1998). "The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation." Genes Dev **12**(14): 2153-63.

Fojas de Borja, P., N. K. Collins, et al. (2001). "Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription." Embo J **20**(20): 5737-47.

Gansauge, S., F. Gansauge, et al. (1997). "Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis." Cancer Res **57**(9): 1634-7.

Garcia, A., S. Cereghini, et al. (2000). "Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters." J Biol Chem **275**(13): 9385-9.

Gilles, C., M. Polette, et al. (1999). "Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration." J Cell Sci **112 (Pt 24)**: 4615-25.

Goggins, M., M. Shekher, et al. (1998). "Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas." Cancer Res **58**(23): 5329-32.

Gress, T. M., A. Menke, et al. (1998). "Role of extracellular matrix in pancreatic diseases." Digestion **59**(6): 625-37.

Grinstein, E., F. Jundt, et al. (2002). "Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells." Oncogene **21**(10): 1485-92.

Hagedorn, H. G., B. E. Bachmeier, et al. (2001). "Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review)." Int J Oncol **18**(4): 669-81.

Hahn, S. A., M. Schutte, et al. (1996). "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1." Science **271**(5247): 350-3.

Haidweger, E., M. Novy, et al. (2001). "Modulation of Sp1 activity by a cyclin A/CDK complex." J Mol Biol **306**(2): 201-12.

Halder, S. K., R. D. Beauchamp, et al. (2005). "Smad7 induces tumorigenicity by blocking TGF-beta-induced growth inhibition and apoptosis." Exp Cell Res **307**(1): 231-46.

Hasegawa, Y., S. Takanashi, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma." Cancer **91**(5): 964-71.

Heinmoller, E., W. Dietmaier, et al. (2000). "Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma." Am J Pathol **157**(1): 83-92.

Heldin, C. H., K. Miyazono, et al. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390**(6659): 465-71.

Hendrix, M. J., E. A. Seftor, et al. (1996). "Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **15**(4): 507-25.

Hilton, T. L., Y. Li, et al. (2005). "TAF1 histone acetyltransferase activity in Sp1 activation of the cyclin D1 promoter." Mol Cell Biol **25**(10): 4321-32.

Hoey, T., R. O. Weinzierl, et al. (1993). "Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators." Cell **72**(2): 247-60.

Homan, S. M., R. Martinez, et al. (2002). "Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells." Exp Cell Res **281**(1): 107-14.

Hua, X., Z. A. Miller, et al. (2000). "Synergism between transcription factors TFE3 and Smad3 in transforming growth factor-beta-induced transcription of the Smad7 gene." J Biol Chem **275**(43): 33205-8.

Ingber, D. E., L. Dike, et al. (1994). "Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis." Int Rev Cytol **150**: 173-224.

Itoh, S., M. Landstrom, et al. (1998). "Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7." J Biol Chem **273**(44): 29195-201.

Izmailova, E. S., E. Wieczorek, et al. (1999). "A GC-box is required for expression of the human vimentin gene." Gene **235**(1-2): 69-75.

Janda, E., K. Lehmann, et al. (2002). "Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways." J Cell Biol **156**(2): 299-313.

Janknecht, R., N. J. Wells, et al. (1998). "TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300." Genes Dev **12**(14): 2114-9.

Jemal, A., A. Thomas, et al. (2002). "Cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **52**(1): 23-47.

Jonk, L. J., S. Itoh, et al. (1998). "Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-

inducible enhancer." J Biol Chem **273**(33): 21145-52.

Kang, Y., C. R. Chen, et al. (2003). "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells." Mol Cell **11**(4): 915-26.

Kavsak, P., R. K. Rasmussen, et al. (2000). "Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation." Mol Cell **6**(6): 1365-75.

Kim, Y. H., H. S. Lee, et al. (2004). "Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas." Ann Oncol **15**(4): 574-80.

Kintscher, U., C. Lyon, et al. (2002). "PPARalpha inhibits TGF-beta-induced beta5 integrin transcription in vascular smooth muscle cells by interacting with Smad4." Circ Res **91**(11): e35-44.

Kleeff, J., T. Ishiwata, et al. (1999). "The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer." Oncogene **18**(39): 5363-72.

Klymkowsky, M. W., J. B. Bachant, et al. (1989). "Functions of intermediate filaments." Cell Motil Cytoskeleton **14**(3): 309-31.

Kornmann, M., T. Ishiwata, et al. (1998). "Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival." Oncology **55**(4): 363-9.

Kornmann, M., P. Tangvoranuntakul, et al. (1999). "TGF-beta-1 up-regulates cyclin D1 expression in COLO-357 cells, whereas suppression of cyclin D1 levels is associated with down-regulation of the type I TGF-beta receptor." Int J Cancer **83**(2): 247-54.

Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad

signaling by oncogenic Ras." Genes Dev **13**(7): 804-16.

Kumar, A. P. and A. P. Butler (1999). "Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors." Cancer Lett **137**(2): 159-65.

Labbe, E., A. Letamendia, et al. (2000). "Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8358-63.

Lai, C. F., X. Feng, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta up-regulates the beta 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling." J Biol Chem **275**(46): 36400-6.

Lang, S. H., C. Hyde, et al. (2002). "Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma." Prostate **52**(4): 253-63.

Larsson, J., M. J. Goumans, et al. (2001). "Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice." Embo J **20**(7): 1663-73.

Loeffler, S., B. Fayard, et al. (2005). "Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1." Int J Cancer **115**(2): 202-13.

Lou, Z., S. O'Reilly, et al. (2005). "Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation." Cancer Res **65**(3): 1007-17.

Ludwig, M. G., P. Basset, et al. (2000). "Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors." J Biol Chem **275**(51): 39981-90.

Maniotis, A. J., C. S. Chen, et al. (1997). "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 849-54.

Mareel, M., T. Boterberg, et al. (1997). "E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion." J Cell Physiol **173**(2): 271-4.

Marin, M., A. Karis, et al. (1997). "Transcription factor Sp1 is essential for early

embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation." Cell **89**(4): 619-28.

Markowitz, S., J. Wang, et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." Science **268**(5215): 1336-8.

Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 169-78.

Massague, J., S. W. Blain, et al. (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." Cell **103**(2): 295-309.

Miettinen, P. J., R. Ebner, et al. (1994). "TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 2021-36.

Miller, D. M., D. A. Polansky, et al. (1987). "Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA." Am J Med Sci **294**(5): 388-94.

Miyazono, K., S. Maeda, et al. (2004). "Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins." Oncogene **23**(24): 4232-7.

Miyazono, K., P. ten Dijke, et al. (2000). "TGF-beta signaling by Smad proteins." Adv

Immunol **75**: 115-57.

Moren, A., S. Itoh, et al. (2000). "Functional consequences of tumorigenic missense mutations in the amino-terminal domain of Smad4." Oncogene **19**(38): 4396-404.

Moustakas, A., S. Souchelnytskyi, et al. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4359-69.

Myeroff, L. L., R. Parsons, et al. (1995). "A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability." Cancer Res **55**(23): 5545-7.

Nagarajan, R. P., J. Zhang, et al. (1999). "Regulation of Smad7 promoter by direct

association with Smad3 and Smad4." J Biol Chem **274**(47): 33412-8.

Nakajima, S., R. Doi, et al. (2004). "N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4125-33.

Nicolas, F. J. and C. S. Hill (2003). "Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest." Oncogene **22**(24): 3698-711.

Oft, M., K. H. Heider, et al. (1998). "TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis." Curr Biol **8**(23): 1243-52.

Oft, M., J. Peli, et al. (1996). "TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells." Genes Dev **10**(19): 2462-77.

Osawa, H., M. Nakajima, et al. (2004). "Prognostic value of the expression of Smad6 and Smad7, as inhibitory Smads of the TGF-beta superfamily, in esophageal squamous cell carcinoma." Anticancer Res **24**(6): 3703-9.

Pal, S., K. P. Claffey, et al. (1998). "Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta." J Biol Chem **273**(41): 26277-80.

Pardali, K., A. Kurisaki, et al. (2000). "Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta." J Biol Chem **275**(38): 29244-56.

Peron, P., M. Rahmani, et al. (2001). "Potentiation of Smad transactivation by Jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in rat hepatocytes. role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation." J Biol Chem **276**(13): 10524-31.

Pertovaara, L., A. Kaipainen, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells." J Biol Chem **269**(9): 6271-4.

Polette, M., C. Clavel, et al. (1993). "Localization by in situ hybridization of mRNAs encoding stromelysin 3 and tissue inhibitors of metallo-proteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas." Pathol Res Pract **189**(9): 1052-7.

Polette, M., C. Gilles, et al. (1998). "Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines." Clin Exp Metastasis **16**(2): 105-12.

Poncelet, A. C. and H. W. Schnaper (2001). "Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells." J Biol Chem **276**(10): 6983-92.

Porte, H., E. Chastre, et al. (1995). "Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes." Int J Cancer **64**(1): 70-5.

Reguly, T. and J. L. Wrana (2003). "In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic

shuttling." Trends Cell Biol **13**(5): 216-20.

Roberts, A. B., M. B. Sporn, et al. (1986). "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4167-71.

Roberts, A. B. and L. M. Wakefield (2003). "The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8621-3.

Rohlff, C., S. Ahmad, et al. (1997). "Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **272**(34): 21137-41.

Rosewicz, S. and B. Wiedenmann (1997). "Pancreatic carcinoma." Lancet **349**(9050): 485-9.

Ryu, S., S. Zhou, et al. (1999). "The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1." Nature **397**(6718): 446-50.

Saha, D., P. K. Datta, et al. (2001). "Oncogenic ras represses transforming growth

factor-beta /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4." J Biol Chem **276**(31): 29531-7.

Sanchez-Elsner, T., L. M. Botella, et al. (2001). "Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression." J Biol Chem **276**(42): 38527-35.

Seifert, G. J., D. Lawson, et al. (1992). "Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers." Eur J Cell Biol **59**(1): 138-47.

Shi, Y., Y. F. Wang, et al. (1998). "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling." Cell **94**(5): 585-94.

Shields, J. M. and V. W. Yang (1997). "Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins." J Biol Chem **272**(29): 18504-7.

Siegel, P. M. and J. Massague (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer." Nat Rev Cancer **3**(11): 807-21.

Siegel, P. M., W. Shu, et al. (2003). "Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8430-5.

Singh, S., S. Sadacharan, et al. (2003). "Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer." Cancer Res **63**(9): 2306-11.

Song, A., A. Patel, et al. (2002). "Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Kruppel-like transcription factor of activated T lymphocytes." J Biol Chem **277**(33): 30055-65.

Stopa, M., D. Anhuf, et al. (2000). "Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation." J Biol Chem **275**(38): 29308-17.

Sun, L. (2004). "Tumor-suppressive and promoting function of transforming growth

factor beta." Front Biosci **9**: 1925-35.

Suzuki, C., G. Murakami, et al. (2002). "Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane." J Biol Chem **277**(42): 39919-25.

Suzuki, T., A. Kimura, et al. (2000). "Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding." Genes Cells **5**(1): 29-41.

Szpaderska, A. M., S. Silberman, et al. (2004). "Sp1 regulates cathepsin B transcription and invasiveness in murine B16 melanoma cells." Anticancer Res **24**(6): 3887-91.

Taipale, J., J. Saharinen, et al. (1998). "Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion." Adv Cancer Res **75**: 87-134.

Tajima, Y., K. Goto, et al. (2003). "Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7." J Biol Chem **278**(12): 10716-21.

Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, et al. (1990). "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1486-90.

Tsukazaki, T., T. A. Chiang, et al. (1998). "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor." Cell **95**(6): 779-91.

Tsuruta, D. and J. C. Jones (2003). "The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress." J Cell Sci **116**(Pt 24): 4977-84.

Uchida, K., M. Nagatake, et al. (1996). "Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers." Cancer Res **56**(24): 5583-5.

Unden, A. B., B. Sandstedt, et al. (1996). "Stromelysin-3 mRNA associated with myofibroblasts is overexpressed in aggressive basal cell carcinoma and in

dermatofibroma but not in dermatofibrosarcoma." J Invest Dermatol **107**(2): 147-53.

Valgeirsdottir, S., L. Claesson-Welsh, et al. (1998). "PDGF induces reorganization of vimentin filaments." J Cell Sci **111 (Pt 14)**: 1973-80.

von Gersdorff, G., K. Susztak, et al. (2000). "Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor beta." J Biol Chem **275**(15): 11320-6.

von Marschall, Z., E. O. Riecken, et al. (1998). "Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines." Gut **43**(5): 692-8.

Wagner, K., M. Peters, et al. (2004). "Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells." Gastroenterology **126**(7): 1828-43.

Wakefield, L. M. and A. B. Roberts (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 22-9.

Wang, L., X. Guan, et al. (2005). "Altered Expression of Transcription Factor Sp1 Critically Impacts the Angiogenic Phenotype of Human Gastric Cancer." Clin Exp Metastasis **22**(3): 205-213.

Wang, L., D. Wei, et al. (2003). "Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer." Clin Cancer Res **9**(17): 6371-80.

Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). "Pancreatic carcinoma." N Engl J Med **326**(7): 455-65.

Welch, D. R., A. Fabra, et al. (1990). "Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7678-82.

Wicks, S. J., S. Lui, et al. (2000). "Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II." Mol Cell Biol **20**(21):

8103-11.

Wong, C., E. M. Rougier-Chapman, et al. (1999). "Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta." Mol Cell Biol **19**(3): 1821-30.

Wotton, D., R. S. Lo, et al. (1999). "A Smad transcriptional corepressor." Cell **97**(1): 29-39.

Wrana, J. L. (2000). "Crossing Smads." Sci STKE **2000**(23): RE1.

Wrana, J. L., L. Attisano, et al. (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature **370**(6488): 341-7.

Wu, J. W., M. Hu, et al. (2001). "Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling." Mol Cell **8**(6): 1277-89.

Wu, Y., X. Zhang, et al. (2003). "c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1." Oncogene **22**(55): 8891-901.

Yao, J. C., L. Wang, et al. (2004). "Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4109-17.

Yu, L., M. C. Hebert, et al. (2002). "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses." Embo J **21**(14): 3749-59.

Zannetti, A., S. Del Vecchio, et al. (2005). "Inhibition of Sp1 activity by a decoy PNA-DNA chimera prevents urokinase receptor expression and migration of breast cancer cells." Biochem Pharmacol **70**(9): 1277-87.

Zavadil, J., M. Bitzer, et al. (2001). "Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6686-91.

Zhang, J., Z. G. Zhu, et al. (2005). "Transcription factor Sp1 expression in gastric cancer and its relationship to long-term prognosis." World J Gastroenterol **11**(15): 2213-7.

Zhang, W., J. Ou, et al. (2000). "Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription." J Biol Chem **275**(50): 39237-45.

Zhang, X., I. H. Diab, et al. (2003). "ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1." Nucleic Acids Res **31**(11): 2900-14.

Danksagung

Herrn Prof. Adler danke ich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertationsarbeit in der Abteilung Innere Medizin 1.

Herrn Prof. Thomas Gress danke ich für die Überlassung des Themas und die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Ellenrieder für Betreuung dieser Arbeit, sowie für die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen Anregungen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und der Erstellung des Manuskripts.

Ein großer Dank gebührt Dr. Malte Buchholz und Karin Lanz, die mir bei der Durchführung und Auswertung der Expressionsprofilanalyse behilflich waren.

Dr. Martin Wagner und Dr. Götz v. Wichert danke ich für die gute Kooperation bei der Anfertigung der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Gress/ Ellenrieder möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und für die außerordentliche Hilfsbereitschaft bei all den kleinen und größeren Problemen die der Laboralltag mit sich brachte, ganz herzlich bedanken.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich in allen Lebenslagen nach Kräften unterstützen und an Daniel, der immer für mich da war.