

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

erstellt am
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
(DKFZ)

vorgelegt von

Diplom-Biologe Timo Kehl
aus: Plankstadt

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**Tumorsuppressiver Einfluss der 15-Lipoxygenase-2 bei
der Pankreaskarzinogenese**

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Anne Régnier-Vigorous
Prof. Dr. rer. nat. Rainer Zawatzky

Lernen ist wie Rudern gegen den Strom –

sobald man aufhört, treibt man zurück.....

Benjamin Britten (1913-1976)

Für

„Meine Familie und Nicola“

Das Pankreaskarzinom hat die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Karzinome und ist die vierthäufigste Krebstodesursache. Adipositas und ein hoher Konsum an ω -6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden u.a. als Risikofaktoren identifiziert. Der oxidative Fettstoffwechsel und insbesondere der Eicosanoid-Metabolismus spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese. Lipoxygenasen (LOX) sind Schlüsselenzyme des Eicosanoid-Metabolismus und könnten wertvolle Ansatzpunkte für Früherkennung, Prävention und Therapie eines Pankreaskarzinoms darstellen. In bisherigen Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die 5- und 12-LOX pro-tumorigene Aktivitäten im Pankreaskarzinom aufweisen. Im Gegensatz dazu wurde die 15-LOX-1 im Pankreaskarzinom als anti-tumorigen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der 15-LOX-2 für die Pankreaskarzinogenese analysiert. Hierzu wurde anhand von 180 immunhistochemisch untersuchten Pankreasgeweben unterschiedlicher Dignität ein Expressionsprofil für 15-LOX-2 erstellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von 15-LOX-2 im gesunden Pankreasgewebe vor allem in den Gangstrukturen vorhanden ist, im Verlauf der malignen Pankreastumorgenese im PanIN-2 Stadium jedoch sukzessive reduziert wurde. Des Weiteren konnte in keiner der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien weder auf Transkriptions- noch auf Proteinebene eine Expression von 15-LOX-2 detektiert werden. Zur Untersuchung der zellulären Funktion von 15-LOX-2 wurde ein induzierbares TET-ON-Genexpressionssystem in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 etabliert. Die durch Doxycyclin induzierte LOX-Expression führte zu einer Hemmung des Zellwachstums und zur Induktion von Apoptose. Pharmakologische und genetische Interventionsstudien zeigten, dass die Hemmung des Zellwachstums nur zu einem geringen Teil von der enzymatischen Aktivität des Enzyms und der Bildung von 15S-HETE abhing. Die LOX-Metaboliten hatten nur einen geringen additiven Effekt auf die Wachstumshemmung. Dies weist sowohl auf Rezeptor-vermittelte Signalnetzwerke hin als auch auf direkte Interaktionen der 15-LOX-2 mit anderen Signalproteinen. In weiteren Analysen zum molekularen Wirkmechanismus konnte gezeigt werden, dass es durch die 15-LOX-2-Expression zu einer Aktivierung und zu einer verstärkten RNA- und Proteinexpression von p53 kam. siRNA-Knockdown-Experimente belegten einen kausalen Zusammenhang zwischen der LOX-induzierter Wachstumshemmung und der Hochregulation von p53. In Untersuchungen zum Mechanismus der 15-LOX-2-Inaktivierung in den Pankreaskarzinomzellen konnte eine Hypermethylierung der im Promotor enthaltenen CpG-Inseln als mögliche Ursache der Geninaktivierung aufgezeigt werden. Die Re-Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzelllinien konnte durch Behandlung mittels Demethylierungsagenzien und Histonmodifikationen erreicht werden. Erste *in vitro* Versuche mit dem Ziel einer kombinierten Chemotherapie zeigten, dass die Wiederherstellung der 15-LOX-Expression neue Möglichkeiten zur Hemmung des Tumorzellwachstums und zur Induktion der Tumorzellapoptose in einer optionalen Kombinationstherapie darstellen kann.

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer-related death. Obesity and high intake of ω -6 polyunsaturated fatty acids are identified as risk factors. Oxidative lipid metabolism, particularly the eicosanoid metabolism has been shown to play an important role in pancreatic tumour progression. Lipoxygenases (LOX) are key enzymes in the eicosanoid pathway and might be valuable as potential targets for early diagnosis, prevention and treatment of pancreatic cancer. Previous studies have shown that 5- and 12-LOX exhibit pro-tumorigenic effects, while 15-LOX-1 effects anti-tumorigenic activities. In this study, the role of 15-LOX-2 in pancreatic tumour progression was investigated. By immunohistochemistry a 15-LOX-2 expression profile of 180 pancreatic tissues with different entities was established. In human pancreatic tissue expression of 15-LOX-2 was evident especially in normal ducts but was significantly reduced in neoplastic PanIN-2 to PanIN-3 lesions and in pancreatic cancer tissue. Furthermore, expression of 15-LOX-2 was completely absent in any investigated pancreatic cancer cell line. The data indicate that expression of 15-LOX-2 is lost during pancreatic tumour development. To investigate the cellular function of 15-LOX-2, a tetracycline inducible expression system was established in the human pancreatic cancer cell line Panc1. Forced expression of 15-LOX-2 resulted in significant inhibition of tumour cell proliferation associated with increased apoptosis. Unexpectedly, over-expression of a catalytically inactive 15-LOX-2 mutant yielded similar growth inhibition and supplemental treatment of the cells with the metabolite 15-HETE had only minor additive growth inhibitory effects indicating that most of the LOX-mediated effects are independent from enzymatic activity. Studies aimed at deciphering the mechanisms of 15-LOX-2 action showed that 15-LOX-2 induced growth inhibition was associated with strong activation and up-regulation of the tumour suppressor p53 at both the mRNA and protein level. Moreover, down-regulation of p53 by RNA interference prevented the 15-LOX-2 induced effects indicating that growth inhibition is mediated in a p53-dependent manner. Studies to define the molecular mechanisms that underlie 15-LOX-2 gene silencing in cancer identified CpG islands in the 15-LOX-2 promoter that were aberrantly hypermethylated in pancreatic cancer cells. Partial reexpression of 15-LOX-2 was achieved by promoter demethylation and could be further augmented by inhibition of histone deacetylation indicating that both, promoter methylation and histone modifications are implicated in 15-LOX-2 transcription suppression. In evaluating the benefit of 15-LOX-2 expression as part of a combination chemotherapeutic therapy for pancreatic tumors it was shown that the combination produced the same level of inhibition as was seen by a 10-fold higher dose of cisplatin or gemcitabine treatment alone. The data suggest, that restoration of 15-LOX-2 expression in pancreatic cancer could be a new strategy in treating patients with this dismal disease.

Abkürzungen

%	Prozent
~	etwa, rund
”	Zoll
°C	Grad Celsius
μ(X)	My
5-Aza	5-Aza-2'-desoxycytidin
5-LOX	5-Lipoxygenase (exemplarisch für alle x-LOXn)
A	Ampere
AA	Arachidonsäure
Amp ^R	Amphicilin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CapRI	Adjuvante ChemoRadioImmuntherapie des Pankreaskarzinoms versus alleinige Chemotherapie
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response element binding protein
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom p-450 Monooxygenase
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EET	Epoxyeicosatetraensäure
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
ELISA	Enzyme linked Immunabsorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum

Erk	Extracellular-signal regulated kinase
ESPAC	European Study Group for Pancreatic Cancer
FET	Fluoreszenz Energie Transfer
FU	Fluoruracil
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutamin
GTP	Guanosine triphosphate
HE	Hämatoxylin/Eosin
HIS	Histidin
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
HVPCC	Hereditary Non-Polypos Colorectal Cancer
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IGF	Insulin-like Growth Factor 1
IHC	Immunhistochemie
Il-1	Interleukin 1
IPMN	Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kan ^R	Kanamycin
kDa	kiloDalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LOH	Loss of heterozygosity
LOX	Lipoxygenase
LSB	Laemmli Sample Buffer
LW	Leitungswasser
LX	Lipoxin
m	Masse

M	Molar
m(X)	milli
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCN	Muzinöse Zystische Neoplasie
MCS	Multiple Cloning Site
MEK	Extracellular signal-regulated kinase kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCT	non template control
NDGA	Nordihydroguaiaretic Acid
NFκB	Nuclear factor kappa β
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
NSAR	Nicht-Steroidale Anti-Rheumatika (NSAID, Non-steroidal anti-inflammatory drug)
p.A.	per Analysis
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBS	Phosphate buffered saline
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PIN	Prostate Intraeüithelial Neoplasia
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRSS1	Kationisches Trypsinogen- Gen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid
PVDF	Polyvinylidendifluorid Membran
Ras	<i>Rat</i> sarcoma
Rb	Retinoblastom

RKI	Robert-Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RP-HPLC	Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklin Repressor
TM	Temperatur
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 5
TRE	Tetrazyklin Response Element
U	Unit
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
VEGF	Vascular Endothelial Growth factor
v/v	Volume per volume
vgl.	Vergleich
w/v	Weight per volume
w/w	Weight per weight
Wo	Woche
z	Ladung
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung	1
1.1. Mechanismen der Krebsentstehung.....	2
1.2. Das Pankreas: Aufbau und Funktion	5
1.3. Das Pankreaskarzinom	6
1.3.1. Epidemiologie	7
1.3.2. Ätiologie und Risikofaktoren	9
1.3.3. Tumorphathogenese	10
1.3.4. Klinik und Therapie	14
1.4. Oxidativer Lipidstoffwechsel.....	16
1.4.1. Arachidonsäure.....	16
1.4.2. Lipoxygenasen.....	19
1.4.3. Struktur der Lipoxygenasen.....	21
1.4.4. Lipoxygenasereaktion.....	22
1.4.5. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Lipoxygenasen.....	25
Kapitel 2 Zielsetzung	28
Kapitel 3 Material und Methoden	29
3.1. Material.....	29
3.1.1. Geräte und Chemikalien.....	29
3.1.2. Primer	42
3.1.3. Antikörper.....	43
3.1.4. Organismen.....	44
3.1.5. Software	45
3.2. Methoden	46
3.2.1. Mikrobiologische Methoden.....	46
3.2.2. Präparation, Analyse und Modifikation von Ribonukleinsäuren	47
3.2.3. Präparation, Analyse und Modifikation von DNA.....	49
3.2.4. Proteinanalytik.....	55
3.2.5. Immunologische Analysen	59
3.2.6. In vitro Analysen	64
3.2.7. Statistik.....	70

Kapitel 4 Ergebnisse	71
4.1. Expression der 15-LOX-2 in humanen Pankreasgeweben und Karzinomzelllinien	71
4.1.1. 15-LOX-2-Expression in humanen Pankreasgeweben unterschiedlicher Dignität...	71
4.1.2. Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzelllinien	79
4.2. Etablierung des 15-LOX-2-TET-ON Genexpressionssystem.....	80
4.2.1. Konstruktion der 15-LOX-2-TET-ON Vektorplasmide.....	81
4.2.2. Antibiotika Sensitivitätstest der Zelllinie Panc1 zur Etablierung stabiler Klone.....	83
4.2.3. Etablierung induzierbarer LOX-Expressionslinien	85
4.2.4. Einfluss der 15-LOX-2-Expression auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1	101
4.2.5. Identifikation von 15-LOX-2-induzierten Signalwegen mittels Chip-Array-Analyse.....	113
4.2.6. 15-LOX-2 vermittelt eine Hochregulation der Expression des Transkriptionsfaktors p53.....	116
4.2.7. Einfluss von p53 auf die 15-LOX-2-vermittelte Wachstumshemmung.....	119
4.2.8. Mutation des Tumorsuppressors p53.....	124
4.2.9. 15-LOX-2-Expression als neues Element einer molekularen Kombinationstherapien	126
4.3. Rekonstitution der 15-LOX-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen.....	131
4.3.1. Analyse des Methylierungsmuster der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von 15-LOX-2	132
4.3.2. Analyse des Methylierungsmusters der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von 15-LOX-2 nach 5-Aza-Behandlung	135
4.3.3. Wiederherstellung der 15-LOX-2-Expression durch Demethylierung des 15-LOX-2-Promotors.....	137
4.3.4. Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen	138
4.3.5. Additiver Effekt von Valproat in Verbindung mit 5-Aza auf die Re-Expression von 15-LOX-2 in der Zelllinie Colo357	139
Kapitel 5 Diskussion	142
5.1. Verlust der 15-LOX-2-Expression während der Pankreaskarzinogenese.....	143
5.2. Antitumorigene Effekte und zelluläre Funktionen von 15-LOX-2	146
5.3. Epigenetische Mechanismen reprimieren die Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen.	153

5.4. Forcierte Expression von 15-LOX-2 als Ansatz für eine neue molekulare Kombinationstherapie beim Pankreaskarzinom	155
5.5. Ausblick	157
Kapitel 6 Referenzen	158
Kapitel 7 Publikationen	172
Kapitel 8 Abbildungsverzeichnis	174
Kapitel 9 Tabellenverzeichnis	176
Kapitel 10 Danksagung.....	177

Kapitel 1 Einleitung

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste Krebstodesursache weltweit und besitzt unter den malignen Erkrankungen eine der schlechtesten Prognosen. Häufigster Pankreastumor ist das maligne duktale Adenokarzinom (etwa 85% aller Neoplasien), gefolgt von periampullären Karzinomen und den endokrinen Pankreastumoren. Michael Trede stellte 2001 zusammenfassend fest, dass „das duktale Adenokarzinom des Pankreas eine unheilbare Erkrankung ist – das heißt unheilbar mit den derzeit zu Verfügung stehenden Mitteln“ [1]. Daran hat sich bis heute, 8 Jahre später, noch nichts geändert. Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms begründet sich auf seiner späten Diagnosestellung und dem Fehlen effektiver Therapieansätze. Eine chirurgische Resektion ist seltenst kurativ und bietet somit nur die bestmögliche Palliation im Vergleich zu anderen Therapieoptionen. Die Erkenntnis, dass die Chirurgie alleine diesen Krebs nicht heilen kann, zeigt die besondere Bedeutung der Grundlagenforschung und der Identifikation von Risikofaktoren. Zu den Risikofaktoren zählen neben demographischen und genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse; hier sind besonders der Nikotinabusus und eine zu fettreiche Ernährung hervorzuheben [2]. In diesem Zusammenhang zeigten Forschungsergebnisse und klinische Studien, dass der oxidative Fettstoffwechsel, insbesondere die Eicosanoidbiosynthese, bei der Karzinogenese eine besondere Rolle spielt. Hierbei rückten neben den Cyclooxygenasen in neueren Studien insbesondere auch die Lipoxygenasen in den Blickpunkt des Interesses. Die verschiedenen Enzyme des Lipoxygenasestoffwechsels sind in Tumorzellen aberrant exprimiert.

Während mit der Tumorgenese die Hochregulation der Proteinexpression der 5-Lipoxygenase (5-LOX) und der 12-Lipoxygenase (12-LOX) einhergeht, werden andere Isoformen insbesondere die 15-Lipoxygenase-2 (15-LOX-2) im Verlauf der Progression herunterreguliert [3; 4; 5]. Eine verminderte 15-LOX-2 Expression wird z.B. in Tumoren der Prostata oder des Kolons beobachtet [6; 7; 8; 9; 10]. 15-LOX-2 ist die zweite Isoform der epithelialen 15-Lipoxygenasen im Eicosanoidstoffwechsel, welche den „committed step“ der 15S-HETE Synthese katalysiert. Die Wirkungsweise der Hydroxyeicosatetraensäuren ist bislang noch völlig unbekannt. Sie induzieren eine Reihe von Signalwegen, die für Proliferation, Differenzierung oder Apoptose einer Zelle bedeutsam sind. Die Induktion der 15-LOX-2-Aktivität führt zu einer deutlichen

Wachstumshemmung verschiedenster Tumore [6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14]. Aufgrund dieser Beobachtung und mangelnder Therapiemöglichkeiten beim Pankreaskarzinom ist die Analyse des 15-Lipoxygenase-Stoffwechsels von großer Bedeutung, um für das Pankreaskarzinom gezielt neue molekulare Therapieansätze entwickeln zu können.

1.1. Mechanismen der Krebsentstehung

Neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Im alltäglichen Gebrauch werden unter dem Begriff Krebs mehr als einhundert verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst. Dabei gibt es deutliche Unterschiede im Auftreten, der Lokalisation, der Progressionsgeschwindigkeit sowie dem Metastasierungspotential und der Therapierbarkeit. Wesentliche Unterscheidungskriterien von Tumoren sind ihre Dignität mit Unterscheidung in benigne und maligne Tumoren und ihre phänotypische Differenzierung. Benigne Tumore sind überwiegend durch ein langsames, expansiv verdrängendes Wachstum gekennzeichnet. Ihr Wachstum führt zu einer Verdrängung und Kompression des umliegenden normalen Gewebes. Sie sind überwiegend gut begrenzt, können eine fibröse Kapsel aufweisen und zeigen einen hohen Differenzierungsgrad. Maligne Tumore dagegen zeichnen sich durch invasives und destruierendes Wachstum aus. Die Fähigkeit des invasiven Wachstums führt zu Einbrüchen in Lymph- und Blutgefäße. Auf diese Weise kommt es zu einer Metastasenbildung an anderen Stellen des Körpers. Das entscheidende Merkmal maligner Tumore liegt in der Fähigkeit ihrer Tumorzellen, normales Gewebe zu infiltrieren (Invasion) und zu zerstören (Destruktion). Dementsprechend sind diese Tumore meist nur unscharf abgegrenzt und weisen selten eine Kapselbildung auf. Des Weiteren zeigen maligne Tumore einen unterschiedlich stark ausgeprägten Verlust ihrer gewebsspezifischen Differenzierung bis hin zum völligen Fehlen von Ähnlichkeiten zum Muttergewebe (anaplastisches Karzinom). Die phänotypische Differenzierung bildet eine weitere Unterscheidungsgrundlage. Die überwiegende Anzahl an humanen Tumoren stellen die Karzinome; diese sind bösartige Entartungen epithelialer Zellen, wie z.B. des Brustgewebes oder des Verdauungstraktes. Der übrige Teil verteilt sich auf Tumoren des Knorpel-, Knochen-, Muskel- oder Bindegewebes (Sarkome) sowie Lymphome und Leukämien, welche den

blutbildenden Zellen des Knochenmarks bzw. der lymphoiden Organe entstammen [15]. Dennoch zeigen die unterschiedlichen Krebsarten gemeinsame Eigenschaften und Mechanismen in ihrer Entstehung. Sie können sowohl spontan entstehen, als auch durch biologische und chemische Faktoren induziert werden. Ein wesentlicher Faktor ist die Anhäufung genetischer Mutationen [16]. Im Organismus werden die Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose streng kontrolliert. Durch vererbte oder somatische Mutationen können sich Zellen sukzessiv dieser Kontrolle entziehen. Die Folge sind neoplastische Zellen klonalen Ursprungs, welche eine unvollkommene Differenzierung aufweisen, sich ungehindert teilen und sich so der Apoptose entziehen können. Die bisherige Theorie der Karzinogenese geht davon aus, dass die maligne Transformation vor allem durch Mutationen in den Proto-Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen ausgelöst wird [17]. Onkogene sind Gene, deren Produkte an der Zellproliferation beteiligt sind und den Zellzyklus kontrollieren. Sie können durch genetische Alterationen (Translokation, Duplikation, Punktmutation) konstitutiv aktiviert werden. Die wichtigste genetische Alteration bei der Pankreaskarzinogenese ist eine Aktivierung des dominant transformierenden Onkogens RAS, welche ca. 90 % der Karzinome aufweisen. Tumorsuppressorgene besitzen oft wachstumshemmende Funktionen, die durch Mutation inaktiviert werden, wie z.B. die Gene, die für die Proteine p53, DPC4, CDKN2 und Rb (Retinoblastom) kodieren, die auch beim Pankreaskarzinom betroffen sind. Somit sind Tumore die Folge eines mehrstufigen Prozesses von genetischen Veränderungen, welcher final zu einer Entartung führen kann. Dieses Modell für die Entwicklung von Tumorzellen ist das sogenannte Mehrstufenmodell der Karzinogenese [18]. Um die Prozesse der Krebsentstehung in den Grundzügen zu erfassen, hat sich das weit verbreitete Dreistufenmodell etabliert (siehe Abbildung 1). Es ist gegliedert in die Phasen der Initiation, Promotion und Progression. Das initiale Ereignis kann vielschichtig sein; ein Umwelteinfluss, wie ionisierende Strahlung, kanzerogene Chemikalien oder Mutationen von DNA Reparaturmechanismen. Schlussendlich führen alle genannten Ereignisse zum Wachstumsvorteil einer Zelle gegenüber ihren Nachbarzellen, so dass diese durch Expansion zu einem Klon identischer Zellen heranwachsen. In dem dazwischen liegenden Schritt der Tumorentstehung (Promotion) spielen nicht-genotoxische Prozesse eine große Rolle. Besonders chronische Entzündungen sind als promovierende Ereignisse für die Tumorentstehung von großer Bedeutung [19]. Die eigentliche Malignität der entarteten Zellen wird in der Phase der Progression erreicht

(bei malignen Tumoren) [20; 21]. Damit einhergehen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung sowie biochemische Veränderungen, welche wesentliche Kriterien der Karzinogenese darstellen [22].

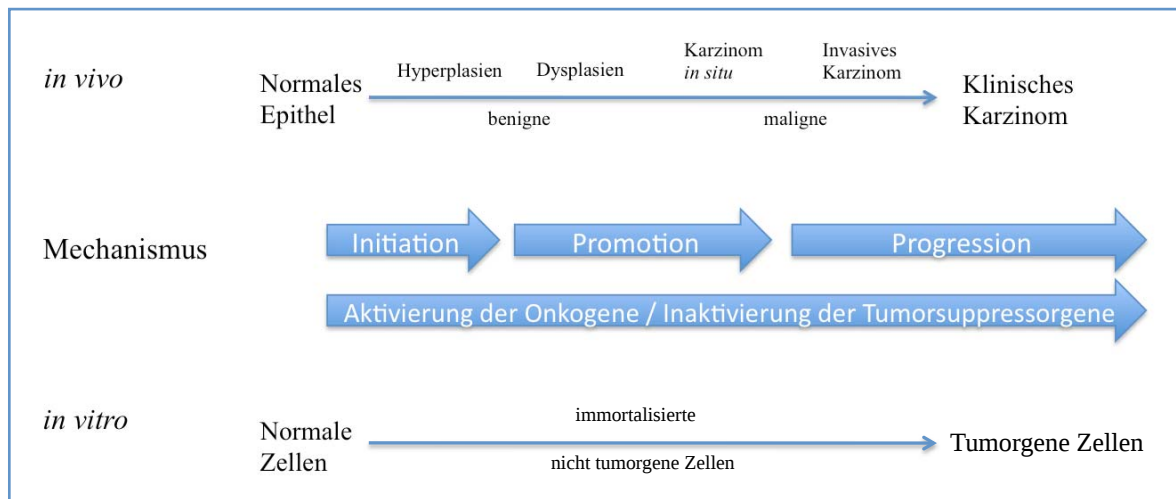


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Karzinogenese von menschlichen Epithelgeweben und Zellen. Das Konzept der stufenweise Auslösung von geno- und phänotypischen Veränderungen lässt sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachten; modifiziert nach [22].

Dieser Langzeitprozess der Karzinomentwicklung wird durch das Mehrstufenmodell der Maushautkarzinogenese am besten charakterisiert. Dabei zerlegt es operational und mechanistisch die gut charakterisierten Teilschritte der Initiation, Promotion und malignen Progression und bietet eine Grundlage zur Identifizierung karzinomrelevanter Gene, sowie der Funktionsanalyse von definierten genetischen Veränderungen bei der Karzinomentwicklung [23; 24; 25; 26].

Nach aktuellem Forschungsstand geht man auch beim Pankreaskarzinom von einer mehrstufigen Tumorgenese aus. Diese mehrstufige Tumorzelltransformation manifestiert sich in fortschreitenden histologischen Veränderungen des duktales Epithels, den sogenannten PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) Läsionen I-III [27; 28]. Die unterschiedlichen Läsionen sind durch zeitlich nacheinander auftretende genetische, strukturelle und zelluläre Alterationen gekennzeichnet (siehe Kapitel 1.3.3).

1.2. Das Pankreas: Aufbau und Funktion

Die Bauchspeicheldrüse, auch Pankreas genannt (von gr. *pán*: ganz und *kréas*: Fleisch), ist ein ca. 16 cm langes und 3-4 cm breites keilförmiges Drüsenorgan mit einer Masse von bis zu 100 g, welches in unregelmäßige Läppchen unterteilt ist. Es liegt retroperitoneal zwischen Magen und den großen Bauchgefäßen (Aorta und *Vena cava inferior*) auf Höhe des 2. Lendenwirbels und steht in enger Beziehung zum Zwölffingerdarm, der den Pankreaskopf umfasst. Die Bauchspeicheldrüse wird grob in drei Abschnitte unterteilt:

1. *Caput pancreatis*: der Pankreaskopf ist der dickste Teil der Bauchspeicheldrüse, er liegt rechts von der Wirbelsäule
2. *Corpus pancreatis*: der längliche, horizontal verlaufende Pankreas-Körper der Bauchspeicheldrüse
3. *Cauda pancreatis*: der Pankreasschwanz, der bis zur Milz reicht

Der Übergang vom Pankreaskopf zum Pankreaskörper wird durch die *Incisura pancreatis* markiert. Aufgrund seiner Funktion als Verdauungsdrüse besitzt das Pankreas einen Ausführungsgang, den Ductus pancreaticus (*Ductus Wirsungianus*), der gemeinsam mit dem von Leber und Gallenblase kommenden Hauptgallengang (*Ductus choledochus*) in einer warzenförmigen Erhebung - der sog. *Papilla duodeni major* - in den Zwölffingerdarm mündet. Dieser Ausführungsgang ist ca. 2 mm weit und nimmt die aus den Pankreasläppchen führenden kurzen, senkrechten Zuflüsse auf. Mitunter ist auch ein weiterer Pankreasgang vorhanden, der *Ductus pancreaticus accessorius*.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, ist das Pankreas seiner Funktion nach in einen exokrinen und endokrinen Drüsenanteil aufgeteilt. Als exokrine Drüse ist es die wichtigste Verdauungsdrüse des Gastrointestinaltraktes mit einem Gesamtanteil von über 90 %. Sie besteht aus den Pankreasgangzellen und den Azinuszellen. Beim Menschen wird von den Azinuszellen täglich fast 1,3 l Sekret produziert, wobei dessen Zusammensetzung überwiegend von der Art der aufgenommenen Nahrung abhängt. Seine Hauptbestandteile sind proteolytische Enzyme (wie z.B. Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidasen, Proelastase), Lipasen, Kohlehydrat spaltende Enzyme (α -Amylase) sowie Ribo- und Desoxyribonukleasen. Die Gangzellen fügen dem Pankreassaft noch Hydrogencarbonat-Ionen (HCO_3^-) hinzu, um den pH Wert des Nahrungsbreis auf pH 8 zu heben [29].

Das Pankreas als endokrine Drüse sezerniert über die Langerhans Zellen die Hormone Insulin und Glucagon direkt ins Blut. Etwa 2 % der Zellen sind inselförmig zusammengeschlossen und bilden die Langerhansschen Inseln. Die α -Zellen produzieren Glucagon, die β -Zellen Insulin, die δ -Zellen Somatostatin und die PP-Zellen das pankreatische Polypeptid.

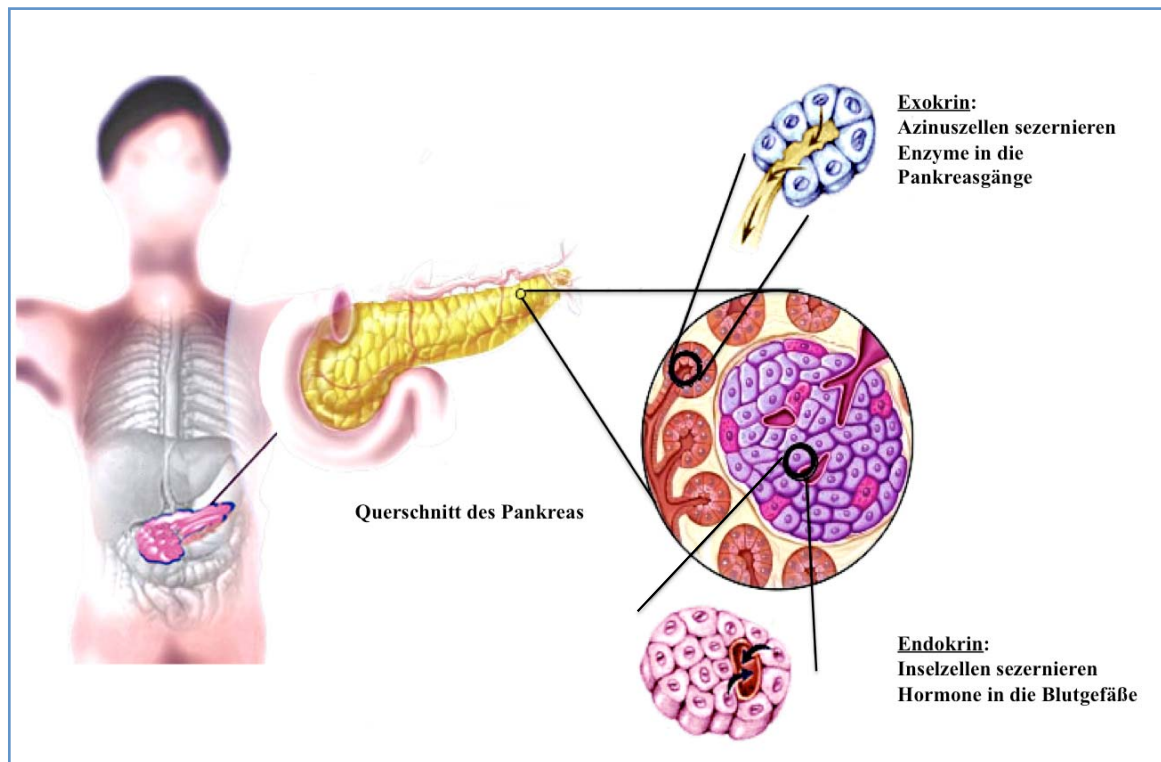


Abbildung 2: Lage und Aufbau des menschlichen Pankreas sowie Darstellung der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion; modifiziert nach [30].

1.3. Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige und hochgradig aggressive Neoplasie der Bauchspeicheldrüse. Laut Statistik des Robert Koch Institutes erkranken in Deutschland jährlich 6320 Männer und 6220 Frauen an bösartigen Veränderungen des Pankreas [31]. Weltweit dagegen sind es jährlich fast 200000 Fälle. Hierbei ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas mit mehr als 85 % der häufigste Typ unter den verschiedenen Tumorvarianten des Pankreas [32], gefolgt von periampullären Karzinomen, intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien, Azinuszellkarzinomen und den endokrinen Pankreastumoren, wie z.B. den Insulinomen [33]. Pankreastumore werden nach der

WHO-Klassifikation in benigne und maligne, vom exokrinen oder endokrinen Anteil des Pankreas ausgehende Geschwülste eingeteilt. Benigne Tumoren des Pankreas sind äußerst selten und gehen am häufigsten aus dem endokrinen System hervor. Die Mehrzahl der Pankreastumore ist maligner Art, entstammen dem exokrinen System und sind vom Typ eines duktaalen Adenokarzinoms. 70 % aller duktaalen Adenokarzinome befinden sich im Kopfbereich des Pankreas, danach folgen Korpus (20 %) und Kauda (10 %) [34].

1.3.1. Epidemiologie

Tumore der Bauchspeicheldrüse stellen 3 % aller Krebsneuerkrankungen sowie 6 % aller krebsbedingten Todesfälle dar und sind bei Männern wie Frauen die vierthäufigste Krebstodesursache in Deutschland (Abbildung 3 + Abbildung 4) [31].

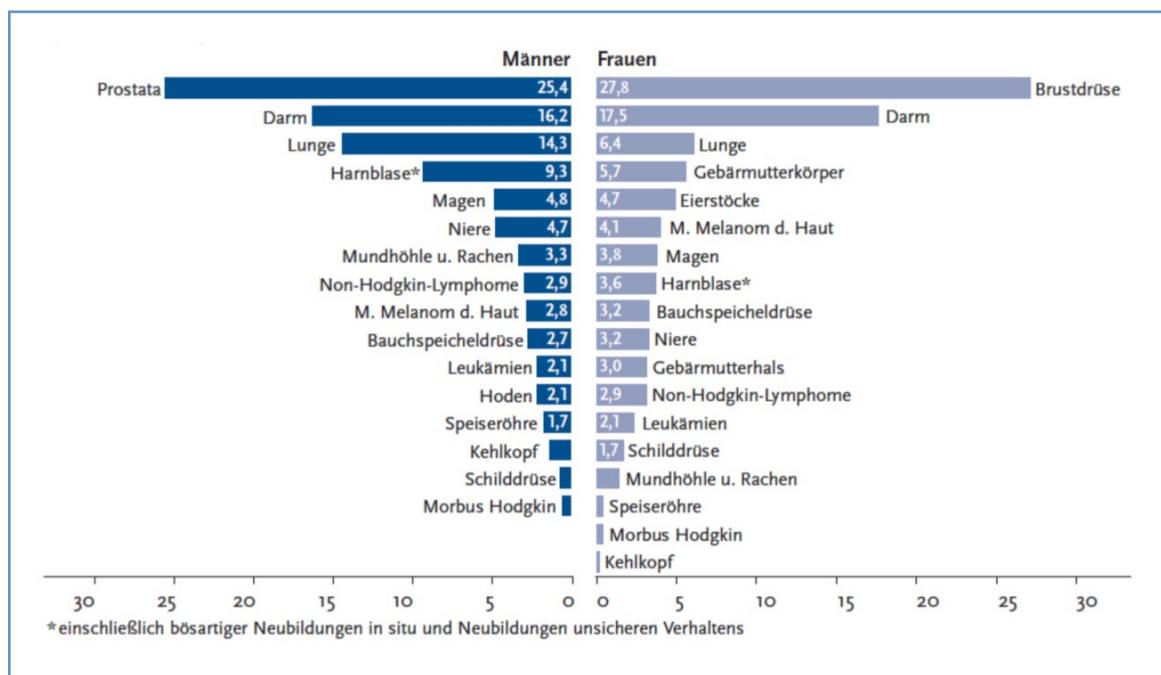


Abbildung 3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen ohne nicht melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2004 [31].

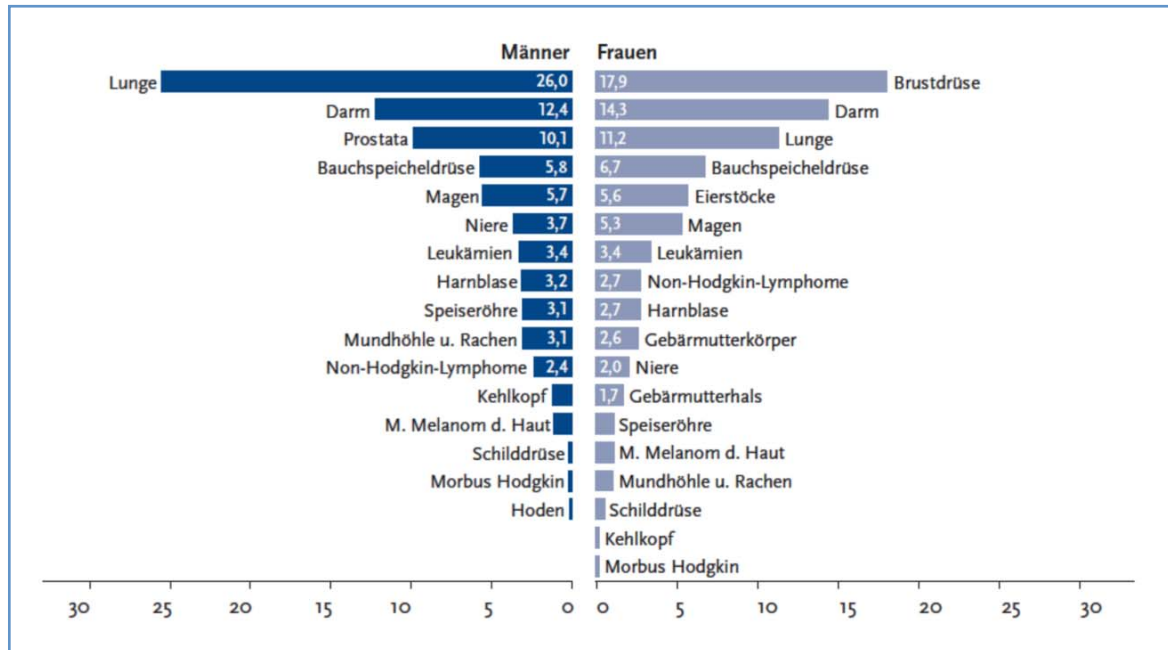


Abbildung 4: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2004 [31].

Die Diskrepanz zwischen einerseits eher geringer Prävalenz und andererseits hoher Sterblichkeitsrate erklärt sich durch eine extrem schlechte Prognose der Erkrankung. Die Inzidenz ist der Mortalität gleichzusetzen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur ca. 1-5 %. An diesen harten Fakten hat sich in den letzten Jahrzehnten nichts Grundlegendes geändert. Pankreaskarzinome sind in einem Alter unter 40 Jahren selten; mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit exponentiell zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 67, für Frauen bei 74 Jahren. Die Inzidenz stieg in den 70er Jahren an und ist seit den 90er Jahren unverändert (10/100000). Die niedrigste Inzidenz findet sich für Europa in Spanien und Südfrankreich. Weltweit zeigt der Vergleich zwischen Europa, Nordamerika und Japan einerseits und Ländern in Afrika und Asien andererseits dort eine deutlich niedrigere Inzidenz (1-6/100000) [35; 36]. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass Umweltfaktoren bei der Karzinogenese des Pankreas eine wichtige Rolle spielen.

1.3.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist trotz jahrzehntelanger Forschung letztendlich nicht geklärt. Dafür konnten epidemiologische Studien verschiedenste Risikofaktoren identifizieren, welche die Entstehung des Pankreaskarzinoms begünstigen. Zu den eingangs erwähnten Umwelt- und Lifestyle-Noxen zählen der Alkohol- und Nikotinabusus, eine ungesunde Ernährung mit viel rotem Fleisch, geräucherte oder gegrillte Speisen und eine besonders fettreiche Ernährung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (ω -6-Fettsäuren) [37; 38]. Diverse Kohortenstudien und Fallkontrollstudien belegen eindeutig, dass der Tabakkonsum in Form von Zigaretten- oder Zigarrenrauchen das Risiko für das Pankreaskarzinom verdoppelt [39; 40; 41; 42]. Eine Beendigung des Rauchens führt nach ca. 15 Jahren zu einer Senkung des Risikos auf das der Normalbevölkerung [43]. Alkohol kann nur indirekt als Risikofaktor angesehen werden, da er lediglich durch Auslösung einer chronischen Pankreatitis die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms erhöht [44; 45]. Heftig diskutierte Risikofaktoren wie Kaffee, Tee sowie erhöhte Aufnahmen von Milchprodukten konnten inzwischen widerlegt werden [46; 47; 48; 49]. Weitere prädisponierende Faktoren sind Diabetes mellitus und Adipositas. In vielen Studien wurde auch der Einfluss genetischer Faktoren auf das Pankreaskarzinom untersucht. Hierbei zeigte sich eine familiäre Prädisposition [50]. Daneben haben Patienten mit einem Pankreas-, Mamma- oder Ovarialkarzinom, zystischer Fibrose und hereditärer Pankreatitis ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms [28; 43].

Tabelle 1: Genetische Syndrome mit einer Assoziation mit Pankreaskarzinomen [43].

Syndrom	Vererbung	Gen	Chromosom	Manifestation
Hereditäre Pankreatitis	AD	Kationisches Trypsinogen-Gen (PRSS1)	7q35	Rezidivierende und später chronische Pankreatitis, beginnend meist im Kindesalter
Familiäres Pankreaskarzinom	AD ?	unbekannt	Unbekannt 4q32-34	Familiäre Häufung von Pankreaskarzinomen
Zystische Fibrose (Mukoviszidose)	AD	CTFTR-Gen	7q31	Exokrine Pankreasinsuffizienz, chronische Pankreatitis, rezidivierende Bronchitiden, biliäre Zirrhose, Infertilität
Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC)	AD	MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6	2p, 3p, 2q, 7q, 2p	Kolon- und Dünndarmkarzinome, Ovarial- und Endometriumkarzinome
Familiäre Adenomatöse Polyposis	AD	-	-	Adenome und Karzinome des gesamten Darmes, aber auch der Schilddrüse und des Gehirns
Familial Atypical Multiple Mole-Melanomas (FAMMM)	AD	p16	9p	Multiple Naevi, dysplastische Naevi, Multiple maligne Melanome
Peutz-Jeghers-Syndrom	AD	unbekannt	19p	Polypen des gesamten GI-Traktes und (peri-) orale Melaninablagerungen
Familiäres Mammakarzinom	AD	BRCA2	13q	Weibliches und männliches Mammakarzinom und andere Karzinome
Ataxia telangiectatica hereditaria	AR	ATM	11q22-23	Cerebelläre Ataxia, Telangiektasien, Thymushypoplasie, Lymphatische Leukämien, Lungen-, Gallenblasen-, Mamma- und Magenkarzinome

AD= autosomal-dominant, AR= autosomal-rezessiv

1.3.3. Tumorphathogenese

Der Begriff „Pankreaskarzinom“ wird oft synonym für das duktales Adenokarzinom verwendet, welches die Mehrheit der Karzinome ausmacht. Dennoch sollte genau unterschieden werden, da die verschiedenen Subtypen nicht zwangsläufig die gleiche ungünstige Prognose haben. Über die Entstehung des duktales Adenokarzinoms gibt es verschiedene Theorien. Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, postuliert man, ähnlich wie bei

der Karzinogenese kolorektaler Tumoren, eine schrittweise Entwicklung ausgehend von Normalgewebe über Hyperplasie und Dysplasie zum Karzinom. Der zelluläre Ursprung des duktales Adenokarzinoms ist bis heute ungeklärt. Eine Vielzahl an Hypothesen beschreibt die Entwicklung des Karzinoms aus Inselzellen, Azinuszellen, Stammzellen oder Gangzellen. Die Meinungen sind diesbezüglich gespalten. Basierend auf klinischen und histologischen Studien besagt der allgemeine Konsens, dass drei mögliche Progressionswege zum duktales Adenokarzinom führen können [51; 52; 53]:

- Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien (PanIN)
- Muzinöse Zystische Neoplasien (MCN)
- Intraduktales Papilläre Muzinöse Neoplasien (IPMN)

Da eine *in vivo* Untersuchung des Organs nicht möglich ist und die frühen Läsionen keinerlei symptomatische Anzeichen zeigen, ist es sehr kompliziert, den tatsächlichen Ursprung zu benennen. Die bislang am besten untersuchte Vorläuferläsion ist die der PanIN [27; 54]. Dabei werden anhand morphologischer und zellulärer Änderungen drei Grade unterschieden: die flache duktales hyperplastische Läsion PanIN-1A, die papilläre duktales Hyperplasie PanIN-1B, die flache und papilläre Hyperplasie mit Zellpolarisationsverlust PanIN-2 sowie die schwere duktales Hyperplasie PanIN-3, welche auch als *carcinoma in situ* bezeichnet wird.

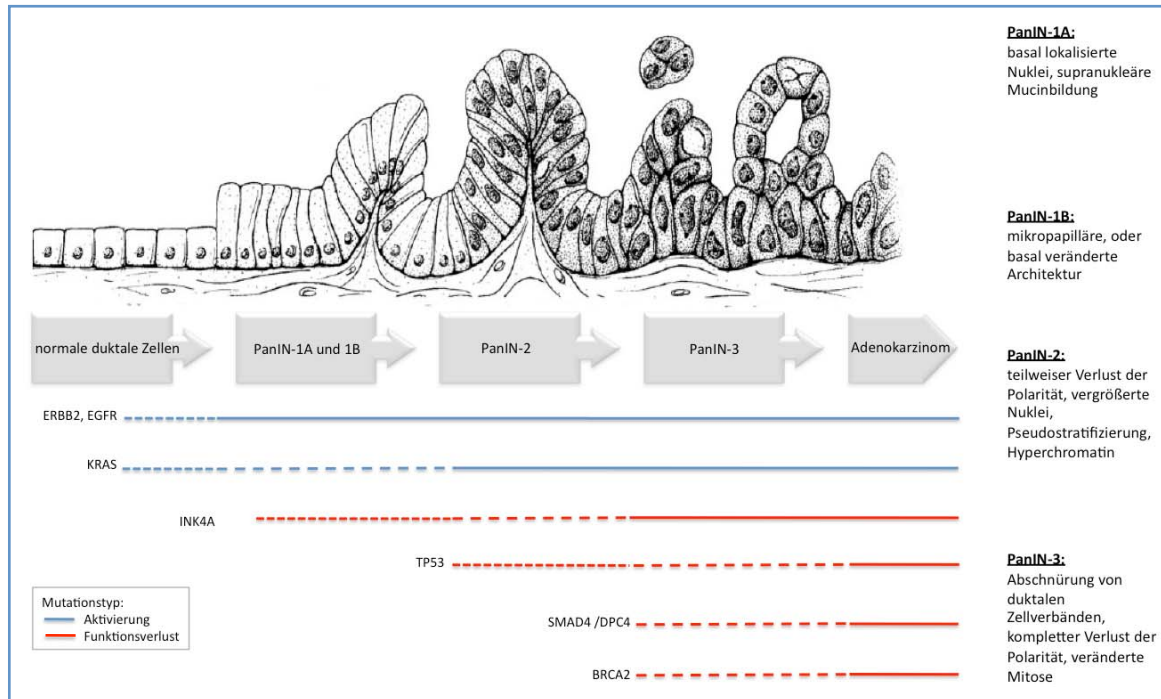


Abbildung 5: Tumorprogressionsmodell des duktales Adenokarzinoms und die damit verbundenen genetischen Aberrationen in zeitlicher Abfolge; modifiziert nach [55; 56].

Anhand molekulargenetischer Untersuchungen von PanIN, gewonnen durch Lasermikrodissektion, konnte die Akkumulation der beim Pankreaskarzinom am häufigsten auftretenden Mutationen am Modell der PanIN Läsionen nachvollzogen werden [57; 58]. In frühen Läsionen zeigt sich zu Beginn eine konstitutive Aktivierung von K-RAS in ca. 30 % aller Zellen, bedingt durch eine Mutation im Codon 12 des K-ras-Gens. Die Häufigkeit dieser Mutation nimmt erst im zeitlichen Verlauf der PanIN-Progression zu, weshalb davon auszugehen ist, dass die konstitutive Aktivierung von K-RAS nicht das initiale Ereignis der Pankreastumorgenese darstellt [59]. Zudem treten die frühen Läsionen bis PanIN-2 auch spontan im gesunden Gewebe auf, ohne weiteres Tumorpotential zu entwickeln. Die meisten in Abbildung 5 gezeigten Mutationen manifestieren sich vor allem in PanIN-3 Läsionen, weshalb hier auch von einem zunehmenden Malignitätspotential ausgegangen werden kann. Fast alle Mutationen der PanIN-3 Läsionen finden sich auch im späteren duktales Adenokarzinom wieder; zu ihnen gehören z.B. die Inaktivierung von p16, p53, SMAD4/DPC4, BRCA2 sowie die Überexpression von ERBB2 (Her-2/NEU) und EGF. Beim Pankreaskarzinom ist das p53-Gen in 50-75 % aller Fälle entweder mutiert oder deletiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass auf den Verlust eines Allels meist eine Mutation im zweiten Allel folgt (loss of heterozygosity = LOH). Die Mutationen erfolgen gehäuft in der DNA

Bindungsdomäne des *p53*-Gens zwischen den Codons 175 und 273 und sind überwiegend vom Typ einer CpG-Transition [60].

Der Tumor ist selten nur auf das Pankreasparenchym begrenzt. Meist sind das umliegende Fettgewebe, angrenzende Bereiche des Duodenum und des Gallengangs infiltriert. Das duktale Adenokarzinom infiltriert massiv in Perineuralspalten und Lymphgefäße. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 80-90 % der Patienten Metastasen auf, wobei bevorzugte Ansiedlungen von Tochtergeschwulsten in der Leber, den Lymphknoten und der Lunge erfolgen. Dies erschwert eine R0-Resektion (vollständige Tumorentfernung inklusive freier Schnittränder) und erhöht gleichermaßen die Rezidivrate bei angestrebter R0-Resektion auf über 60 %. Die Ausdehnung des Tumors und dessen Tumorränder werden nach dem TNM-System klassifiziert. Die in Tabelle 2 dargestellte TNM-Klassifikation erlaubt prognostische Aussagen und bestimmt häufig die weiteren Therapieoptionen.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms (TNM, 6th Edition) [61].

T Primärtumor	
T _x	Primärtumor kann nicht untersucht werden
T ₀	kein Primärtumor nachweisbar
T _{is}	Carcinoma <i>in situ</i>
T ₁	Größter Durchmesser des Primärtumors innerhalb des Pankreas < 2cm
T ₂	Größter Durchmesser des Primärtumors innerhalb des Pankreas > 2cm
T ₃	Tumor infiltriert peripankreatisches Fettgewebe und Pfortader
T ₄	Tumor infiltriert benachbarte Organe (z.B. Duodenum, Galle) oder aterielle Gefäße (<i>A. mesenterica</i>)
N benachbarte (regionäre) Lymphknoten	
N _x	benachbarte Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N ₀	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N ₁	Metastasen
M Fernmetastasen	
M _x	keine Beurteilung von Fernmetastasen
M ₀	keine Fernmetastasen
M ₁	Fernmetastasen

1.3.4. Klinik und Therapie

Die Pankreasresektion zur potentiell vollständigen Tumorentfernung ist nur bei ca. 15-20 % aller Patienten möglich (siehe 1.3.3) [1]. Durch eine R0-Resektion erhöht sich das 5-Jahres-Überleben aber lediglich auf 20-30 % [1; 62]. Ein Tumorstadium der Klasse T₄ schließt eine Operation meist aus. Patienten mit Metastasen in Leber, Lunge und Peritoneum, insofern vorher bekannt, werden im Klinikalltag ebenfalls nicht reseziert. Somit bleibt diesen Patienten nur eine palliative Therapie zur Krankheitsstabilisierung und

Verbesserung der Lebensqualität. Dies kann die mediane Überlebenszeit auf 6-9 Monate erhöhen. Palliative Eingriffe werden meist in Form von Bypass-Operationen durchgeführt, um einen problemlosen Gallenabfluss sowie eine ungehinderte Nahrungspassage zu ermöglichen. Da Bestrahlung als alleinige therapeutische Maßnahme aufgrund der vielen Metastasemöglichkeiten und der dazu benötigten hohen Strahlungsfläche zu große physische Schädigungen bei den Betroffenen verursachen würde, stellen kombinierte multimodale Therapieansätze wie z.B. Radiochemotherapie oder neuerdings auch Immuno-Radio-Chemo-Kombinationen wichtige Alternativen zur bisherigen kurativen medizinischen Behandlung dar [63; 64; 65].

Im Rahmen neoadjuvanter Therapiekonzepte besteht während der Therapie das Risiko einer Tumorprogression und somit der Verlust der Resektabilität. Somit konzentrieren sich die Bemühungen im Wesentlichen auf adjuvante Therapiekonzepte. Gemcitabin (Gemzar®) ist ein Deoxycytidin-Analogon, welches seit der Zulassung 1996 die so genannte „palliative First-Line-Chemotherapie“ darstellt. Es übertrifft die Effektivität der früher eingesetzten Monotherapie mit 5-FU um das Vierfache [66]. In laufenden randomisierten Studien werden neue Therapieprotokolle mit Cisplatin/Interferon- α (CapRi) oder Gemcitabin (ESPAC-3) ergänzend oder als Alternativ-Chemotherapeutika zu 5-FU auf Wirksamkeit und Toleranz getestet. Der postoperative Allgemeinzustand eines Patienten lässt in vielen Fällen eine aggressive Chemotherapie mit 5-FU oder Cisplatin nicht zu. Da der Nutzen einer Chemotherapie eher fragwürdig war, wurde auch häufig darauf verzichtet. Mit Gemcitabin stellt sich langsam ein Umdenken ein. Es ist wesentlich verträglicher und zeigt dank guter Ansprechraten eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität.

Die Therapieoptionen der Zukunft zielen auf ein „molekulares Duell“ zwischen Tumor und Therapeut ab. Da die Gefäßversorgung des Tumors und die beim Pankreaskarzinom sehr ausgeprägte desmoplastische Reaktion attraktive Targets darstellen, sind derzeit Angiogenese-Inhibitoren und Matrix-Metallo-Protease-Inhibitoren in der klinischen Evaluation. Zudem wird nach Möglichkeiten gesucht, die Expression/ Funktion von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zu modifizieren, um Primärtumorwachstum und Metastasierung einzudämmen (z.B. Demethylierung, Deacetylierung).

1.4.Oxidativer Lipidstoffwechsel

Fette werden dem Körper über die Nahrung zugeführt. Unter „Lipidstoffwechsel“ werden meist nur die gängigen Aufgaben und Funktionen der Lipide beschrieben wie z.B. Triacylglyceride als Energiespeicher, Cholesterin, Phospho- und Glycolipide als Membranbestandteile und Cholesterin als Ausgangsstoff für Steroidhormone und Gallensäuren [67]. Dem wichtigen oxidativen Lipidstoffwechsel wird dagegen eher eine untergeordnete Rolle zu geschrieben. Als Edukte des Lipidmetabolismus dienen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAS), welche in veresterter Form in Membranstrukturen integriert sind. Sie können enzymatisch oder nicht enzymatisch in eine Vielzahl von Oxylipinen metabolisiert werden, welche in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Organismus involviert sind. Dabei wird beim Menschen vor allem die mehrfach ungesättigte C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)-Eicosatetraensäure) umgesetzt. Die entstehenden Produkte werden allgemein als Eicosanoide (aus dem griechischen: eicosa = 20) bezeichnet [67]. Diese Oxylipine besitzen eine hormonähnliche Wirkung, sind jedoch aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften wesentlich instabiler, sodass ihre Wirkungsweise als Lipidmediatoren lokal eingeschränkt ist.

1.4.1. Arachidonsäure

Die Arachidonsäure (AA) kommt im menschlichen Organismus fast ausschließlich in gebundener Form als Teil von Membranlipiden wie Glycerophospholipiden vor (in der sn-2-Position). Damit sie oxidativen Reaktionen zur Verfügung steht, muss die AA zuerst aus den Membranstrukturen freigesetzt werden, da die freie Konzentration an AA in der Zelle minimal ist. Diese Aufgabe übernimmt zum einen die Phospholipase-A₂ (PLA₂), zum anderen die Phospholipase-C in Kombination mit der Diacylglycerin-Kinase (DAG-Kinase) und der Diacylglycerin-Lipase (DAG-Lipase) [68]. Durch einen externen oder internen Stimulus z.B. vermittelt durch Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α) wird die inaktive PLA₂ aktiviert und spaltet die Arachidonsäure vom Glycerophosphatrest in der sn-2 Position ab.

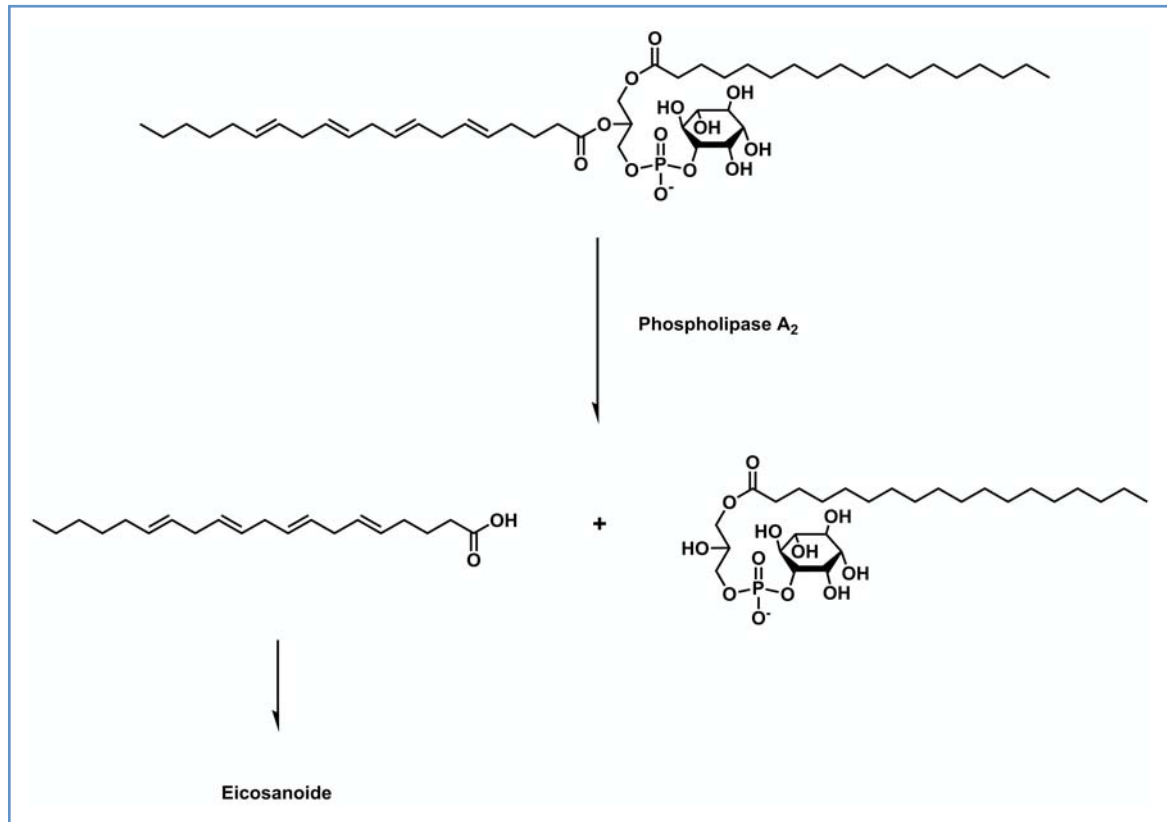


Abbildung 6: Enzymatische Reaktion der PLA₂ zur Freisetzung von Arachidonsäure aus der Membran.

Die freigesetzte Arachidonsäure kann nun enzymatisch entlang drei verschiedener Stoffwechselwege metabolisiert werden, wie es in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist.

- Cyclooxygenasen (COX)
- Cytochrom-P₄₅₀ –haltige Monooxygenasen (CYP)
- Lipxygenasen (LOX)

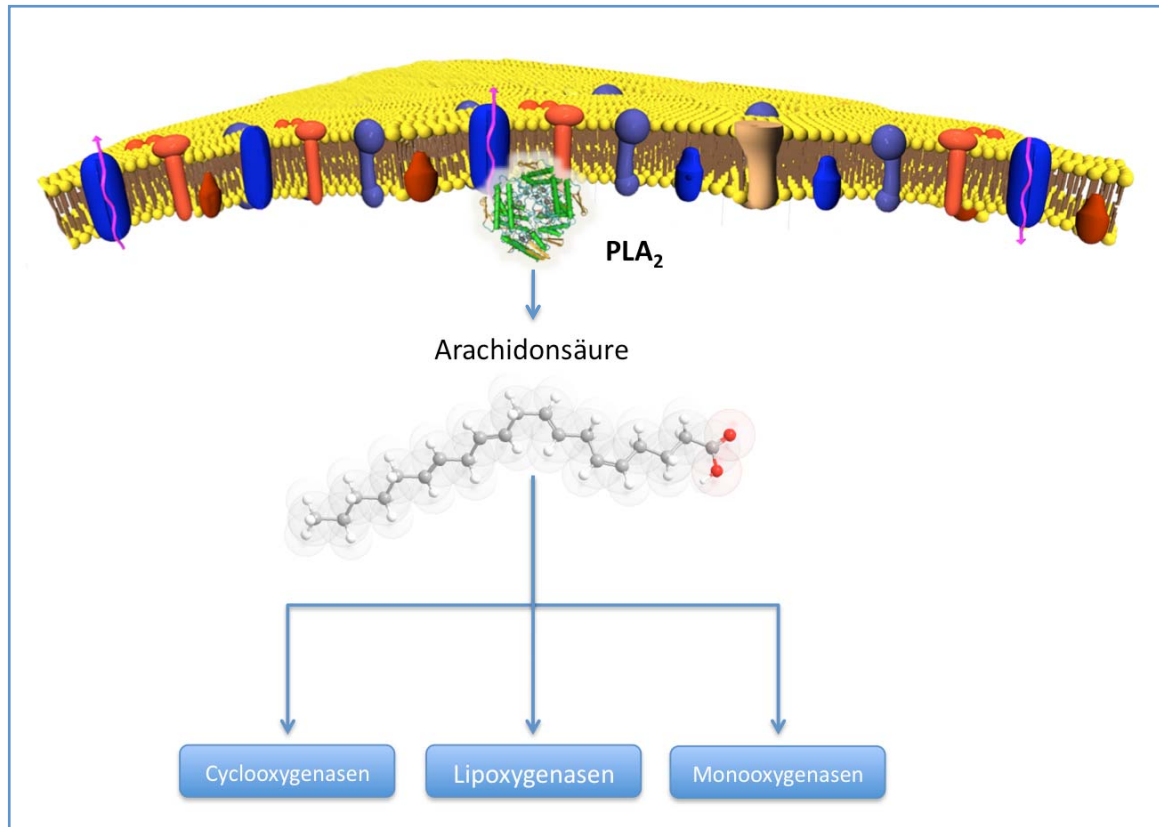


Abbildung 7: Möglichkeiten der Umsetzung von freigesetzter Arachidonsäure durch die Stoffwechselwege der Lipoxygenasen, Monooxygenasen und Cyclooxygenasen.

Die Cyclooxygenasen metabolisieren die freigesetzte Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂, welches als instabiles Zwischenprodukt in Prostaglandin H₂ (PGH₂) überführt wird. PGH₂ ist Substrat weiterer Enzyme wie den Prostaglandinsynthasen, der Prostazyklinsynthase und der Thromboxansynthase, wobei diverse Prostaglandine, Thromboxane und Prostazykline gebildet werden [69]. Prostaglandine sind wesentlich an der Entstehung von Fieber, Schmerz und weiteren Reaktionen beteiligt.

Die Cytochrom-P₄₅₀-haltigen Monooxygenasen gehören zu der Superfamilie der Hämproteine und besitzen eine Oxidoreduktaseaktivität, womit sie Arachidonsäure zu razemischen Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEn) und Epoxyeicosatetraensäuren (EETn) verstoffwechseln können [70].

1.4.2. Lipoxygenasen

Die Lipoxygenasen sind nicht-Häm-Eisen gebundene Dioxygenasen und katalysieren die Oxidation von Pentadienstrukturen wie sie in PUFAS enthalten sind [71; 72]. Lipoxygenasen sind eine ubiquitär vorkommende, heterogene Enzymgruppe, die in vielen unterschiedlichen Organismen beschrieben wurde wie z.B. Pilzen, Invertebraten, Pflanzen und Tieren [73; 74; 75; 76; 77]. Ihre Funktionen sind ebenso vielfältig. In Pflanzen sind sie bei der Synthese von Aroma- und Lockstoffen beteiligt, in höheren Organismen stellen sie wichtige Schlüsselenzyme zur Synthese von Signalmolekülen dar, die verschiedene physiologische Prozesse wie Differenzierung und Entzündungsreaktionen steuern. Als Substrate verwenden die pflanzlichen Lipoxygenasen Linol- und Linolensäure, während die tierischen Lipoxygenasen dagegen fast ausschließlich Arachidonsäure nutzen und nur zu einem geringen Prozentsatz Linolsäure.

Bei Menschen sind sechs verschiedene Lipoxygenase-Formen bekannt, in der Maus sieben. Die unterschiedlichen Säuger-LOXn werden entsprechend der Positionsspezifität der Sauerstoff-Insertion in Arachidonsäure als 5-, 8- 12- oder 15-LOX klassifiziert. Bei gleicher Positionsspezifität erfolgt eine zusätzliche Unterteilung hinsichtlich des geweblichen Expressionsmusters. Die durch die Dioxygenierung entstehenden Primärprodukte heißen dann analog 5-, 8-, 12- oder 15-Hydroperoxide. Anhand ihrer phylogenetischen Verwandtschaft werden die Säuger-LOXn in vier verschiedene Untergruppen eingeteilt, die 5-LOXn, die Blutplättchen-Typ-12-LOXn, die 12/15-LOXn mit dualer Positionsspezifität und die Epidermis-Typ-LOXn [78; 79], eine heterogene Gruppe mit ungewöhnlichen strukturellen und enzymatischen Eigenschaften.

Es existieren zwei Isoformen der 12-LOX, die Blutplättchentyp (*p*)12S-LOX mit dem Hauptprodukt 12S-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12S-HPETE) und die 12R-LOX, die als einzig bekannte Säuger-LOX R-enantiomere Reaktionsprodukte liefert.

Auch von 15-LOX wurden zwei Isoformen mit unterschiedlicher Gewebsverteilung und Substratpräferenz charakterisiert. 15-LOX-1 gehört zur Gruppe der 12/15-LOXn und oxidiert Arachidonsäure zu 15S- und 12S-HETE und Linolsäure zu 13S-Hydroperoxyoctadeca-diensäure (13S-HPODE), während das Hauptprodukt der durch 15-LOX-2-katalysierten Arachidonsäure-Oxidation 15S-HPETE ist [80; 81]. Die 15-LOX-1 wurde zuerst in Retikulozyten des Menschen und die homologe Form der Maus als Leukozyten-Typ 12-LOX identifiziert und zeigt ein sehr breites

Expressionsspektrum. Mittlerweile konnte sie in Makrophagen, Eosinophilen, bronchialen Epithelzellen, der Epidermis und im Kolon nachgewiesen werden [82]. 15-LOX-2, ein Mitglied der epidermalen LOXn, weist dagegen ein wesentlich eingeschränkteres Expressionsmuster auf. Sie wurde erstmals 1997 aus Haarfollikeln und der Kornea isoliert [81]. Die Expression dieser LOX ist auf epitheliale Gewebe von Prostata und Lunge, der Haut sowie Kornea begrenzt. Im Gegensatz zur 15-LOX-1 konnte sie nicht in Leukozyten nachgewiesen werden [81]. Bei einer weiteren LOX der Epidermis-Typ Untergruppe, der eLOX-3, handelt es sich um eine Hydroperoxid-Isomerase.

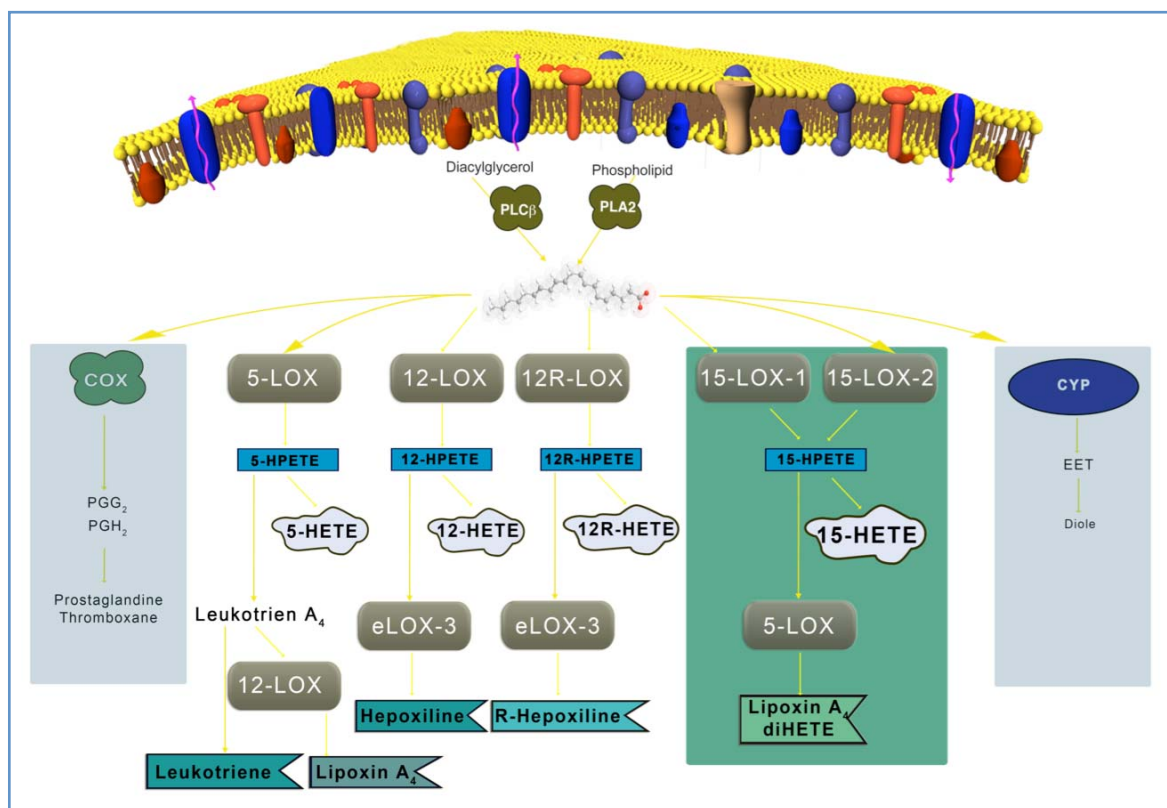


Abbildung 8: Der Lipoxygenase-Stoffwechsel. Dargestellt sind alle sechs verschiedenen humanen Lipoxygenasen und deren Stoffwechselprodukte durch Umwandlung von Arachidonsäure. Die beiden alternativen Signalwege durch Cyclooxygenasen und Monooxygenasen sind flankierend links und rechts dargestellt. Hervorgehoben ist der 15-LOX Isoformen Stoffwechselweg, der in Abschnitt 1.4.5 genauer erläutert wird.

1.4.3. Struktur der Lipoxygenasen

Als Mitglieder einer Multigenfamilie weisen die Säuger-LOXn untereinander einen hohen Grad an Sequenzhomologie auf (60-90 % Identität bei Vergleich der Aminosäuresequenzen) und besitzen konservierte Gen- und Proteinstrukturen. Die Gene weisen hoch konservierte Exon-Intron-Übergänge auf und bestehen aus 14-15 Exons. Mit Ausnahme der 5-LOX, deren Gen auf Chromosom 10 liegt, befinden sich alle Gene der menschlichen LOXn auf Chromosom 17, was darauf hinweist, dass sie während der Evolution durch Genduplikationen aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden sind. Die Gene der Epidermis-Typ-LOXn liegen eng benachbart in einem Cluster an Position 17p13.1 in unmittelbarer Nähe zum Tumorsuppressor *p53*. Die LOX-Gene der Maus befinden sich auf entsprechenden syntenen Regionen auf Chromosom 11 [83].

Lipoxygenasen bestehen aus nur einer Polypeptidkette mit einer Länge von 662-711 Aminosäuren. Die Struktur der Lipoxygenasen wurde erstmals vor 15 Jahren anhand der LOX-1 aus Sojabohnen aufgeklärt [84; 85]. Von den Säuger-LOXn kennt man bisher nur die Struktur der Kaninchen Retikulozyten 15-LOX-1, die der Struktur der Pflanzen-LOX erstaunlich ähnlich ist [86]. LOXn bestehen aus einer N-terminalen Domäne und einer größeren C-terminalen Domäne. Die N-terminale Domäne setzt sich aus acht antiparallelen β -Faltblättern zusammen, während die C-terminale Domäne aus α -Helices besteht, deren Struktur nur von einem β -Faltblatt durchbrochen wird.

Abbildung 9 zeigt schematisch ein räumliches Strukturmodell von 15-LOX-2 mit den oben genannten Proteindomänen und anhand eines Gittermodells die Struktur des katalytischen Zentrums der Lipoxygenasen. Den elementaren Bestandteil der katalytischen Aktivität der Lipoxygenasen stellt die C-terminale Domäne dar. Das aktive Zentrum des Enzyms besteht aus mehreren Helices mit streng konservierten Histidin (His)-Resten, einem nichthämgebundenden Eisenion, welches von drei der konservierten His-Resten und dem C-terminalen Isoleucin komplexiert wird. Aus der Röntgenkristallstruktur lässt sich ein tunnelförmiger Zugang zum aktiven Zentrum für die Fettsäuren und eine bislang wenig charakterisierte Tasche für den molekularen Sauerstoff ableiten [84; 86].

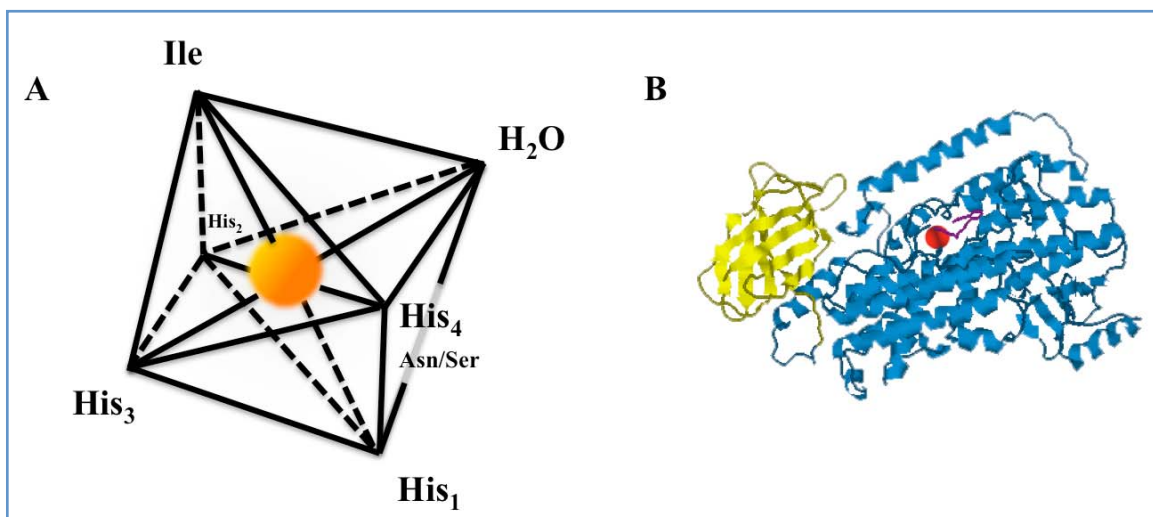


Abbildung 9: Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums mit den komplexierenden Aminosäureresten, dem Eisenatom und Wassermolekül; modifiziert nach [78]. 3D-Strukturmodell der humanen 15-LOX-2 mit der räumlichen Struktur der N- und C-terminalen Domänen. In der katalytischen C-terminalen Domäne (blau) ist das Substrat in lila und das Eisenatom (rot) dargestellt. Die wesentlich kleinere N-terminale Domäne ist in gelb dargestellt. (Strukturmodell aus der Arbeitsgruppen eigenen LOX-Database nach W. von der Lieth [87]).

1.4.4. Lipoxygenasereaktion

Die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch Lipoxygenasen ist eine mehrstufige Reaktion, bei der aus einer *cis,cis*-1,4-Pentadien-Teilstruktur eine 1-Hydroperoxy-2-*trans*,4-*cis*-pentadien-Struktur entsteht. Dies wird durch das redoxaktive, nicht-hämgebundene Eisenion im aktiven Zentrum vermittelt. Zur Aktivierung wird durch Hydroperoxide des Zytosols das Eisenion (Fe^{2+}) in den Oxidationszustand Fe^{3+} überführt. Im Zusammenhang der Aktivierung wird auch molekularer Sauerstoff diskutiert [88; 89]. Der weitere Reaktionsweg ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Zur Diskussion stehen der Carbanionmechanismus und der radikalische Mechanismus, wobei im Allgemeinen der radikalische Mechanismus favorisiert wird. Dabei dient das Hydroxidion als Protonenakzeptor und spaltet ein Wasserstoffatom von der Methylengruppe des Substrates ab. Die Lage der Methylengruppe (C-13, C-7 und C-10) ist spezifisch für die verschiedenen LOXn und abhängig von der Lage des Substrats in der hydrophoben Tasche des aktiven Zentrums. Durch diese stereo- und regiospezifische Abspaltung des H-Atoms kommt es zur Bildung eines C-Radikals. Das überschüssige Elektron könnte sich im gesamten Radikalsystem verteilen; jedoch kommt es ausschließlich zu einer Verschiebung des Elektrons um ± 2 C-Atome [90]. Die anschließende Insertion des molekularen Sauerstoffs erfolgt ebenfalls stereospezifisch von der der Wasserstoffabstraktion

gegenüberliegenden Seite der von den Doppelbindungen gebildeten Ebene (antarafacialer Charakter). Inwieweit der Sauerstoff über die Substrattasche oder einen separaten eigenen Zugang der Reaktion zugeführt wird, ist noch nicht vollständig charakterisiert (siehe 1.4.3) [91]. Die Insertion erfolgt in Position 5, 12 oder 15 unter Bildung der entsprechenden Peroxyl-AA, welche im weiteren Verlauf durch Addition eines H-Radikals, unter erneuter Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} , in die entsprechenden HPETEn überführt werden. Autokatalytisch oder durch Hydroperoxidaseaktivität zellulärer Proteine (Glutathion Peroxidase) werden die HPETEn dann direkt zu den entsprechenden Hydroxy-Verbindungen reduziert [92]. Alternativ erfolgt eine Metabolisierung über Sekundärreaktionen zu Folgeprodukten, von denen die Leukotriene, Lipoxine und Hepoxiline die bekanntesten Vertreter sind [93; 94].

Wie die Regio- und Enantioselektivität der einzelnen LOXn zustande kommt, ist derzeit noch umstritten, wird aber entscheidend durch die Bindung des Substrats bestimmt. Sowohl die Tiefe, mit der das Substrat in die katalytische Domäne des Proteins eintaucht, als auch die Orientierung des Substrats mit der Carboxylgruppe oder dem Methylende voraus, scheinen dabei von Bedeutung zu sein.

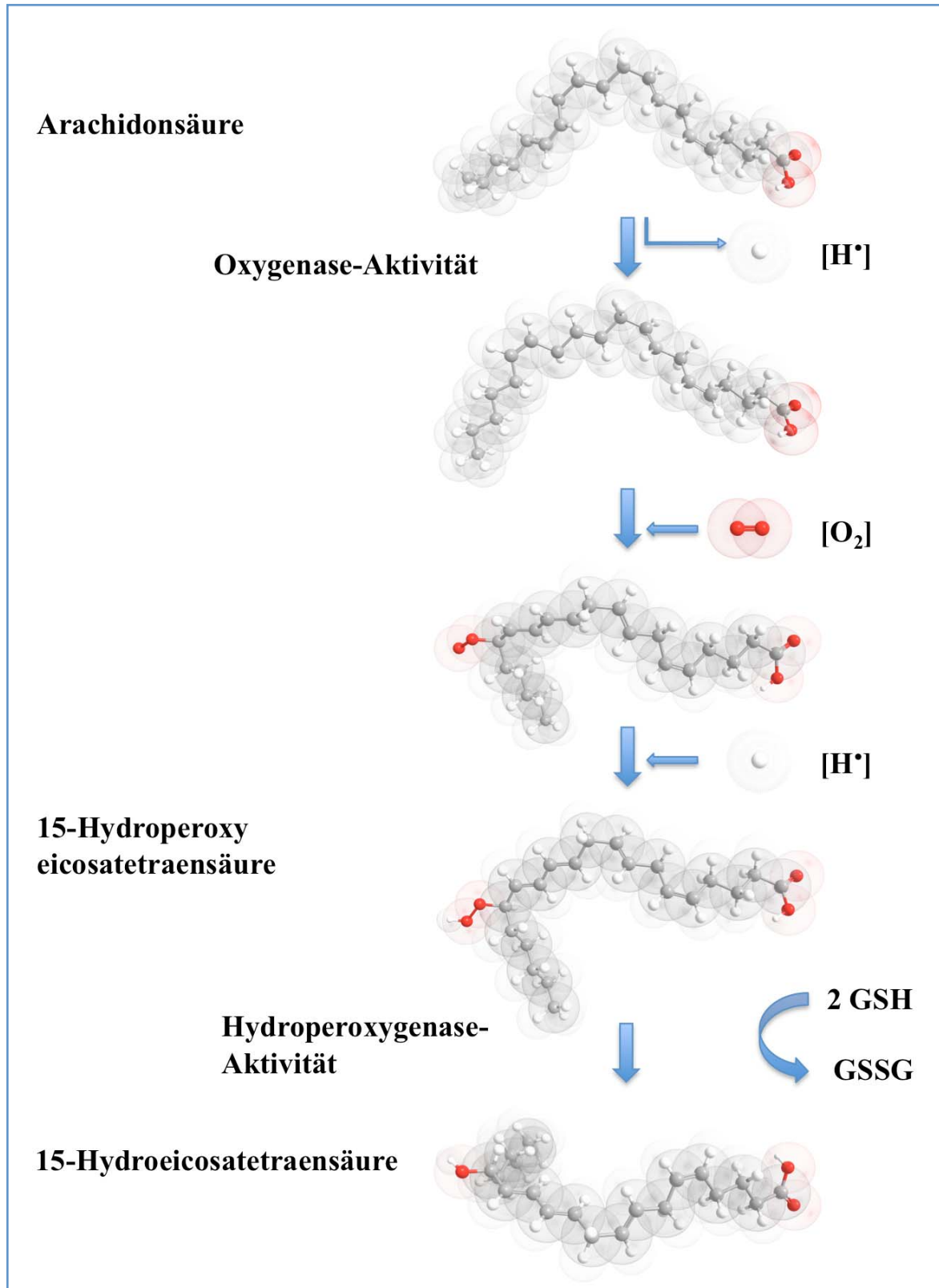


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lipoxygenasereaktion anhand der katalytischen Umsetzung von Arachidonsäure durch 15-LOX-2 zu 15S-HETE.

1.4.5. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Lipoxygenasen

Über die genaue Funktion der Säuger-LOXn und deren Produkte ist erst wenig bekannt. Generell sind LOXn an der Bildung biologisch aktiver Signalmoleküle und an der Modifikation und Degradierung von Membranstrukturen beteiligt und spielen somit sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen eine Rolle. So wird die Modifikation von Membranstrukturen durch LOXn mit der Differenzierung von Erythrozyten, Korneazellen, Keratinozyten und Makrophagen in Verbindung gebracht [78; 80; 95]. Neuere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zur Funktionsanalyse der epidermalen LOXn belegen eine wichtige Funktion von 12R-LOX und eLOX-3 bei Differenzierungsprozessen in der Haut und in Adipozyten [96; 97]. So kommt einem neu beschriebenen 12R-LOX/eLOX-3 Signalweg eine essentielle Rolle für die Ausbildung der epidermalen Barrierefunktion in der Haut zu. Dies belegen genetische Studien, die zeigen, dass die mutationsbedingte Unterbrechung dieses Signalweges ursächlich mit der Ausbildung einer schweren Verhornungsstörung, einer erblichen Form von Ichthyose, korreliert [98]. Die verschiedenen LOX-Produkte besitzen vielfältige Funktionen in der Gewebshomöostase und beeinflussen Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen. Am besten aufgeklärt sind die Funktionen der Leukotriene und Lipoxine, die wichtige Signalmoleküle der inflammatorischen und allergischen Reaktionen darstellen, wobei sie als potente Vaso- und Bronchokonstriktoren fungieren [94]. Über den 5-LOX Weg werden die pro-inflammatorischen Zysteinylleukotriene LTC₄, LTD₄, LTE₄ und LTB₄ gebildet, denen die Lipoxine (LX) entgegen wirken, die durch die sequentielle Oxidation von Arachidonsäure durch 5-LOX und 15-LOX bzw. 5-LOX und 12-LOX entstehen [99; 100; 101]. Darüber hinaus werden LOXn und ihren Produkten auch eine zentrale Funktion bei Erkrankungen wie chronischen Entzündungen (Arthritis, Asthma und Psoriasis), Arteriosklerose und bei der Tumorbildung zugeschrieben.

Bei der Karzinogenese werden antagonistische Wirkungen der verschiedenen LOX-Isoformen beobachtet. Einige LOX-Formen besitzen pro-tumorigene Wirkung (5-LOX, *p*-12-LOX), während andere dagegen, insbesondere die 15-LOX-Isoformen, anti-tumorigen wirken können. Dieses Schema ist jedoch streng gewebsspezifisch und nicht auf alle Tumore übertragbar (siehe Abbildung 11).

Belege für eine die Tumorentwicklung fördernde Wirkung sind die aberrante Expression der LOXn in den betroffenen Geweben, die häufig in der Stärke mit dem „Tumor-Staging“

korreliert, eine überschießende Produktbildung sowie die Hemmung der Tumorentwicklung durch LOX-Inhibitoren. So sind 5-LOX und (p)12-LOX in zahlreichen Tumoren wie der Prostata, Lunge, Brust und des Pankreas hochreguliert, und ihre primären sowie sekundären Metaboliten (5-HETE und LTB₄, bzw. 12-HETE) fördern das Tumorwachstum [4; 5; 102; 103; 104; 105; 106; 107]. Sie beeinflussen direkt die Tumorzellproliferation, supprimieren die Apoptose und erhöhen das Angiogenese- und Metastasierungspotential. [108]. Netzwerke, in denen der 5-LOX und (p)12-LOX eine tragende Rolle zugeschrieben werden, sind der Phosphoinositol-3-Kinase/Akt und NF-κB Signalweg. Beide Signalkaskaden kontrollieren die Proliferation von Tumorzellen und die Supprimierung von Apoptose [109; 110].

Den 15-LOX-Isoformen wird in den meisten Geweben eine tumorhemmende Wirkung zugeschrieben. Während für die 15-LOX-2 nur antikarzinogene Effekte beschrieben wurden, ist die Funktion der 15-LOX-1 nicht eindeutig definiert. So findet man eine starke Expression der 15-LOX-1 im Normalgewebe und in benignen Läsionen von Blase, Brust, Kolon oder Lunge; in den entsprechenden Tumorgeweben ist sie stark herunter reguliert bzw. teilweise vollständig unterdrückt, was auf anti-tumorigene Eigenschaften hinweist [8; 10; 111; 112; 113]. Andererseits gibt es aber auch Arbeiten, die eine prokarzinogene Wirkung von 15-LOX-1 bei der Kolonkarzinogenese postulieren [114; 115; 116]. In Prostatakarzinomen wurde von Kelavkar für 15-LOX-1 eine prokarzinogene Wirkung beschrieben [117]. Die Expressionsstärke korreliert dabei mit dem „Tumor-Staging“ (Gleason Score) [118]. Die 15-LOX-1 vermittelten pro-tumorigenen Effekte sind unter anderem auf seinen Metaboliten 13S-HODE zurückzuführen, welcher mitogene Netzwerke aktiviert und dabei auch die erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren wie den „Insulin-like Growth Factor 1“ (IGF) und den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) induziert [7; 119]. Analog zu Elings und Kims Beobachtungen im Kolonkarzinom (s.o.) konnte 15-LOX-1 auch im Pankreaskarzinom als anti-tumorigen beschrieben werden. Die Expression wird während der Karzinogenese unterdrückt und eine Restauration der 15-LOX-1 Expression in Pankreaskarzinomzellen führt zu einer Hemmung des Tumorzellwachstums [120].

Für 15-LOX-2 zeigen zahlreiche Untersuchungen eine starke Abschwächung bzw. den Verlust der Expression in epithelialen Karzinomen des Menschen (Prostata, Ösophagus, Brust, Blase, Kopf, Nacken und Haut) [14]. Arbeiten der Gruppe von Tang beschreiben 15-LOX-2 als Tumorsuppressor im Prostatakarzinom. In diesen Tumorzellen sind

15-LOX-2 und sein Metabolit 15S-HETE an der negativen Regulation des Zellzyklus beteiligt und induzieren Seneszenz [10; 121; 122; 123; 124]. Neuere Arbeiten postulieren eine Tumorsuppressor-Funktion für 15-LOX-2 auch in Kopf- und Hals-Tumoren [13; 14]. Die molekularen Mechanismen und genauen Signalwege solcher 15-LOX-2-vermittelten anti-tumorigenen Effekte konnten bisher jedoch noch nicht näher charakterisiert werden.

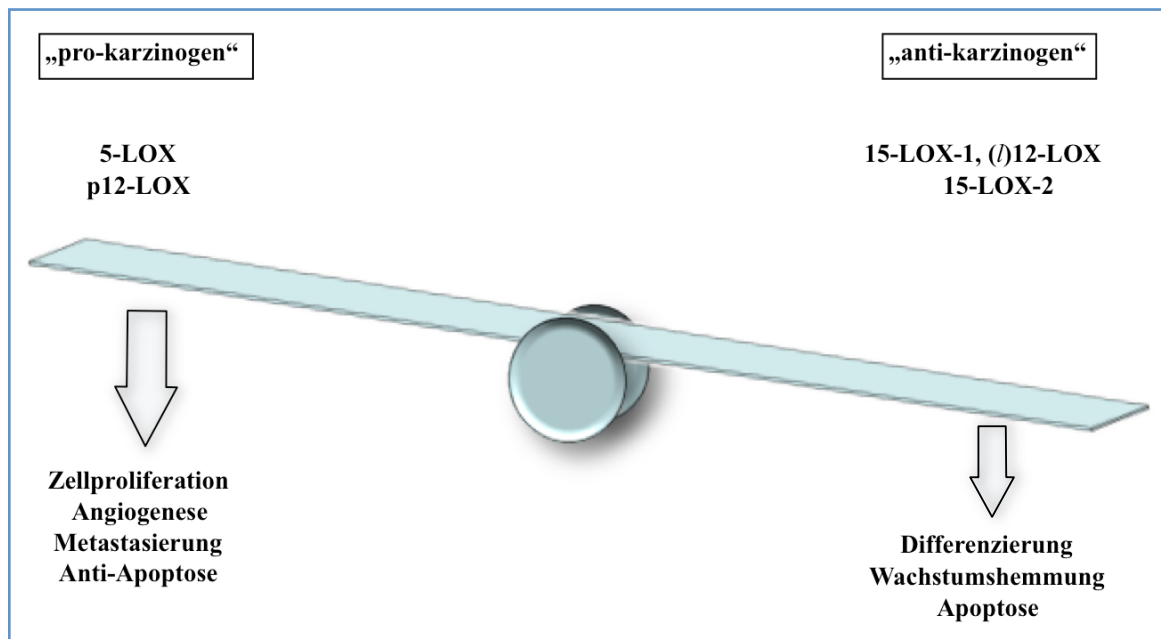


Abbildung 11: Die Tumorentwicklung wird durch verschiedene LOX-Formen entweder pro- oder anti-tumorigen moduliert. Das Expressionsmuster der einzelnen LOXn und deren biologische Aktivität weisen auf ein empfindliches Gleichgewicht bei der Karzinogenese in vielen verschiedenen Tumoren hin.

Kapitel 2 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Funktion der humanen 15-Lipoxygenase-2 bei der Pankreaskarzinogenese untersucht werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte für die Isoform 15-LOX-1 einen anti-tumorigenen Effekt bei der Karzinogenese des Pankreas aufzeigen [120]. Bislang ist aufgrund der unbestätigten Expression von 15-LOX-2 im Pankreas eine Rolle dieser LOX-Isoform bei der Pankreaskarzinogenese unbekannt.

Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Erstellung eines umfassenden 15-LOX-2-Expressionsprofils sowohl *in vivo*, in humanen gesunden und malignen Pankreasgewebeproben, als auch *in vitro* in Pankreaskarzinomzelllinien. Zur Funktionsanalyse der 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen soll für eine kontrollierte Genexpression ein induzierbares TET-ON-System etabliert werden. Mit Hilfe dieses *in vitro* Expressionssystems sowie durch pharmakologische und genetische Interventionsstudien sollen die Effekte der 15-LOX-2 und deren Metabolit 15S-HETE auf das Tumorzellwachstum, Zellzyklus und Apoptose analysiert werden.

Kapitel 3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Chemikalien

Für die vorliegende Arbeit wurden die nachfolgenden alphabetisch aufgelisteten Geräte und Chemikalien verwendet. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem Reinheitsgrad *per analysis* verwendet.

Geräte und Materialien	Firma
Brutschrank	Heraeus, Wiesloch (Deutschland)
Dell Latitude D610 Laptop	Dell, CA, (USA)
Dewar-Gefäße	KGW Isotherm, Karlsruhe (Deutschland)
Elektrophorese Power Supply PHERO-STAB 500	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen (Deutschland)
ELISA-Reader ELX-800	Bio-Tek Instruments, Winooski, (USA)
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	M&S Laborgeräte, Wiesloch (Deutschland)
Eppendorfzentrifuge (Biofuge 13)	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
Falcon-Tubes 15 ml, 50 ml	Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen (Schweiz)
Feinwaage BL6100	Sartorius, Göttingen (Deutschland)

Feinwaage BP61	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Feinwaage 2004 MP	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Guava PCA	Guava Technologies, Hayward (USA)
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen (Deutschland)
Kippschüttler, Mini Rocking Platform	Biometra, Göttingen (Deutschland)
Kippschüttler, Shaker-S4	Neolab, Heidelberg (Deutschland)
Kippschüttler, Profile Rocker	Stovall Life Sciences Inc., NC (USA)
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman, Palo Alto, CA (USA)
Kühlzentrifuge GPKR	Beckman, Palo Alto, CA, (USA)
Macbook	Apple, Cupertino (USA)
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Kehlheim (Deutschland)
Mikro-Dismembrator S II	B.Braun BiotechInstruments, Melsungen (Deutschland)
Mikro-Dismembrator S II Chromstahlkugel (10 mm)	B.Braun BiotechInstruments, Melsungen (Deutschland)
Mikro-Dismembrator S II PTFE-Behälter (3 ml)	B.Braun BiotechInstruments, Melsungen (Deutschland)
Mikrowelle	Bosch GmbH, Karlsruhe (Deutschland)
Nano Drop	peqLAB, Erlangen (Deutschland)

NuPAGE Novex Gelsystem	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Objektträger superfrost	Neolab, Heidelberg (Deutschland)
Papierschneider	Dahle North America, Peterborough, NH, (USA)
PapPen	Dako, Glostrup (Dänemark)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf (Deutschland)
PCR Peltier Thermo Cycler PTC200	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf (Deutschland)
PCR Biorad Cycler DNA Engine	Biorad, München (Deutschland)
PCR Eppendorf Master Cycle Gradient	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
PCR Pipettenfilterspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg (Deutschland)
pH-Meter pH330	Fischer BioBlock Scientific, Illirch Cedex (Frankreich)
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald (Deutschland)
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, WI (USA)
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland) Starlab, Ahrensburg (Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Röntgenfilmkassetten	Dr. Goods Suprema, Heidelberg (Deutschland)
SDS-PAGE Gelsystem	peqLAB, Erlangen (Deutschland)
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Costar, Baar (Deutschland)
Speedvac Vakuumzentrifuge	Bachofer, Reutlingen (Deutschland)
Sterilbank VBM 400	The Baker Company, NY (USA)
Sterilbank Steril Guard Hood	The Baker Company, NY (USA)
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld (Deutschland)
Thermoblock Typ 2099	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen (Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Tischzentrifuge Hermle Z233M	M&S Laborgeräte, Wiesloch (Deutschland)
Tiefkühlschrank -80 °C	Heraeus AG, Zürich (Schweiz)
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen (Deutschland)
Überkopfschüttler	Heidolph, Kehlheim (Deutschland)
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Kehlheim (Deutschland)
Wasserbad	Kottermann, Haenigsen (Deutschland)
Western-Blot Kammer SD1	CTI GmbH, Idstein (Deutschland)

X-Cell II Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
X-Cell Sure Lock System	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 150 cm ²)	TPP Renner, Dannstadt (Deutschland)
Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm)	TPP Renner, Dannstadt (Deutschland)
Zellkulturplatten (6 Well, 24 Well, 48 Well, 96 Well)	TPP Renner, Dannstadt (Deutschland)
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus, Wiesloch (Deutschland)

Chemikalien

Firma

5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 13-HODE	Caymanchem, Ann Arbor (USA)
15-HETE Immunoassay Kit	Caymanchem, Ann Arbor (USA)
100-bp-, 1-kb-DNA Standard Leiter	MBI Fermentas (USA)
6 x Ladepuffer (Loading Dye Solution)	MBI Fermentas (USA)
2-Mercaptoethanol (98 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
α_2 -Macroglobulin	Roche, Mannheim (Deutschland)
ϵ -Amino-n-Caprinsäure (99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Aceton p.A.	Fluka, Buchs (Schweiz)

Aceton technisch	DKFZ-Lager (Deutschland)
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin 100 x)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Aprotenin (lyophilisiert)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Aqua bidest	Millipore, Eschborn (Deutschland)
Aqua pure (HPLC-grade)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Borsäure	Fluka, Buchs (Schweiz)
Bradford-Reagenz	BioRad, München (Deutschland)
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Coomassie brilliant blue R	Gerbu Biotechnik, Gaiberg (Deutschland)
DAKO Fluorescent Mounting Medium	DAKO, Hamburg (Deutschland)
Deckgläschen	Neolab, Heidelberg (Deutschland)

Diethyldithiocarbamat (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
DMEM mit 4,5 g Glucose	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
DMF (N,N-Dimethylformamid, wasserfrei (99.8 %))	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
dNTP-Set (Desoxynukleosid Triphosphat), PCR-Grade	MBI Fermentas (USA)
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
ECL (Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)
EDTA (Etyhlendiamintetraacetat, Titriplex)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg (Deutschland)
Einbettuschälchen Cryomold Standard	Vogel, Gießen (Deutschland)
EMEM	BioWhittaker, Berlin (Deutschland)
Essigsäure, reinst	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ethanol, technisch (1 % Petrolether)	DKFZ-Lager (Deutschland)
Ethanol p.A.	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Ethylacetat (Lichrosolve)	Merck, Darmstadt (Deutschland)

Eukitt (Vitro-Clud)	O. Kindler GmbH, Freiburg (Deutschland)
Lurescent Dako Mounting Medium	Dako, Glostrup (Dänemark)
Formaldehyd (37 %)	AppliChem, Darmstadt (Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Geneticin (G418)	Sigma, ST.Louis (USA)
Glutamin (100 x)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Glycerin, PlusOne	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)
Glycin	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Hämatoxylin (saures Hämalalaun nach Mayer)	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Harnstoff (Urea, PlusOne)	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)
HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Hygromycin	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Leupeptin (lyophilisiert)	Roche, Mannheim (Deutschland)
Lipofectamin 2000, LTX	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)

Luria Broth Base Agar	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Methanol p.A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Methanol, technisch	DKFZ-Lager (Deutschland)
Milchpulver, entfettet	Fluka, Buchs (Schweiz)
Multiwell-Objektträger	ICN Biomedicals, Meckenheim (Deutschland)
Natriumcarbonat p.A.	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumformiat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Normal Goat Serum (10 %)	KPL, Maryland (USA)

NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
NuPAGE LDS Probenpuffer (4 x)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
NuPAGE MES SDS Puffer (20 x)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
NuPAGE MOPS SDS Puffer (20 x)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
NuPAGE Sample Reducing Agent (10 x)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
NuPAGE Transfer Puffer (20 x)	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Paraformaldehyd, reinst	Merck, Darmstadt (Deutschland)
PBS (Dulbecco Phosphat buffered saline)	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
peqGOLD RNA Pure™	peqLab, Erlangen (Deutschland)
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Ponceau S, reinst	Serva, Heidelberg (Deutschland)
Protein-G Sepharose 4 Fast flow beads	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)
Pestained Protein Ladder	MBI Fermentas (USA)
PVDF-Membran, Immobilon P	Millipore Corporation, Bredford (USA)
Red Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Röntgenfilme Fuji Super RX medical	Fuji Photoshop GmbH, Düsseldorf (Deutschland)

Rotiphorese Gel 30 (37.5:1 Acrylamid:Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
RT-PCR-Core Kit	Roche, Mannheim (Deutschland)
SDS (Sodium dodecylsulfat), PlusOne	GE Healthcare, Freiburg (Deutschland)
SDS-b Pulver (Sodium dodecylsulfat)	Gerbu, Gaiberg (Deutschland)
Streptavidin-Peroxidase	KPL, Maryland (USA)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) p.A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Tris p.A.	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Trypsin	Gibco, Karlsruhe (Deutschland)
Trypsin (sequencing grade)	Promega, Mannheim (Deutschland)
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Whatman-3MM-Blotting-Papier	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim (Deutschland)
Xylol Isomergemisch	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)

Kits	Firma
15-HETE EIA Kit	Caymanchem, Ann Arbor (USA)
DNase RQ1 RNase free DNase	Promega (USA)
TF MAPK Chip Array	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Epitect Bisulfit Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Expand Long PCR Kit	Roche, Mannheim (Deutschland)
Gel-Elution Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
GeneAmp RNA Core Kit	Applied Biosystems, Roche (Deutschland)
Guava Nexin Assay	Guava, CA (USA)
Guava TUNEL Assay	Guava, CA (USA)
Guava CellCycle Assay	Guava, CA (USA)
MaxiPrep Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
MiniPrep Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Nuclear Extract Kit	Active Motif, CA (USA)
RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (Deutschland)
T4-DNA Ligase Kit	MBI Fermentas, (USA)

Taq-DNA Core Kit	MP-Q-Biogene, CA (USA)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Topo Zero Blunt Kit	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)

3.1.2. Primer

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland) bezogen, lagen in einem gereinigten Synthesemaßstab von 0,02 µmol vor und wurden in Aqua pur aufgenommen.

Tabelle 3: Eingesetzte Oligonukleotide.

Laborcode/ Gen	Sequenz	TM / Zyklen
973 (15-LOX-2 - f)	5'-CTCCACCCAGCGGTAACAAG-3'	56
975 (15-LOX-2 - f)	5'-CCAGCTCTTCTTCCCGGTGTT-3'	56
977 (15-LOX-2 - f)	5'-CATCACTGTCTCCAGCGTTGC-3'	56
981 (15-LOX-2 - r)	5'-CCTGGTTCTGCCGCTGGTTC-3'	58
982 (15-LOX-2 - r)	5'-TGGAGCACAGGGTGGTGGTCT-3'	58
987 (15-LOX-2 - r)	5'-AGCCAAGAATGCCAACTTTTA-3'	52
999 (15-LOX-2 - f)	5'-GGACCCGAGGAGTTGAAGAC-3'	56
1941 (15-LOX-2 - r)	5'-GGAGTCAAAGTCCCTGCA-3'	53
1939 (15-LOX-1 - f)	5'-CATCTATCGGTATGTGGA-3'	50
1940 (15-LOX-1 - r)	5'-GAAGTTGGGCAGTGTC-3'	50
1964 (β-actin - f)	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'	56
1965 (β-actin - r)	5'-CCGCCGATCCACACAGAGTA-3'	56
2603 (p53 - f)	5'-TACCAGGGCAGCTACGGTTTC-3'	59
2604 (p53 - r)	5'-TGGCGGGAGGTAGACTGA-3'	59
2606 (15-LOX-2 Methyl.- f1)	5'-GGTTTGGTATTATTATTGAAAGGTTT-3'	57
2607 (15-LOX-2 Methyl.- r1)	5'-TACCAACCTAAATCCAAGTCTCTAC-3'	57
2608 (15-LOX-2 Methyl.- f7)	5'-TTTAAGGTTAAGAAGGAAAATAAA TAGA-3'	56
2609 (15-LOX-2 Methyl.- r7)	5'-TACCAACCTAAATCCAAGTCTCTAC-3'	56

f = forward; r = reverse; TM = eingesetzte Annealingtemperatur.

3.1.3. Antikörper

Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung
15-LOX-1	Roche, Mannheim Deutschland	1:10000 (IB) 1:1000 (IF)
15-LOX-2	Caymanchemicals, Michigan USA	1:3000 (IB) 1:1000 (IF)
5-LOX	BD-Bioscience USA	1:2000 (IB)
Erk-1/2 (p44/42 9102)	Cell Signaling, MA, USA	1:1000 (IB)
GAPDH (SC-6243)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:5000 (IB)
p-Erk-1/2 (9101)	Cell Signaling, MA, USA	1:1000 (IB)
p-SAP/JNK (9251)	Cell Signaling, MA, USA	1:1000 (IB)
p21 (C-19) (SC-397)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1000 (IB)
p53 (SC-6243)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1000 (IB)
Rabbit anti-PTEN (138G6)	Cell Signaling, MA, USA	1:1000 (IB)
SAP/JNK (9252)	Cell Signaling, MA, USA	1:1000 (IB)
β-Aktin (SC-1616)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2500 (IB) 1:250 (IF)
γ-Tubulin (SC-51715)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1000 (IB) 1:250 (IF)

IB = Immunoblot; IF = Immunfluoreszenz.

Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung
Donkey anti-goat-IgG AlexaFluor488	MoBiTec, Göttingen	1:400 (IF)
Donkey anti-mouse IgG- HRP (SC-2005)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2500 (IB)
Donkey anti-rabbit-IgG-Cy3	Jackson/Dianova, Heidelberg	1:500 (IF)
Donkey anti-rabbit-IgG-Cy5	Jackson/Dianova, Heidelberg	1:500 (IF)
Goat anti-rabbit-IgG-HRP (H+L)	Jackson/Dianova, Hamburg	1:10000 (IB) 1:400 (IHC)
Hoechst 33258	Sigma, Taufkirchen	1:3000 (IF)
Rabbit anti-goat-IgG-HRP (SC-2020)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000 (IB) 1:400 (IHC)

IB = Immunoblot; IF = Immunfluoreszenz; IHC = Immunhistochemie.

3.1.4. Organismen

Tabelle 6: Verwendete Organismen.

Bakterien	Eigenschaft /Herkunft	Bezugsquelle
One Shot™ TOP 10	TOP 10	Invitrogen, Karlsruhe
<i>dam</i>⁻/<i>dcm</i>⁻ competent <i>E. coli</i>	K12 strain	NEB, Frankfurt am Main
turbo competent cells <i>E. coli</i>	K12 strain	NEB, Frankfurt am Main

Zellen	Eigenschaft /Herkunft	Bezugsquelle
AsPC-1	Ascitis, PDAC	ATTC, USA
Capan-1	Lebermetastase, PDAC	ATTC, USA
Capan-2	primärer Tumor, PDAC	ATTC, USA

Zellen	Eigenschaft /Herkunft	Bezugsquelle
HEK 293	humane embryonale Kidneyzellen	FlowLab, Schottland
MiaPaCa-2	primärer Tumor, PDAC	ATTC, USA
Panc1	primärer Tumor, PDAC	ATTC, USA
primäre duktale Zellen	Pankreas Spender	diverse Spender
S2-O13	Lebermetastase, PDAC	ATTC, USA
SU8686	Lebermetastase, PDAC	ATTC, USA
T3M4	Lymphknotenmetastase, PDAC	ATTC, USA

3.1.5. Software

Tabelle 7: Für die Dissertation verwendete Software.

Software	Hersteller
Adobe CS3	Adobe Systems Incorporated.
AxioVision	Zeiss
Endnote X	Thomson ResearchSoft,
Graphpad Prism	Prism
HUSAR	DKFZ Heidelberg
KC Junior	Bio-Tek Instruments
Mac OSX Leopard	Apple Inc
Methprimer	Urogene
Microsoft Office 2003	Microsoft
Microsoft Windows XP	Microsoft
Millenium HPLC Software	Waters
NanoDrop 3.1.5	Coleman Technologies Inc.
NTI Software	Invitrogen
Oligo 6	MBI
pDraw	AcaClone
Volltextzeitschriften	www.dkfz.de www.ncbi.nlm.nih.gov

3.2.Methoden

3.2.1. Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1. Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Es wurden ausschließlich Bakterien des Stamms *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet. Diese Bakterien wurden in LB-Medium bei 37 °C und unter Schütteln bei 200 rpm kultiviert. Zur Selektionierung der Plasmid-transfizierten *E.coli* Zellen wurden die LB-Kulturmedien mit entsprechenden Antibiotika [Amphicillin (Amp^R), Kanamycin (Kan^R) und Zeocin] auf eine Endkonzentration mit 50 µg/ml versetzt. Das Animpfen des Nährmediums erfolgte mit einer sterilen gelben Gilson Pipettenspitze, mit welcher eine einzige Bakterienkolonie ausgewählt, gepickt und samt Spitze in das Medium gegeben wurde. Die Anzucht erfolgte in einem Erlenmeyerkolben mit einem viermal größeren Volumen.

Für die Kryokonservierung der bakteriellen Klone wurde von einer Übernachtskultur 5 ml Bakteriensuspension abzentrifugiert, in 800 µl LB Medium aufgenommen und mit 200 µl Glycerol versetzt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

LB Medium

NaCl	10 g
Bakto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

3.2.1.2. Transformation

Alle Arbeiten wurden in der Nähe eines brennenden Bunsenbrenners durchgeführt, um Kontaminationen durch andere Bakterien zu vermeiden. Zu 50-100 µl kompetenten Bakterien wurden 5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 µg gereinigte DNA zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis, anschließend für weitere 2 min bei 42 °C und danach erneut für 2 min auf Eis inkubiert (Hitzeschock). Dem Ansatz wurden dann

900 µl LB-SOC-Medium zugegeben und für weitere 90 min bei 37 °C inkubiert. Jeweils 10-500 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB Agarplatten mit entsprechender Menge Selektionsantibiotika ausplattiert. Die Platten wurden kurz am Bunsenbrenner luftgetrocknet und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2. Präparation, Analyse und Modifikation von Ribonukleinsäuren

3.2.2.1. Aufreinigung von RNA

Die Extraktion von RNA aus Zellen der Gewebekultur erfolgte mit peqGold RNAPure™ nach der Methode von Chomczynski et al.. Die Proben wurden entweder frisch aus der Zellkultur gewonnen oder auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,3 Volumen Chloroform und sofortigem Mischen durch Inversion und Vortexen für 30 s wurden die Probe für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 30 min eine Zentrifugation bei 4 °C und 14000 U/min. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde zur weiteren Aufbereitung in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 versetzt. Anschließend wurden die Ansätze zur RNA-Präzipitation und Aufreinigung mit dem Qiagen RNA Mini Kit gemäß den Herstellerangaben weiterverarbeitet. Nach der Aufreinigung wurde der RNA Gehalt mit Hilfe des NanoDrops vermessen und eine Qualitätssicherung durchgeführt.

3.2.2.2. DNase Verdau von aufgereinigter RNA

Um noch vorhandene DNA-Reste abzubauen wurden die RNA-Isolate einem DNase-Verdau unterzogen (Promega RQ1-DNaseI). Dabei kommt es zu einer selektiven Denaturierung und Degradierung der doppelsträngigen DNA, während die Nukleinsäureintegrität der einzelsträngigen RNA erhalten bleibt. Die RNA-Isolate wurden mit dem Master Mix (bestehen aus 10 x PCR Puffer, DNase I und H₂O) versetzt, gevortext und für 30 min bei 37 °C im Eppendorf Gradient Cycler inkubiert. Durch Zugabe

des Stop-Puffers und anschließende Inkubation für 10 min bei 65 °C wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurden die DNase-behandelten RNA-Isolate bei -80 °C gelagert oder direkt wie unter 3.2.2.3 beschrieben weiter behandelt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für den DNase Verdau mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl und 2 µg RNA Isolat.

Komponente	Volumen [µl]
10 x DNase Puffer	2
DNase (1 U/µg zu verdauende Probe)	2
H ₂ O	ad 20 µl abzüglich der Probe
Stop Solution	2

3.2.2.3. Reverse Transkription (RT)

Die Erst-Strang-Synthese erfolgte mit dem GeneAmp™ PCR Core Kit der Firma Roche. Aus den vorliegenden RNA-Sequenzen wurden durch reverse Transkription unter Zugabe eines RT-haltigen Master Mixes (Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor, dNTP's, 10 x RT-PCR Puffer und Random Hexamers/ Oligo-dT Primern) komplementäre cDNA Sequenzen hergestellt. Das Ansetzen des Master-Mixes erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und für 15 min bei RT inkubiert, um ein besseres Annealing der Primer zu ermöglichen. Danach erfolgte für 30 min bei 42 °C die RT-Reaktion, die durch eine abschließende 5-minütige Inkubation bei 95 °C beendet wurde. Daraufhin wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt, abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die RT-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Komponente	Volumen [µl]
25 mM Magnesiumchlorid	4
10 x Puffer	2
50 µM oligo(dT)-Primer	1
je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP	je 2
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1
MuLV Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1

3.2.3. Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

3.2.3.1. Plasmid DNA Aufreinigung

Entsprechend den Herstellerangaben wurden zur Präparation von DNA-Plasmiden 250 ml LB/ Amp Flüssigmedium mit einer Reinkolonie von einer Plattenkultur angeimpft, über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend die Plasmid-DNA mit Hilfe des Maxi Prep Endofree Kit von Qiagen extrahiert. Alternativ wurden DNA-Plasmide aus Flüssigkulturen bis 10 ml mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit entsprechend den Herstellerangaben extrahiert.

3.2.3.2. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA nach Größe wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese erreicht. Bei der Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren konnte gleichzeitig die Größe mit Hilfe parallel laufender molekularer Größenmarker bestimmt werden. Die zu detektierende Größe des DNA-Fragments korreliert mit unterschiedlich konzentrierten Agarosegelen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 0,8 %-, 1,0 %- und 2,0 % -ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in entsprechender Menge zu 1x TBE Puffer zugegeben und mit einer Mikrowelle zum Aufkochen gebracht. Der Vorgang des Aufkochens wurde solange wiederholt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 65 °C wurde Ethidiumbromidlösung zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Danach wurde die Lösung in die Agarose-Gelkammer gegossen und bis zur Erstarrung stehen gelassen. Die aufzutrennende DNA-Probe wurde mit 6 x Farbmarker (Endkonzentration 1 x) versetzt und in die einzelnen Taschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 100-140 Volt und 300 mA für 30 bis 90 min. Mit Hilfe der LAS-4000 von FujiFilm konnte das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die DNA visualisiert werden. Kurzwelliges Licht bei 254 nm Wellenlänge diente zur optischen Erfassung, während langwelliges Licht bei 366 nm für ein präparatives Gel verwendet wurde.

Agarosegel (in TBE)

Agarose	0,8 % - 2,0 % (w/v)
---------	---------------------

TBE-Puffer

Tris/HCl	0,1 M
Borsäure	89 mM
EDTA	1 mM
pH 8.5	

3.2.3.3. Elution von DNA Fragmenten aus Agarose

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA Fragmente eines präparativen Ansatzes wurde die aus dem Gel isolierte Bande mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl EB-Puffer.

3.2.3.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die sequenzspezifische DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen wurde nach den allgemein gängigen Protokollen [125] durchgeführt und durch die Empfehlungen der Enzymherstellers New England Biolabs und Fermentas optimiert.

Für einen analytischen Verdau wurden ca. 0,5–1,0 µg DNA mit 1,0 µl (entsprechen zirka 5-10 Units) des Restriktionsenzym und dem dazugehörigen Reaktionspuffer (Endkonzentration sollte 10 % betragen) eingesetzt. Je nach verwendetem Enzym musste noch BSA mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt werden. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und anschließend die elektrophoretische Auftrennung.

3.2.3.5. Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine unerwünschte Religation des Vektors bei der Ligationsreaktion zu vermeiden, wurden die überstehenden 5'-Enden mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz enthielt, außer den zu dephosphorylierenden DNA Fragmenten, 10 x konzentrierten SAP Reaktionspuffer (Endkonzentration 1x), 1 µl SAP Enzym (1 U/µl) und die entsprechende Menge H₂O. Die Inkubationszeit betrug bei 37 °C eine Stunde.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die SAP-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Komponente	Volumen [µl]
10 x SAP Puffer	1
SAP Enzym (1 U/µl)	1
H ₂ O	ad 20

3.2.3.6. Ligation

Für die Ligation wurden aus dem Gel eluierte und aufgereinigte DNA Fragmente eingesetzt. Die Ligation doppelsträngiger DNA Moleküle, wie Vektor und Insert, erfolgte mit dem Enzym T-4-DNA-Ligase (Stratagene). Die molaren Konzentrationen von Vektor und Insert wurden wie folgt ermittelt:

$$x \text{ ng (Insert)} = \frac{[\text{Insert Größe in bp}] [50 \text{ ng Vektor}]}{[\text{Vektor Größe in bp}]}$$

Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und enthielt neben den entsprechenden Mengen an Vektor und Insert 1 µl Ligase sowie 10 x Ligasepuffer (Endkonzentration 1 x). Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Als Kontrolle diente:

- der Reaktionsansatz mit Vektor ohne Insert
- der Reaktionsansatz mit Vektor ohne Insert und ohne Ligase
-

Neben der klassischen Ligation wurde auch das Topo-Ligations-Verfahren mittels pCR®-Blunt II-TOPO Cloning Kit verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µl Topo-Vektor, 1 µl Salzlösung und bis zu 3 µl Insert (10-100 ng). Der Ligationsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und davon wurden 2 µl für die Transformation in *E.coli* Zellen eingesetzt.

3.2.3.7. Oligonukleotidprimer

Die für die Analysen verwendeten Primer wurden mit der Software Oligo 6 konzipiert und von der Firma Invitrogen synthetisiert. Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich in Tabelle 3.

3.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion

Der PCR-Reaktionsansatz (siehe Tabelle 12) wurde anfänglich für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt, um eine Aufschmelzung des DNA-Doppelstranges in DNA-Einzelstränge zu bewirken. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für eineinhalb Minuten auf Primer spezifische Annealing Temperatur abgekühlt, um die Hybridisierung von Primer und DNA zu ermöglichen. Im nächsten Schritt der PCR wurden nun bei 72 °C für zweieinhalb Minuten in beiden Richtungen neue komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Der Reaktionsansatz wurden auf 94 °C für eineinhalb Minuten erhitzt, um wieder Einzelstränge zu erhalten. Danach schloss sich erneut der Annealing Zyklus an, gefolgt von einer neuen Synthese komplementäre DNA-Stränge. Diese zyklische Wiederholung der drei PCR Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation wurde 30 - 40 mal durchgeführt. Mit jedem neuen Zyklus kam es zu einem exponentiellen Anstieg der neu-synthetisierten DNA. Nach dem letzten Zyklus wurden für zehn Minuten 72 °C

gehalten, um unvollständige DNA-Fragmente zu komplettieren. Anschließend konnten die Proben bis zum Auftrag auf ein Agarosegel bei 4 °C gekühlt gelagert werden.

Tabelle 11: Temperaturprogramm des Standard-PCR.

Zyklusanzahl	Schritte	Zeitintervalle	Temperatur
	Denaturieren	5 min	95 °C.
<u>25-40 Zyklen</u>	Denaturieren	90 sec	95 °C.
	Annealing	90 sec	45–60 °C. je nach T _m der Primer
	Elongation	2 min	72 °C. für die Taq-Polymerase
	Elongation	10 min	72 °C.
	Lagerung	unbegrenzt	4 °C.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Komponente	Volumen [µl]
Template	1 - 2
Primer forward (100 pmol)	1,0
Primer reverse (100 pmol)	1,0
dNTPs (je 10 mM)	0,5
10 x PCR Puffer	2,5
Taq-Polymerase	0,25
Aqua Pur	17,75-18,75

3.2.3.9. Real-Time PCR-Analyse

Die TaqMan *realtime*-PCR bietet die Möglichkeit, die relative Expression einzelner Gene mit einer sehr hohen Sensitivität zu bestimmen. Zur Quantifizierung der cDNA wird dabei eine mit Fluoreszenzfarbstoff markierte sequenzspezifische Sonde (TaqMan-Probe) eingesetzt, welche am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat) trägt. Wird der Reporterfarbstoff mit Licht bestrahlt, so sendet dieser eine Antwortfluoreszenz aus. Diese Fluoreszenz wird jedoch aufgrund des Fluoreszenz- Energietransfers (FET) vom Quencher absorbiert, da

dieser sich bei der Sonde in definiert enger räumlicher Beziehung zum Reporter befindet. Die im qRT-PCR Mastermix enthaltene DNA-Polymerase besitzt eine Exonukleaseaktivität und entfernt während der Elongation die sequenzspezifische Sonde von der cDNA Matrize. Die Ablösung der TaqMan-Sonde führt zu einer räumlichen Trennung von Fluoreszenz- und Quencherfarbstoff. Daher findet keine Fluoreszenzunterdrückung des Reporters durch den Quencher mehr statt und der Zuwachs des Amplikons kann als proportionale Fluoreszenzzunahme des Reporters in Echtzeit mittels des LightCyclers 480 (Roche) detektiert werden.

Die gewonnene cDNA konnte ohne weitere Aufreinigungsschritte zur quantitativen *realtime*-PCR-Reaktion eingesetzt werden. Pro Ansatz wurde ein Reaktionsvolumen von 10 µl gewählt. Zu 1 µl cDNA Probe wurden 5 µl qPCR Mix (2x), 1 µl Primer Mix, bestehend aus Forward, Reverse und TaqMan Sonde sowie 3 µl H₂O pipettiert. Um potentielle Kontaminationen des Mastermixes und der cDNA auszuschließen, wurden eine Leerprobe (no template control (NCT)) sowie eine –RT Probe mitgeführt. Die qRT-PCR-Reaktion wurde für 50 Reaktionszyklen durchgeführt. Anschließend konnten die Ct-Werte mit Hilfe der LC 480-Software Version 1.5 (Roche) für die gesamte Reaktion anhand der Messdaten bestimmt werden. Zur Minimierung der Standardabweichung wurden alle Proben in Triplikaten eingesetzt und die mRNA Konzentrationen des Zielgens sowie des Housekeeping-Gens GAPDH (als Kalibrator für die Normalisierung) bestimmt. Die Analyse wurde nicht absolut quantitativ sondern als relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt.

3.2.3.10. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Vektorkonstrukten wurde von der Firma GATC, Konstanz, Deutschland mittels des ABI Prism 3730 durchgeführt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit den entsprechenden Sequenzen der in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) enthaltenen Genomabschnitten verglichen und mit Hilfe des HUSAR Programms sowie der Invitrogen NTI Software überprüft.

3.2.3.11. Bisulfit Behandlung von DNA

Über eine Bisulfit-Behandlung der DNA können methylierungsabhängige Polymorphismen in die DNA eingeführt werden. Bei der Bisulfit-Behandlung werden chemisch alle nicht methylierten Cytosinnukleotide zu Uracilnukleotiden deaminiert. Nach PCR-Amplifikation der zu untersuchenden Sequenzen wurden auf diese Weise alle ursprünglichen C:G Basenpaare in T:A Basenpaare umgewandelt. Nur methylierte Cytosine bleiben in der Behandlung unberührt, worauf letztlich die Unterschiede von methyliert zu nicht methyliert in den erwähnten Methoden basieren. In dieser Arbeit wurde das EpiTect®-Kit (Qiagen) für die Bisulfit-Behandlung benutzt.

3.2.4. Proteinanalytik

3.2.4.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Dazu wurde eine BSA-Standard Verdünnungsreihe in den Konzentrationen von 0,125 µg/µl bis 8 µg/µl erstellt. Anschließend wurden 1-10 µl Proteinlysat (nicht denaturiert, ohne SDS-Ladepuffer) zu 1000 µl Bradford-Lösung (1:5 BioRad Bradford Reagenz : Wasser) gegeben und gut gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die optische Dichte der Proben bestimmt. Die Messung erfolgte mit 200 µl Probenmaterial in 96-Mikrotiterplatten am ELISA-Reader ELX-800 bei 595 nm. Mittels der erstellten BSA-Standard-Eichkurve wurden die jeweilige Proteinkonzentration in den Proben ermittelt.

3.2.4.2. Probenvorbereitung

Bei der SDS-PAGE wurden die Proben in Konzentrationen von 30-100 µg mit 2 x Laemmli Proben Puffer versetzt, bei 95 °C für 5 min aufgekocht und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (30 sec) bei 13000 rpm wurden die Proben auf die SDS Gele appliziert.

Das NuPAGE Gelsystem besitzt zur Probenvorbereitung separate Denaturierungsreagenzien, sowie einen eigenen Probenpuffer. Der Probenpuffer ist vierfach konzentriert und wurde mit dem Zehnfach-Konzentrat des Denaturierungsreagenz den Proben zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Proben befindet sich bei den kleinen NuPAGE Gelen im Bereich von 10-30 µg. Die weitere Probenaufarbeitung ist analog zum SDS-PAGE System durchgeführt worden.

6 x Laemmli Probenpuffer:

SDS	10,28 % (w/v)
Tris, pH 6,8	0,35 M
Glyzerin	36 % (v/v)
Bromphenolblau	0,012 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

3.2.4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelapparatur besteht aus Glasplatten mit einer Größe von 16,5 cm x 12 cm und dazwischen liegenden Spacern mit einer Dicke von 1,5 mm. Die Sandwichstruktur wurde mit Metallklammern befestigt und so in ihrer horizontalen Lage stabilisiert. Der Boden und die Seitenränder wurden mit Agarose (1,5 %) abgedichtet. Das Trenngel wurde zuerst gegossen, je nach Proteingröße wurde der Polyacrylamid-Anteil verändert. Bei Proteinen hohen Molekulargewichts (> 40 kDa) wurde ein 7,5 % -iges Trenngel gegossen und bei Proteinen mit geringerem Molekulargewicht (< 40 kDa) 12 % -ige Trenngele verwendet. Die Bestandteile für das Trenngel (s.u.) wurden kombiniert und gut vermischt. Das Trenngel wurde in die SDS-PAGE Gelkammer pipettiert, mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet und polymerisieren gelassen (30-60 Minuten, RT). Im Anschluss wurde durch Dekantieren das 2-Butanol entfernt und das Sammelgel dem Trenngel überschichtet sowie der Gelkamm eingesteckt. Die auspolymerisierten SDS-Gele konnten in die Gelelektrophoresekammer gespannt werden, die Apparatur mit 1 x SDS Elektrophorese-Laufpuffer versehen und die Proteinlysate samt molekularem

Größenmarker (Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) geladen werden. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei RT mit einer Stromstärke von 10 mA.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

	Trenngele 7,5/ 12,0 %	Sammelgel 4,0 %
4 x Lower Tris	10,0 / 10,0 ml	-
4 x Upper Tris	-	5 ml
Bis-/Acrylamid	7,5 / 16 ml	2,7 ml
TEMED	40 µl	40 µl
10 % APS	450 µl	60 µl
Aqua bidest	19,6 / 13,5 ml	12,4 ml

4 x Lower Tris

Tris/HCl 1,5 M
 SDS 0,4 % (w/v)
 pH 8,8

4 x Upper Tris

Tris/HCl 0,5 M
 SDS 0,4 % (w/v)
 pH 6,8

1 x SDS-Laufpuffer

Tris 25 mM
 Glycin 192 mM
 SDS 1 % (w/v)

3.2.4.4. Western-Blot

Im Western-Blot werden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe des vertikalen Semidry-Blotting-Verfahrens auf eine hochaffine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Dazu wurde zunächst das SDS-Gel aus der SDS-PAGE

Glasapparatur entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel anschließend in Kathodenpuffer äquilibriert. Auf die Elektrode wurden sechs Lagen Whatmannpapier (Stärke 3 mm) getränkt in Anodenpuffer 1, gelegt, gefolgt von drei Lagen in Anodenpuffer 2 getränktem Whatmannpapier. Die PVDF-Membran, welche 1 min in EtOH äquilibriert und in Anodenpuffer 2 gespült wurde, wurde blasenfrei auf die bereits vorhandenen Lagen Whatmannpapier gelegt. Auf die Membran wurde das Gel appliziert. Danach folgten sechs weitere Lagen Whatmannpapier getränkt in Kathodenpuffer. Abschließend wurde die Kathodenplatte aufgelegt. Zusätzlich wurde die Apparatur mit einem 1 kg Gewicht beschwert, um einen gleichmäßigeren Transfer zu erzielen. Der Transfer erfolgte mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

3.2.4.5. NuPAGE-Gelsystem

Für die NuPAGE Gelelektrophorese wurde als Probenpuffer 4 x LDS (Lithium-Dodecylsulfat) verwendet. DTT diente als reduzierendes Agens. Die Elektrophoresekammer wurde entsprechend den Herstellerangaben zusammengesetzt. An die Gele wurde eine Spannung von 200 Volt über 40 min angelegt, wobei die Stromstärke zwischen 40 und 55 mA lag.

3.2.4.6. NuPAGE-Gelsystem Western-Blot

Die Gele wurden nach der Elektrophorese aus den Kammern entnommen. Pro Gel wurden vier „Blotting-Pads“, vier Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in dem mitgelieferten Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des Blots erfolgte direkt in der Transferkammer. Das Trenngel wurde auf ein Filterpapier gelegt, die Membran auf das Gel und ein weiteres Filterpapier auf die Membran. Alle Luftblasen wurden mit Hilfe des Spatels entfernt. Dieses Sandwich wurde nun, umgeben von zwei „Pads“ auf jeder Seite, mit der Membran zur Anode und dem Gel zur Kathode gerichtet, in der Novex Blottingkammer horizontal fixiert. Die Kammer wurde mit Transferpuffer (NuPAGE®-Transferpuffer) gefüllt. Der Transfer erfolgte über zwei Stunden bei 40 V und Raumtemperatur.

3.2.5. Immunologische Analysen

3.2.5.1. Immunodetektion

Die Primärantikörperinkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in Blocklösung unter Schütteln (150 rpm). Anschließend wurde die Membran 3-mal 15 min in Wasch-Puffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 45-60 min bei Raumtemperatur in Blocklösung inkubiert. Nach Durchführung der finalen Waschschrte erfolgte die ECL-Entwicklung. Dazu wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und eine Minute mit der Membran unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde leicht luftgetrocknet, in eine Entwicklungskassette überführt und Fuji-Röntgenfilme mit unterschiedlichen Expositionszeiten entwickelt.

Tabelle 14: allgemeines Protokoll für die Immunodetektion.

Vorgang	Lösungen	Zeitintervall
Blocken	PBS/Milch 7,5 %	1 h bis ÜN
Primärantikörper	PBS/Milch 7,5 %/ Tween 0,1 % 1 x 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C.	1 x 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C.
1. Waschschrir	PBS/ Milch 7,5 %/ Tween 0,3 %	3 x 15 min
Sekundärantikörper	PBS/ Milch 7,5 %/ Tween 0,3 %	45-60 min
2. Waschschrir	PBS/ Tween 0,3 %	3 x 15 min
3. Waschschrir	PBS	3 x 5 min

Blocklösung (in PBS)

Magermilchpulver	7,5 % (w/v)
Tween-20	0,3 % (v/v)

Wasch-Puffer (PBS-T)

Tween-20	0,3 % (v/v)
----------	-------------

3.2.5.2. Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) für den Nachweis von 15S-HETE

Die Technik des „Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assays“ (**ELISA**) ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Proteinen in Zelllysaten oder Zellkulturüberständen. Der ELISA zur Bestimmung des 15S-HETE Gehalts in Zellkulturüberständen wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Cayman Chemicals).

3.2.5.3. TF-MAPK-Chip-Array-Analyse

Die Transkriptionsfaktor-MAPK-Chip-Analyse untersucht simultan den Expressionslevel von 8 verschiedenen Transkriptionsfaktoren im MAPK-Netzwerk. Die Analyse basiert auf der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit ihren spezifischen DNA-Bindungsstellen. Die Transkriptionsfaktor-spezifischen Bindungsstellen waren innerhalb kurzer DNA Abschnitte im Chip Format auf Glasobjektträgern immobilisiert. Für jeden Transkriptionsfaktor wurden zwei spezifische Sequenzen verwendet, eine wt-Sequenz, an welche der Faktor binden konnte und eine mutierte Variante als Negativkontrolle, welche vom Transkriptionsfaktor nicht erkannt wurde. Positiv und Negativkontrollen sowie interne Standards verifizierten die Funktionalität der Analyse. Die Detektion der verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurde mit einem Cocktail aus 9 Primärantikörpern und dazugehörigen Sekundärantikörpern erzielt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe der Silverquant® Färbung im Silverquant® Scanner. Die Auswertung wurde mit einer eigens dafür entwickelten Software von Eppendorf durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Protokoll der Herstellerfirma.

3.2.5.4. Immunfluoreszenz

Die auf den Multiwell Objektträgern gewachsenen adhärennten Pankreaskarzinomzellen wurden vom Medium befreit und 3 x mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung und Dehydrierung wurden die Objektträger 10 min in eiskaltem Aceton bei -20 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Lufttrocknung wurden die einzelnen Lochbereiche mit einem Wachsstift (PapPen, Dako) umrandet und mit PBS überschichtet. So konnten die einzelnen Objektträger bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit für die Antikörper durchgängig zu machen, wurden die Zellen für 5 min in 10 ml 0,1 % Triton X-100/ PBS inkubiert und anschließend 3 x in PBS gewaschen (5 min). Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Zellen mit 10 % -igem Normal Goat Serum (NGS, KPL) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem vorsichtigen Waschen mit 1x PBS Puffer erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht, gelöst in 10 % NGS (30 µl). Anschließend wurden die Objektträger 3x mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin 1 h bei RT mit dem farbstoffgekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert (30 µl). Dabei handelte es sich um einen FITC-konjugierten oder um Cy3-bzw. Cy5-konjugierten anti-Maus/ Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100-1000. Die Inkubation und alle folgenden Schritte erfolgten unter wenig Lichteinwirkung. Die Zellen wurden 3x mit PBS-Puffer gespült, an der Luft getrocknet und zur Erhöhung der Fluoreszenz mit Flurescent Mounting Medium (Dako) und einem Deckglas eingedeckt. Die Detektion der Immunfluoreszenz-Signale erfolgte unter einem Leica SP5 konfokalen Lasermikroskop mit 63-100 -facher Vergrößerung. Die Photos wurden mit der zugehörigen Leica Software gespeichert und in Photoshop ausgewertet.

Tabelle 15: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe.

Fluorochrom	Farbe	Extinktion	Emission
DAPI	Blau	358	461
Cy3	Rot	550	570
Cy5	Rot	650	670
FITC	Grün	495	519

3.2.5.5. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression von 15-LOX-2 wurde an Schnitten formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebe durchgeführt. Die Gewebeproben wurden vom pathologischen Institut der Ruprecht-Karls Universität und dem Europäischen Pankreas Tumorzentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die histologische Zuordnung der Karzinome wurde nach der internationalen histologischen Klassifikation von Tumoren der WHO vorgenommen.

Die Schnittpräparate wurden gemäß dem unten stehenden Schema in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte 30 min im Dunkeln in eine Lösung aus 250 ml Methanol und 5 ml 30 % -igen H_2O_2 inkubiert, mit 1 x TBS-Puffer gespült und anschließend mit 10 % -igem NSG für 30 min geblockt. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Schnitte mit dem 15-LOX-2 Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperverdünnung wurde 1:1000 in 10 %-NGS angesetzt. Am folgenden Tag wurden die Schnitte 3 x 10 min in 1 x TBS-Puffer gewaschen und mit dem zweiten biotinylierten Antikörper (goat anti rabbit IgG) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer gebrauchsfertigen Streptavidin-Peroxidase Lösung für 30 min bei RT. Nach Spülung mit 1 x TBS-Puffer erfolgte die Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Hierzu wurden 20 µl DAB Lösung in 980 µl DAB Puffer aufgenommen und sofort mit den Gewebeschnitten für 8 min. inkubiert. Nach der Färbezeit wurden die Präparate in Leitungswasser (LW) gespült und in Aqua dest. inkubiert. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte in Hämaunlösung 25 sec inkubiert und anschließend unter Leitungswasser unspezifische Färbungen entfärbt. Abschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Vitro-Clud eingedeckt. Als Kontrolle der unspezifischen Färbung dienten Schnitte, bei denen der erste Antikörper durch PBS ersetzt wurde. Ein Gewebeschnitt, von dem bekannt war, dass er ein starkes Signal liefert, wurde als Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Färbung bei jeder Färbereihe mitgeführt.

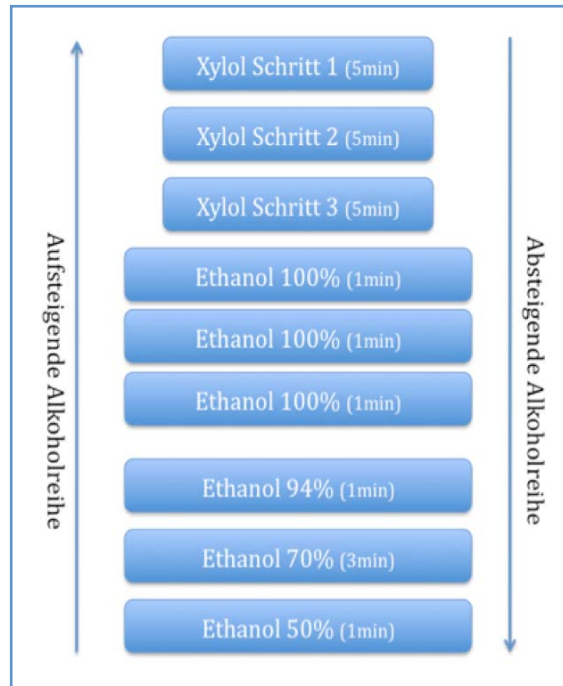


Abbildung 12: Schematische Darstellung der auf- und absteigenden Alkoholreihe.

3.2.5.6. Statistische Auswertung der histologischen Befunde

Um die positive Färbung für 15-LOX-2 statistisch besser beurteilen zu können, wurde ein Einteilungsschema der Färbeintensitäten (Grading) vorgenommen. Dieses „Grading“ unterteilte die Färbung in einzelne Intensitätsabstufungen.

- - keine Färbung
- -/+ einzellige Färbung
- +/- fokale Färbung
- + positive Färbung
- ++ stark positive Färbung

Ein Zwischenmaß für schwache fokale Färbung oder schwach positives Signal wurde beim Grading mit eckigen Klammern festgelegt. Das Grading [+/-] bedeutet somit „schwach“ fokal positiv. Allen Unterteilungen wurde jetzt der Wert 1 in der Statistik zugewiesen. Eckige Klammern bekamen den Wert 0,5. Zur vereinfachten Darstellung wurde keine Färbung (-) und einzellige Färbung (-/+) zusammengefasst zu „negative Färbung“ und

positive sowie stark positive Färbungen zu insgesamt „positiver Färbung“. Die einzelnen Werte wurden addiert und als Graph dargestellt.

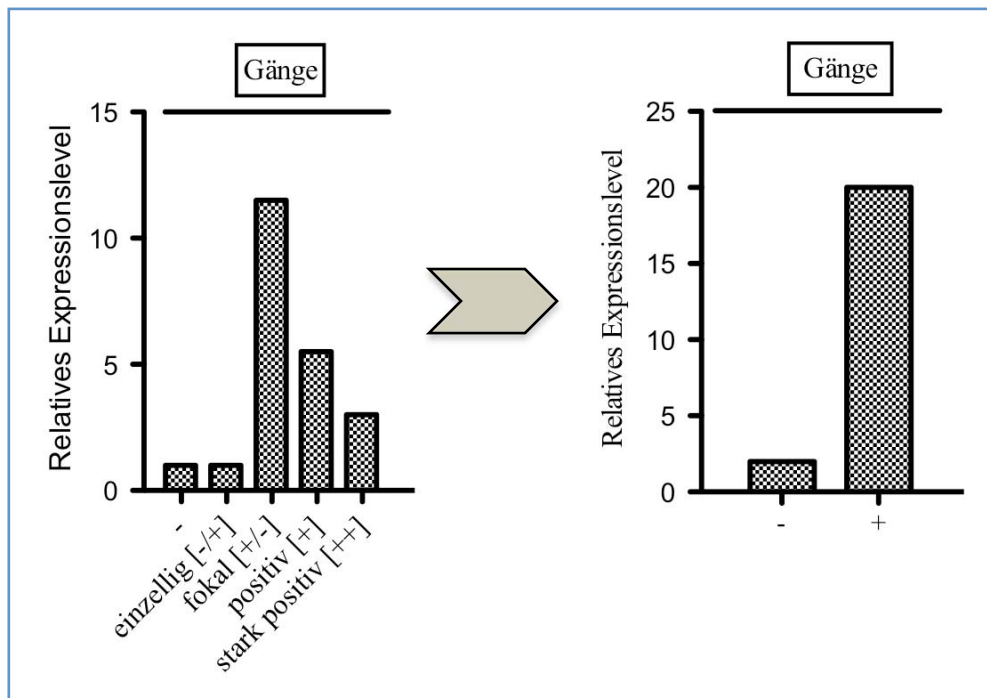


Abbildung 13: Graphische Darstellung der immunhistochemischen Analyse anhand eines „Intensitätsgradings“. Die genaue Einteilung der einzelnen Färbeabstufungen wurde in ein vereinfachtes System übertragen. Dabei wurden „keine Färbung“ und „einzellige Färbung“ als negativ eingestuft, alle positiven Färbeabstufungen als positiv zusammengefasst.

3.2.6. In vitro Analysen

3.2.6.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid-Sättigung im Inkubator kultiviert. Für die einzelnen Linien wurde unterschiedliches Medium verwendet (siehe Tabelle 16). Die Zentrifugationen zwischen jeweiligen Protokollschritten erfolgten stets bei 1000 rpm und 4 °C in der Zentrifuge ZK 223 (Hermle) für 5-10 min. Beim Passagieren wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin beschichtet, 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in 10ml frisches Medium resuspendiert, mit dem Guava PCA Gerät die Zellzahl bestimmt und abhängig vom

Kulturgefäß 1/5 -1/10 des Zellansatzes in neues Medium überführt und bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 16: Verwendete Medien für die einzelnen Zelllinien.

Zellen	Medium	Bezugsquelle
AsPC-1	RPMI	Gibco, Invitrogen
Capan-1	RPMI	Gibco, Invitrogen
Capan-2	RPMI	Gibco, Invitrogen
HEK293	EMEM	BioWhitaker
MiaPaCa-2	DMEM	Gibco, Invitrogen
Panc1	RPMI	Gibco, Invitrogen
S2-O13	DMEM	Gibco, Invitrogen
SU8686	RPMI	Gibco, Invitrogen
T3M4	RPMI	Gibco, Invitrogen
primäre duktale Zellen	Keratinocytenmedium SFM	Gibco, Invitrogen

3.2.6.2. Kryokonservierung von Zellen

Zellen und modifizierte Zellklone wurden mit sehr niedriger Passagennummer in flüssigem Stickstoff bei -196 °C konserviert. Zur Konservierung wurden die Zellen trypsinisiert, 2 x mit PBS gewaschen und als 1 ml Aliquots in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus 90 % FCS und 10 % DMSO. Bei Zellklonen des TET-ON-Systems wurde ausschließlich „TET-freies“ FCS verwendet. Die 1 ml Aliquots wurden in 1,8 ml Kryokonservierungsröhrchen der Firma Nunc überführt und 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.2.6.3. Transfektion

Die Transfektion mit Lipofectamin 2000™/ LTX wurde nach Herstellerangaben Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden vor einer Transfektion in 100 mm² Kulturschalen mit einer Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen ausgesät. Für Transfektionen in

6-Well-Kulturplatten wurde eine Zelldichte von 50000 Zellen verwendet. Unmittelbar vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit FCS freien Medium durchgeführt. Für die Transfektion wurde die Komponente I des Transfektionsmixes, welche die DNA enthielt, mit Komponente II, in der das Lipofectamin in FCS freiem Medium gelöst war, 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Reaktionsansätze vereinigt und für weitere 30 min inkubiert, damit sich die liposomalen DNA Komplexe bilden konnten. Danach wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6-8 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-haltigem Medium. Bei einer transienten Transfektion wurden die Zellen im Laufe der nächsten 72 h-96 h für die Versuche verwendet. Bei stabilen Transfektionen wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einem erneuten Mediumwechsel plus entsprechendes Antibiotikum unter Selektionsdruck kultiviert.

3.2.6.4. Selektion von Zellklonen für eine stabile Transfektion

Die für die stabilen Transfektionen verwendeten Plasmide enthielten eukaryotische Antibiotikaresistenzgene, wodurch stabile Zellklone durch Selektion der Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum gewonnen werden konnten. Die verwendeten Antibiotika und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Verwendete Antibiotika für die Zelllinie Panc1 und deren Konzentrationen für die stabile Selektion von Zellklonen.

Antibiotika	Stock-Konzentration	Plasmid	Selektions-Konzentration
Blasticidin	50 mg/ml	TR6 Repr.	50 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml	TET-LOX	800 µg/ml
Hygromycin	50 mg/ml	pRTS	200 µg/ml
G418	100 mg/ml	pCDNA 3	1000 µg/ml
Doxycyclin	10 mg/ml	pRTS/ TET	0,1-1 µg/ml

3.2.6.5. Kulturbedingungen für Wachstumsversuche

Für Wachstums- und Proliferationsversuche wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn in 6-Well Kulturschalen mit einer Zelldichte von 50000 Zellen pro Well ausgesät. Bei Klonen des TET-ON-Systems erfolgte daraufhin ein Mediumwechsel mit dem Induktionsantibiotikum Doxycyclin. Im weiteren Versuchsverlauf wurde im Abstand von 24 h jedes Well der Platten für die Versuchsansätze trypsiniert, in 500 µl Medium aufgenommen und für die Guava PCA Versuche verwendet.

3.2.6.6. Kulturbedingungen für immunhistologische Analysen

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 500000 Zellen auf Multiwell-Objektträger ausgesät und 24 Stunden vor Behandlung bei 37 °C im Kulturschrank kultiviert. Nach anschließender Behandlung der Zellen erfolgte eine Kultivierung bis 120 h. Die einzelnen Objektträger wurden daraufhin zweimal in PBS gewaschen, für 10 min in Aceton fixiert und für die Immunfluoreszenz, wie unter 3.2.5.4 beschrieben, weiterbehandelt.

3.2.6.7. Guava PCA

Die Guava PCA Maschine ist eine Systemeinheit mit durchflusszytometrischen Eigenschaften. Das PCA System besitzt einen grünen Laser und eine „Flow-Cell®“ (Kapillare), die keine Sheath-Lösung benötigt. Ferner besitzt das Gerät einen Scatter und ist als 2-Farben System für die gängigsten zytometrischen Versuchsansätze geeignet. Somit können mit dem System Zellzählungen, Zellzyklusanalysen, Apoptoseversuche (ANNEXIN V, TUNEL, Caspase-Assay) und GFP Selektionen durchgeführt werden.

3.2.6.8. Guava ViaCount®

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellviabilität wurden die Zellen trypsiniert und in 500 µl Medium aufgenommen. Nach optischer Bestimmung der Zelldichte erfolgte entsprechend den Herstellerangaben eine 1:2 bis 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit dem DNA interkalierenden Guava ViaCount® Reagenz. Nach 5-minütiger Inkubation wurden pro Ansatz maximal 500 Zellen/µl vermessen und mittels der ViaCount Software ausgewertet.

3.2.6.9. Guava Nexin Assay®

Der Guava Nexin-Assay® ist prinzipiell ein AnnexinV Assay, adaptiert für die Verwendung mit einem Guava-PCA-System.

3.2.6.10. WST-1 Proliferationsmessung

Als Maß für die Vitalität wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit WST-1 (Boehringer Mannheim), ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz (Natriumsalz von 4-[3-(4iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat) gemessen. Das chromogene Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen lebender Zellen reduktiv aufgespalten, es entsteht ein wasserlösliches Formazansalz. Der WST-Proliferationstest wurde in einer 96-Well- Mikrotiterplatte in 3-15-fach Bestimmung durchgeführt. Dafür wurden drei bis vier Stunden vor der Messung pro Well 10 µl WST-1 Reagenz zu den 100 µl Medium pipettiert und die Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) in einem Spektrometer (ELX-800) gemessen.

3.2.6.11. Das induzierbare TET-ON-System

Die kontrollierbare Expression eines Gens ist nicht nur in der modernen Gentherapie, sondern auch in der grundlegenden Erforschung von Genfunktionen ein wichtiges Werkzeug. Für die Untersuchung von toxischen und Apoptose fördernden Proteinen ist ein solches System unabdingbar. Die grundlegenden Eigenschaften solcher Systeme sollten eine hohe Effektivität, dosisabhängige Regulierbarkeit und ein inertes Wesen sein. Es muss dabei gewährleistet sein, dass es nicht durch seine eigenen Bestandteile regulatorisch in den Zellstoffwechsel eingreift und somit die eigentlichen Effekte des Zielgens überschattet. Es existieren sowohl ON- als auch OFF-Varianten. Das System wurde 1992 von Gossen und Bujard entwickelt und wurde seither stetig weiter verfeinert [126]. Es basiert auf dem Tet-Resistenzoperon aus *E.coli*, welches auf dem Tn10-Transposon lokalisiert ist. Das Bakterium erreicht seine Antibiotikaresistenz für Tetrazyklin (Tet) durch das TetA-Protein, welches in Abwesenheit von Antibiotikum durch den Tetrazyklin-Repressor (TetR) in seiner Expression unterdrückt wird. Die Bindung des Antibiotikums Tetrazyklin an den TetR führt zu einer Konformationsänderung, welche die Ablösung des TetR von der Operatorsequenz des TetA-Gens zur Folge hat. Dadurch kommt es zur Expression von TetA und zur Ausschleusung des Antibiotikums aus der Bakterienzelle. Für das humane Modellsystem wurde der Tet-Repressor C-terminal mit dem VP-16-Protein des Herpes-Simplex-Virus (HSV) fusioniert. Dieses Fusionsprotein (tTA) bindet mit dem TetR Anteil den Operator (TetO), welcher zur Verbesserung der Amplifikation aus sieben repetitiven Operatorsequenzen besteht. Dadurch kommt der VP-16-Anteil des Fusionsproteins mit einem minimalen CMV-Promotor in Kontakt, welcher dann die Expression des Zielgens initiiert. Die Operatorsequenz in Verbindung mit dem CMV-Promotor wird als Tetrazyklin-Response-Element (TRE) bezeichnet. Die Bindung von Tetrazyklin an den tTA führt zu einer Konformationsänderung des Repressors, welcher die TetR Affinität zum TRE aufhebt und somit die Genexpression ausbleibt. Eine Weiterentwicklung des sogenannten TET-OFF-Systems stellt die gerichtete Mutation des tTA in seiner DNA-Bindungsdomäne dar. Durch den Austausch von vier Aminosäuren bindet nun der mutierte tTA (rtTA) nur in Anwesenheit von Tetrazyklin an das TRE und initiiert die Transkription des Zielgens. Dieses System ist als TET-ON-System bekannt und findet vor allem in Tierexperimenten seine Anwendung, da die Tiere nicht permanent unter Antibiotika gehalten werden müssen, um die Expression

des Transgens zu unterbinden. Der reverse Tet-Repressor reagiert wesentlich empfindlicher auf das Tetrazyklinanalogon Doxycyclin als auf Tetrazyklin selbst [126].

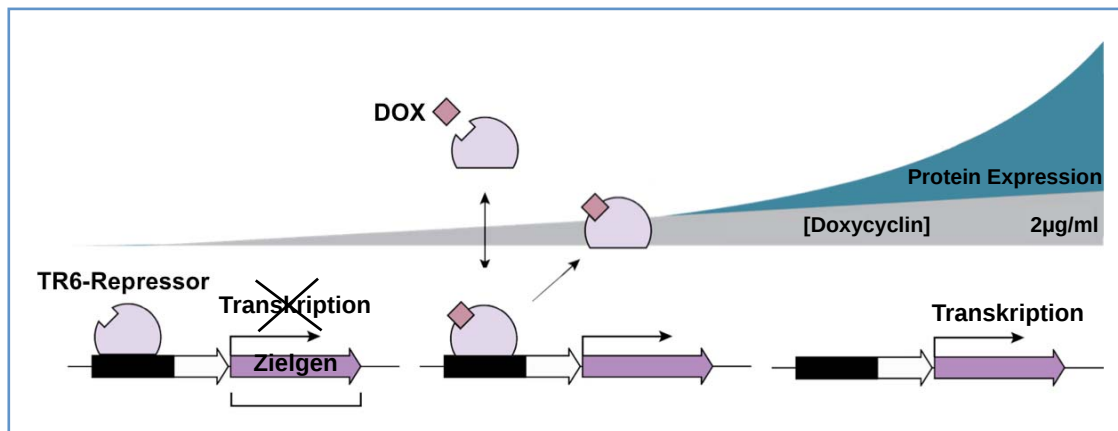


Abbildung 14: Schematische Darstellung des TET-ON-Systems und der daraus resultierenden Genexpression; modifiziert nach [127].

Weitere Verbesserungen des Systems gingen mit den Optimierungen der Repressoren, Aktivatoren und des Promotorbereiches einher. Urlinger modifizierte durch gerichtete Mutationen die Transaktivierungsdomäne des rtTA (rtTA-M2) und erreicht so eine niedrigere basale Expressionsrate und zusätzlich eine höhere DOX-Sensitivität [128]. Eine weitere Optimierung konnte durch die Expression eines Silencers (KRAB-Silencer-Domäne) erreicht werden, welcher in Abwesenheit an die TetO-Sequenzen bindet und somit die Basalrate sehr niedrig hält [129].

3.2.7. Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert (mean) + Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz (p-Wert) wurde mittels One- oder Two-Way-Anova bzw. unpaired Student's t-Test bestimmt. Bei immunhistochemischen Analysen wurde zum Vergleich des Intensitätsgradings zwischen den einzelnen Geweben der Kruskal Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistischen Analysen wurden mit der Graphpad Prism 5 Software durchgeführt.

Kapitel 4 Ergebnisse

4.1.Expression der 15-LOX-2 in humanen Pankreasgeweben und Karzinomzelllinien

4.1.1. 15-LOX-2-Expression in humanen Pankreasgeweben unterschiedlicher Dignität

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression von 15-LOX-2 wurde an Schnitten Formalin-fixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebe durchgeführt. Die Gewebeproben wurden vom Pathologischen Institut der Ruprecht-Karls Universität und dem Europäischen Pankreas Zentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. In Kooperation mit Dr. Frank Bergmann vom Pathologischen Institut der Ruprecht-Karls Universität erfolgte die histologische Zuordnung der Karzinome nach der internationalen histologischen Klassifikation von Tumoren der WHO.

4.1.1.1. gesundes Pankreasgewebe

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen 15-LOX-2 verwendet. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass dieser Antikörper keine Kreuzreaktion gegenüber den anderen humanen LOX-Isoformen aufwies. Die immunhistologische Analyse von gesundem Pankreasgewebe mit diesem spezifischen 15-LOX-2-Antikörper zeigte eine deutliche Färbung der dukталen Zellen mit Zellkern-freien, zytoplasmatischen, feingranulären Färbemustern, wie in Abbildung 15 dargestellt. Eine positive Färbung konnte in 21 von 23 untersuchten Gewebeschnitten beobachtet werden. In den beiden anderen untersuchten Gewebeschnitten waren in den dukталen Gangstrukturen nur einzelne Zellen positiv gefärbt. Somit waren 91 % aller untersuchten Gänge in gesunden Geweben positiv für die 15-LOX-2-Färbung (Abbildung 15 A).

Das azinäre Gewebe war in allen untersuchten Gewebeschnitten sehr heterogen gefärbt. In zehn der untersuchten Präparate konnte keine bzw. nur einzellige Färbungen beobachtet werden, während in 13 der untersuchten Präparate nur eine schwach fokal positive bis positive Färbung erfolgte (Abbildung 15 B). Die exemplarisch in

Abbildung 15 C zeigten Inselzellen färbten in allen untersuchten Präparaten deutlich fokal positiv bis positiv. Jedoch konnte in fünf untersuchten Gewebeschnitten keine positive Färbung für 15-LOX-2 detektiert werden. Die statistische Auswertung der histologischen Befunde, wie in Abbildung 15 D dargestellt, zeigt die Verteilung der Färbeintensitäten in den untersuchten Geweben, gemäß dem unter 3.2.5.6 beschriebenen „Grading“.

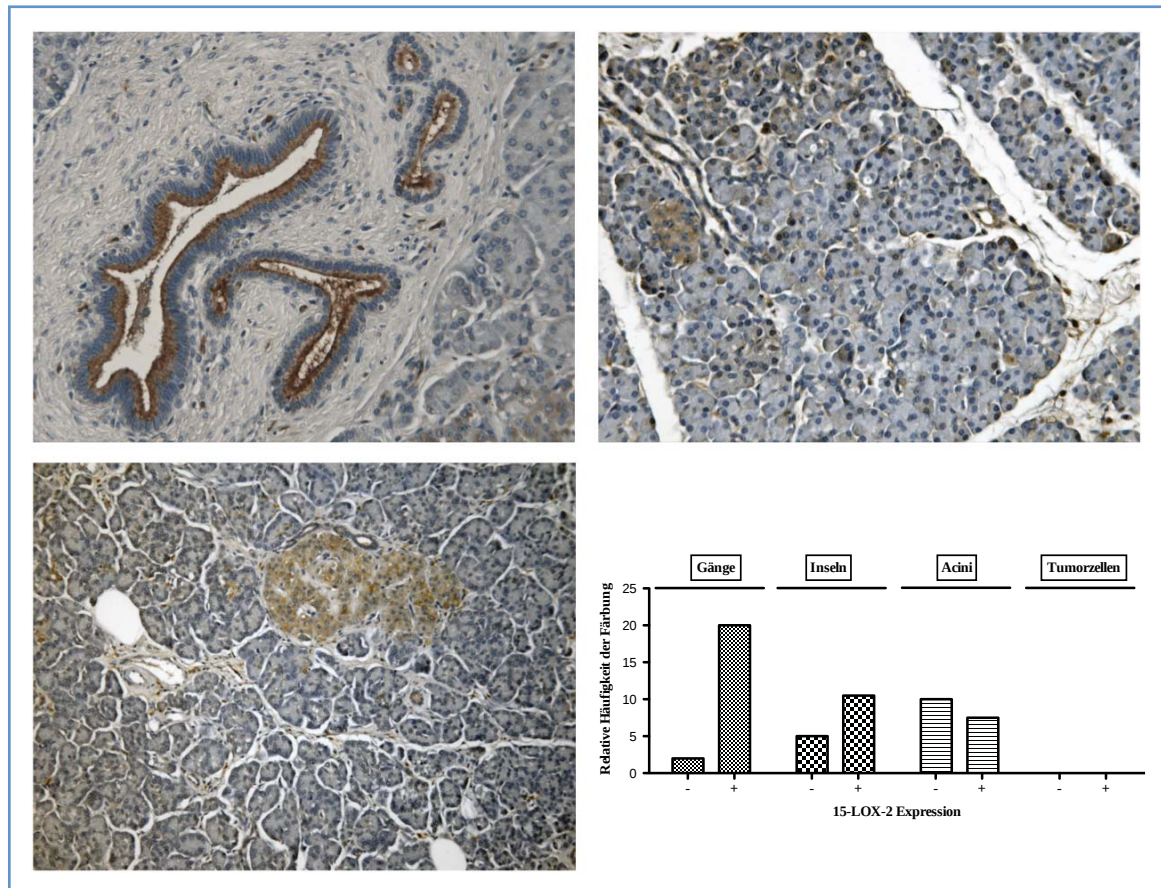


Abbildung 15: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in gesundem Gewebe des Pankreas. Die Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen 15-LOX-2 inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. (A) Die histologische Färbung zeigte eine 15-LOX-2-Lokalisation im Zytoplasma der Gangstrukturen, jedoch nicht im Kern der Zellen. (B) Das Azinuszewebe wies eine fokal positive Färbung auf. (C) Die Inselzellen zeigten eine deutlich stärkere positive Färbung für 15-LOX-2 als das umliegenden Azinuszewebe. Vergrößerung: x 200 (A-C). (D) Statistische Auswertung der histologischen Schnitte der einzelnen untersuchten gesunden Pankreasgewebe. Zur statistischen Analyse wurden 23 normale Pankreasgewebe herangezogen. Die Ermittlung der Färbeintensität erfolgte anhand eines Intensitätschemas. Die histologische Analyse wurde zweimal unabhängig von einem Pathologen überprüft.

4.1.1.2. PanIN Läsionen

Im Verlauf der Tumorprogression zeigte sich in den einzelnen PanIN-Läsionen ein schrittweiser Verlust der 15-LOX-2-spezifischen Färbung. In PanIN-1A Läsionen konnte, analog zum gesunden Pankreasgewebe, eine zytoplasmatische Färbung in den duktalem Zellen beobachtet werden (Abbildung 16 A), die in PanIN-1B Läsionen aber bereits signifikant reduziert war (Abbildung 16 B). Das Zytoplasma der duktalem Zellen war nur noch schwach fokal gefärbt und diese Färbung beschränkte sich lediglich auf einzelne Zellen. Die PanIN-2 Stadien zeigten ebenfalls nur noch ein fokal schwaches einzelzelliges Färbemuster. Abbildung 16 C stellt den Übergang von einem PanIN-1B zu einem PanIN-2 Stadium dar. Deutlich zu erkennen ist die positive fokale Färbung gegen 15-LOX-2 im linken unteren Abschnitt des Ganges, während der PanIN-2 Bereich im rechten oberen Bildausschnitt keine Färbung aufweist. Im Verlauf der malignen Progression der PanIN-Läsionen ging die Färbung für 15-LOX-2 sukzessiv verloren.

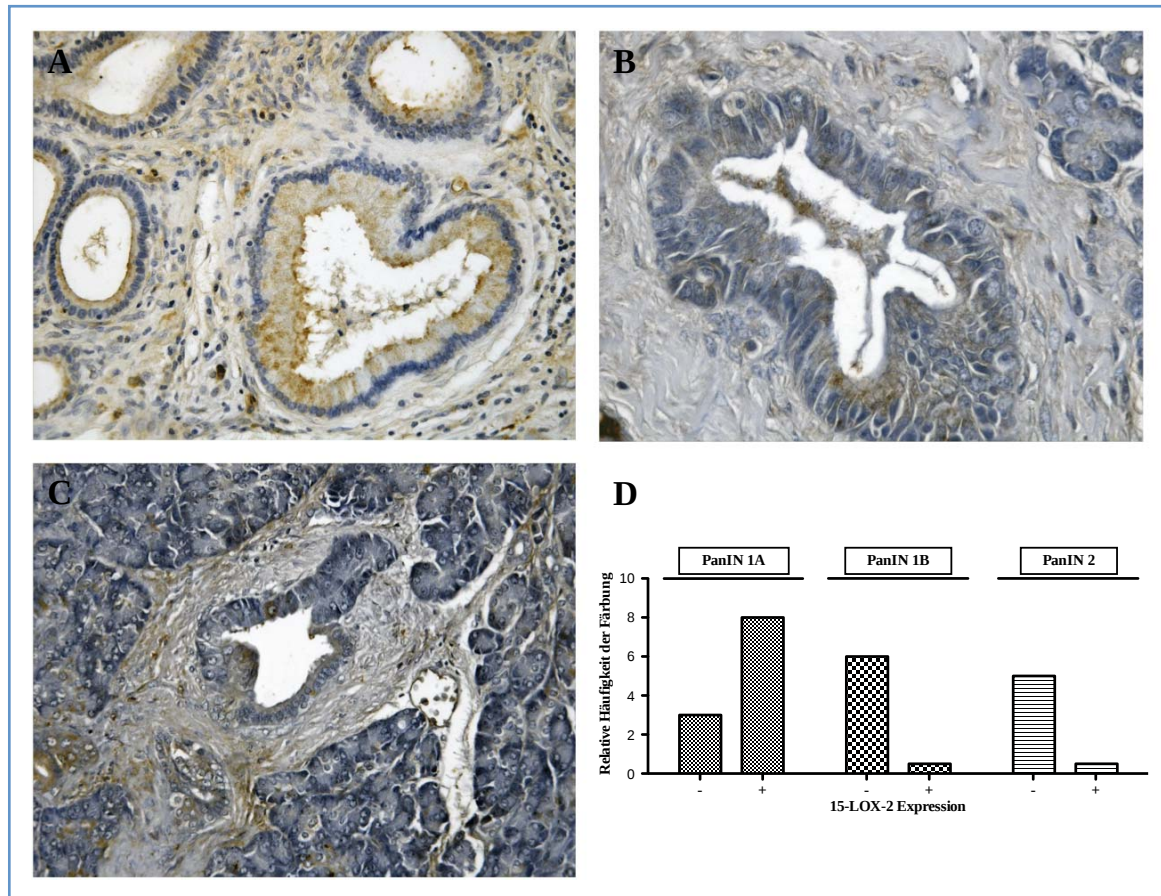


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in PanIN-Läsionen des Pankreas. Die Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen 15-LOX-2 inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. (A) Die histologische Färbung zeigte eine 15-LOX-2-Lokalisation im Zytoplasma der PanIN-1A Läsionen. (B) Die PanIN-1B Läsionen zeigten eine schwach fokal positive Färbung in einzelnen Zellen. (C) In den PanIN-2 Läsionen ging im Verlauf der Progression die spezifische Färbung für 15-LOX-2 verloren und konnte nur noch in einzelnen Zellen beobachtet werden. Vergrößerung: x 200 (A-C). (D) Statistische Auswertung der histologischen Schnitte der einzelnen untersuchten PanIN-Läsionen. Zur statistischen Analyse wurden 18 Gewebeschnitte mit PanIN-Läsionen herangezogen. Die Ermittlung der Färbintensität erfolgte anhand eines Intensitätsschemas. Die histologische Analyse wurde zweimal unabhängig von einem Pathologen überprüft.

4.1.1.3. Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine entzündlich fibrotische Erkrankung des Drüsenparenchyms als Folge wiederholter Nekrosen und Entzündungen mit Entwicklung von Gangveränderungen. Abbildung 17 A zeigt einen für 15-LOX-2-spezifisch zytoplasmatisch gefärbten Gang. Die periduktalen fibrotischen Strukturen wiesen eine inhomogene Färbung auf, die allerdings nach Analyse der verschiedenen Gewebeschnitte nicht eindeutig als spezifisch angesehen werden konnte. Die Lobuli des nicht untergegangenen azinären Gewebes in der chronischen Pankreatitis waren in ihrem

Färbeverhalten fast einheitlich als fokal schwach positiv anzusehen (Abbildung 17 B). Die unregelmäßig gestalteten Gangstrukturen, sogenannte tubuläre Komplexe, färbten für 15-LOX-2 nur fokal schwach bis leicht positiv (Abbildung 17 C). Im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe zeigten das azinäre Gewebe und die Inselzellen bei der chronischen Pankreatitis eine deutlich schwächere Färbung für 15-LOX-2 (beide $p < 0,05$, Dunn's Test). Keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen 15-LOX-2-Färbung waren dagegen in den Gangstrukturen unveränderter Gangareale zu beobachten (Abbildung 17 D).

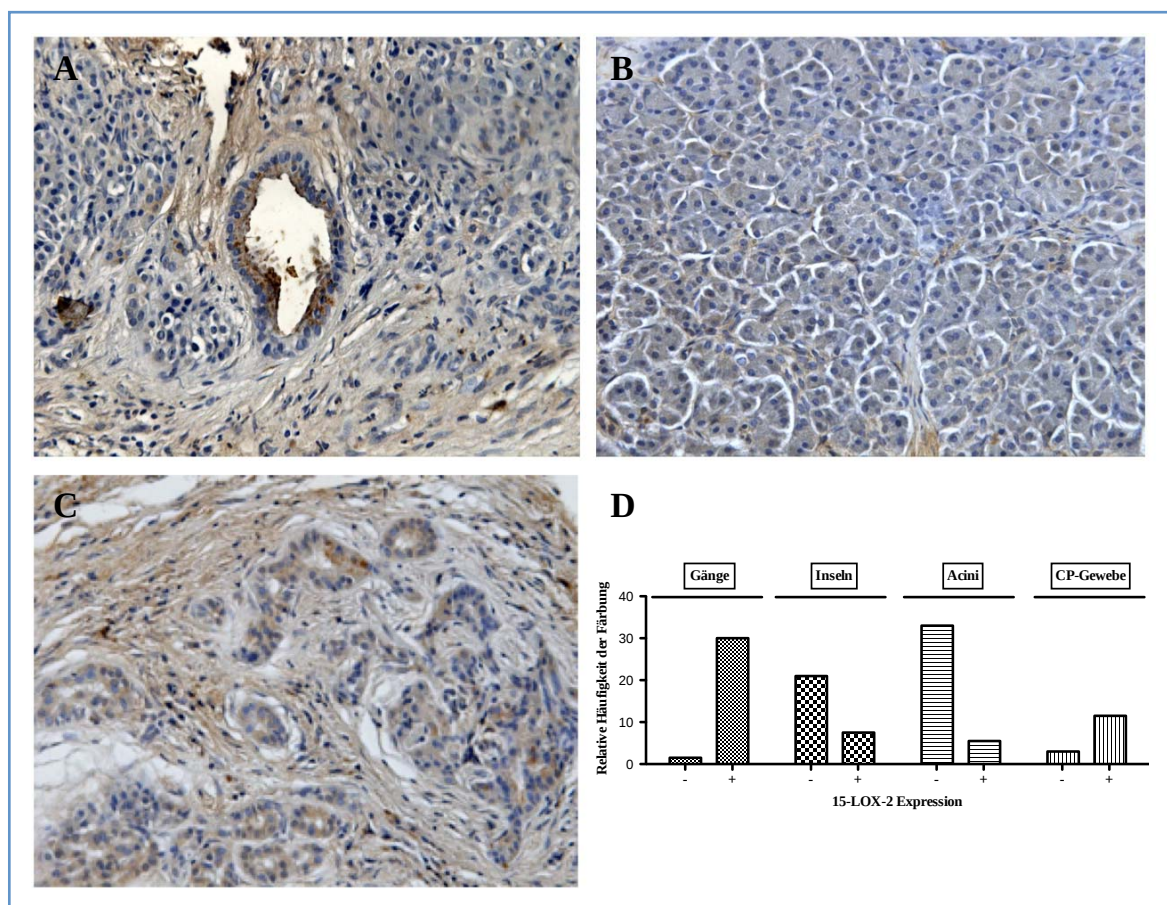


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben der chronischen Pankreatitis. Die Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen 15-LOX-2 inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. (A) Die histologische Färbung zeigte eine 15-LOX-2-Lokalisation im Zytoplasma der Gangstrukturen von gesunden Arealen der chronischen Pankreatitis. (B) Azinäres Gewebe chronischer Pankreatitis zeigte eine signifikant schwächere positive Färbung für 15-LOX-2 als gesundes azinäres Gewebe ($p < 0,05$). (C) In den tubulären Komplexen der chronischen Pankreatitis zeigte sich ein inhomogenes, jedoch positives Färbemuster für 15-LOX-2. Vergrößerung: $\times 200$ (A-C). (D) Statistische Auswertung der histologischen Schnitte der einzelnen untersuchten Gewebe der chronischen Pankreatitis. Zur statistischen Analyse wurden 34 Gewebsschnitte herangezogen. Die Ermittlung der Färbeintensität erfolgte anhand eines Intensitätsschemas. Die histologische Analyse wurde zweimal unabhängig von einem Pathologen überprüft.

4.1.1.4. Duktales Adenokarzinom

Die vom Tumor nicht betroffenen Gangstrukturen wiesen eine deutlich geringere Färbung für 15-LOX-2 auf als die entsprechenden Strukturen im Normalgewebe und in Gewebeschnitten der chronischen Pankreatitis ($p < 0,05$, Dunn's Test). Azinäres Gewebe und Inselzellen zeigten ebenfalls ein schwächeres Färbeverhalten. In 30 untersuchten Gewebeschnitten waren azinäre Zellen und Inselzellen fast ausschließlich einzeln gefärbt (Azinus: 2 von 27 / Inselzellen: 5 von 30) oder gänzlich ungefärbt (Azinus: 25 von 27 / Inselzellen: 2 von 30). Gegenüber den Normalgeweben war die Färbung signifikant reduziert. ($p < 0,05$, Dunn's Test) (Abbildung 18 B). Tumorzellen wiesen eine heterogene einzellige bis einheitlich fokal schwache zytoplasmatische Färbung auf (20 von 28) während 9 von 28 untersuchten Geweben keine Färbung für 15-LOX-2 in den Tumorzellen zeigten (Abbildung 18 C). Somit waren 32 % aller untersuchten Tumorgewebeschnitten negativ für die 15-LOX-2-Färbung. Dagegen wiesen 68 % eine schwache Färbung auf. Vereinzelt konnte auch eine nukleare Färbung in den Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 19).

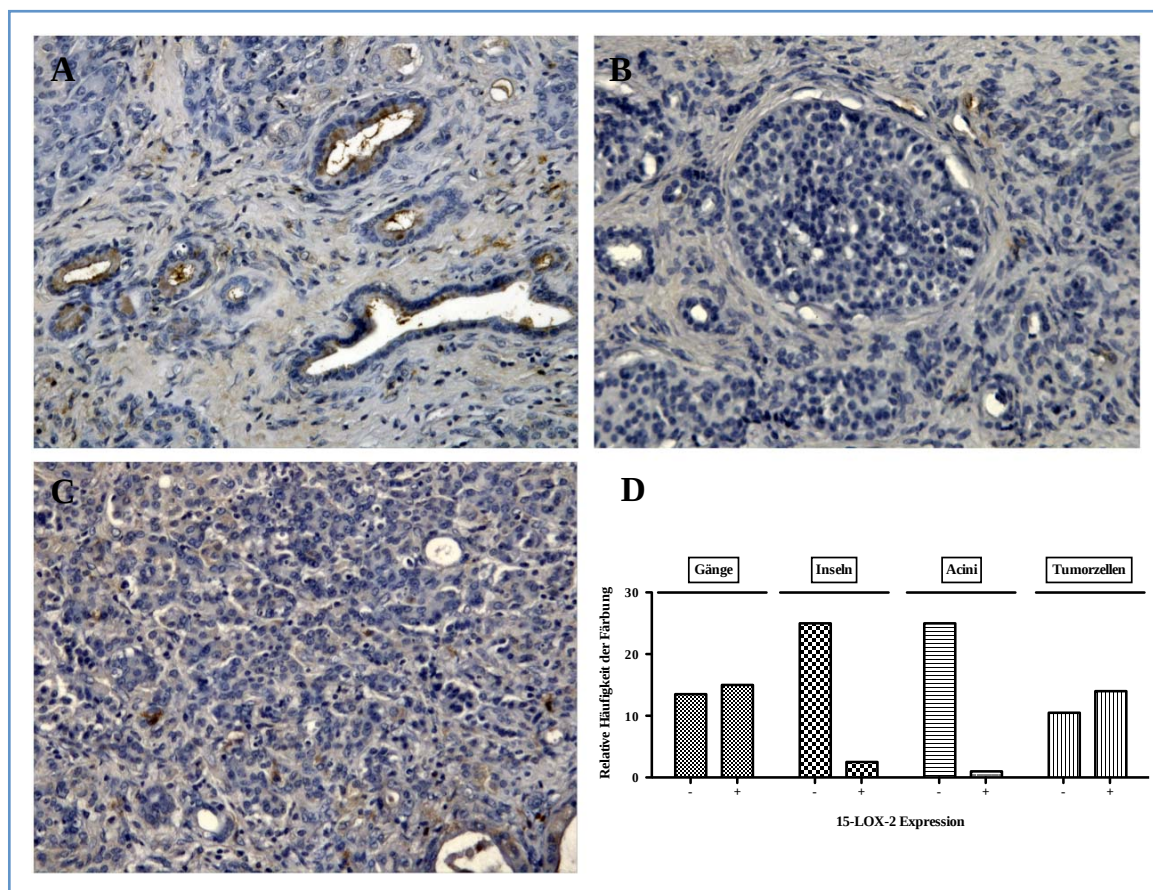


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben des dukталen Adenokarzinoms. Die Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen 15-LOX-2 inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. (A) Die histologische Färbung von nicht kanzerogenen Gängen zeigte im Vergleich zu Pankreasgängen des gesunden Gewebes eine signifikant geringere 15-LOX-2-Lokalisation im Zytoplasma. (B) Die Inselzellen wiesen eine sehr geringe Färbung für 15-LOX-2 auf. (C) In den Tumorzellen zeichnete sich ein inhomogenes Färbemuster für 15-LOX-2 ab. Die Tumorzellen wiesen teilweise einzelzelliges oder flächendeckendes Färbemuster auf. Dabei war die Färbung jedoch nur fokal schwach positiv. Vergrößerung: x 200 (A-C). (D) Statistische Auswertung der histologischen Schnitte der einzelnen untersuchten Karzinomgewebe. Zur statistischen Analyse wurden 30 Gewebe herangezogen. Die Ermittlung der Farbeintensität erfolgte anhand eines Intensitätsschemas. Die histologische Analyse wurde zweimal unabhängig von einem Pathologen überprüft.

4.1.1.5. Intrazelluläre Lokalisation der 15-LOX-2 im Normalgewebe vs. Tumorgewebe und Entzündungsclustern

Wie bereits in Abbildung 15 dargestellt, waren die histologischen Färbungen für 15-LOX-2 im gesunden Gewebe auf das Zytoplasma der Gang-, Azinus und Inselzellen begrenzt. Abbildung 19 zeigt in 630-facher Vergrößerung die granuläre Färbung des Zytoplasmas einer gesunden Gangzelle, während der Nukleus negativ war (A). In späteren prämaligen Stufen der Pankreaskarzinogenese sowie in Karzinomzellen war zusätzlich

eine Färbung der Zellkerne für 15-LOX-2 zu beobachten. Dies deutete auf eine Translokation der 15-LOX-2 vom Zytoplasma in den Nukleus hin. Erste Veränderungen in der 15-LOX-2-Lokalisation konnten durch spezifische Färbungen bereits in den PanIN-2 Läsionen sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 16 C). Ab diesem Stadium der Tumorgenese konnte regelmäßig eine nukleäre Färbung in den Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden. (Abbildung 19 B). Die desmoplastische Reaktion des Pankreastumors geht meist mit einer massiven Infiltration von Entzündungszellen einher. Die Analysen dieser Bereiche zeigten, dass die Entzündungsareale im Tumorgewebe und der chronischen Pankreatitis ebenfalls eine spezifische Färbung für 15-LOX-2 aufwiesen (siehe Abbildung 19 C und D). Makrophagen zeigten eine granuläre zytoplasmatische Färbung, während in leukozytären Zellen des Immunsystems keine Expression von 15-LOX-2 nachgewiesen werden konnte. [81].

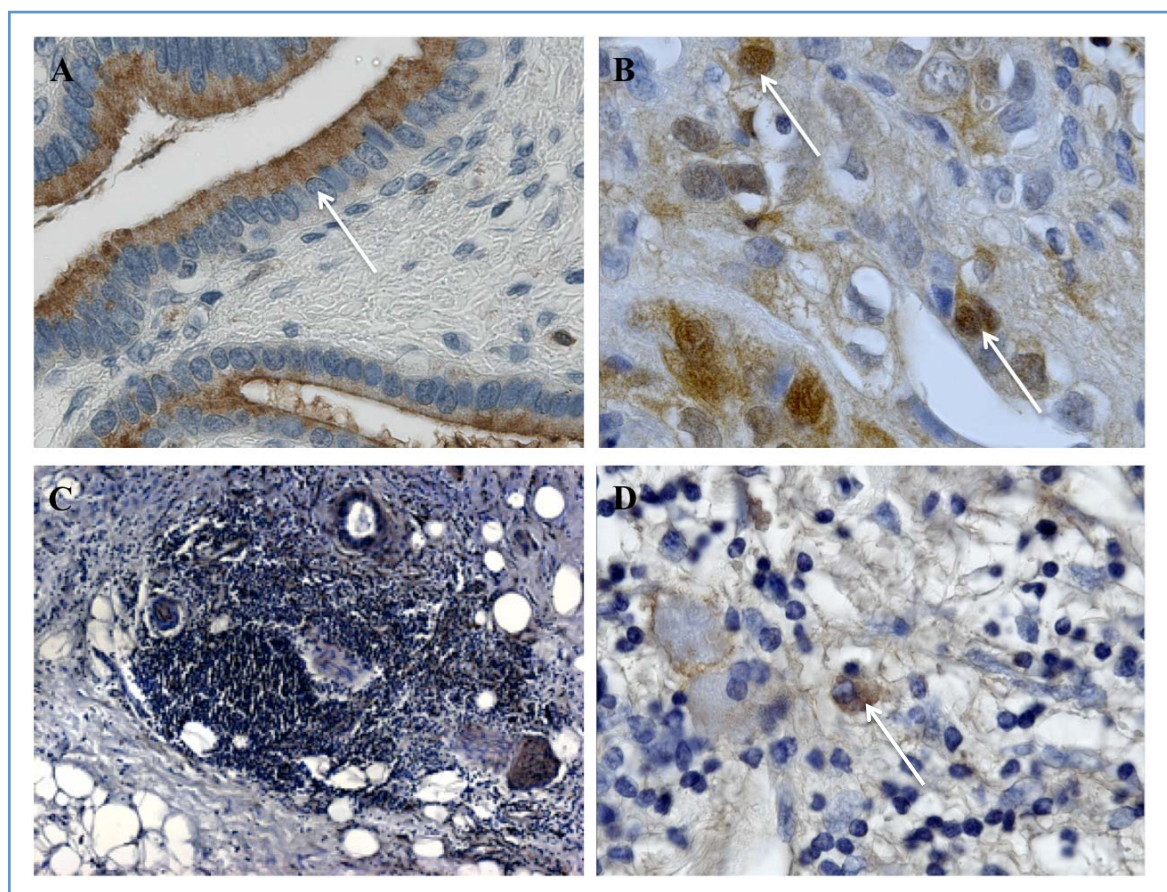


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben des gesunden Pankreas vs. duktalem Adenokarzinom. Die Formaldehyd-fixierten Paraffinschnitte wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen 15-LOX-2 inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. (A) Die histologische Färbung von Gängen des gesunden Pankreasgewebes zeigte eine granuläre Färbung des Zytoplasmas. (B) Dargestellt ist ein Tumorgewebe mit vereinzelter nukleärer und zytoplasmatischer Färbung von 15-LOX-2 in Tumorzellen (siehe Pfeil). (C) Übersicht eines inflammatorischen Areals innerhalb eines Tumorgewebes. (D) Makrophagen (siehe Pfeil) wiesen eine positive Färbung für 15-LOX-2 im Zytoplasma auf. Vergrößerung: x 630 (A,B,D), x 200 (C).

4.1.2. Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzelllinien

Für in vitro Studien standen in der vorliegenden Arbeit zehn verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien zur Verfügung, die unterschiedliche Charakteristika bezüglich Wachstum und Malignität aufwiesen. Die Expression von 15-LOX-2 in diesen Zellen wurde mittels RT-PCR und Immunoblot-Analyse untersucht. Als Positivkontrollen dienten RNA- und Proteinextrakte aus transient mit einem 15-LOX-2 pcDNA-3 Expressionsplasmid transfizierten HEK293 Zellen. Wie in den Abbildungen 20 und 21 exemplarisch gezeigt, lies sich in keiner der untersuchten Zelllinien weder, auf RNA- noch auf Proteinebene eine Expression von 15-LOX-2 nachweisen.

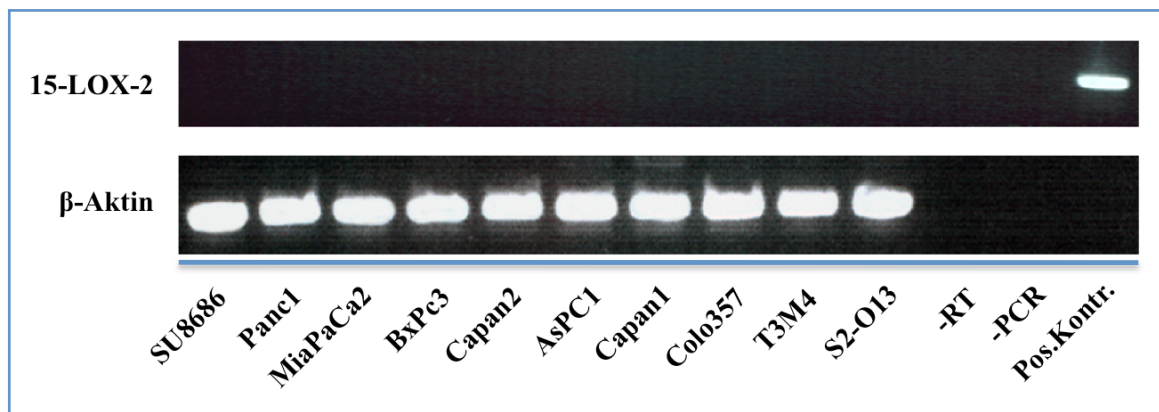


Abbildung 20: RT-PCR Analyse der Expression von 15-LOX-2 in zehn verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte in keiner Pankreaskarzinomzelllinien eine Expression von 15-LOX-2 detektiert werden. Die Positivkontrolle wurde aus einer Transfektion eines 15-LOX-2-Expressionsplasmids auf pcDNA Basis in HEK293 Zellen gewonnen. Als interne Kontrolle diente β -Aktin.

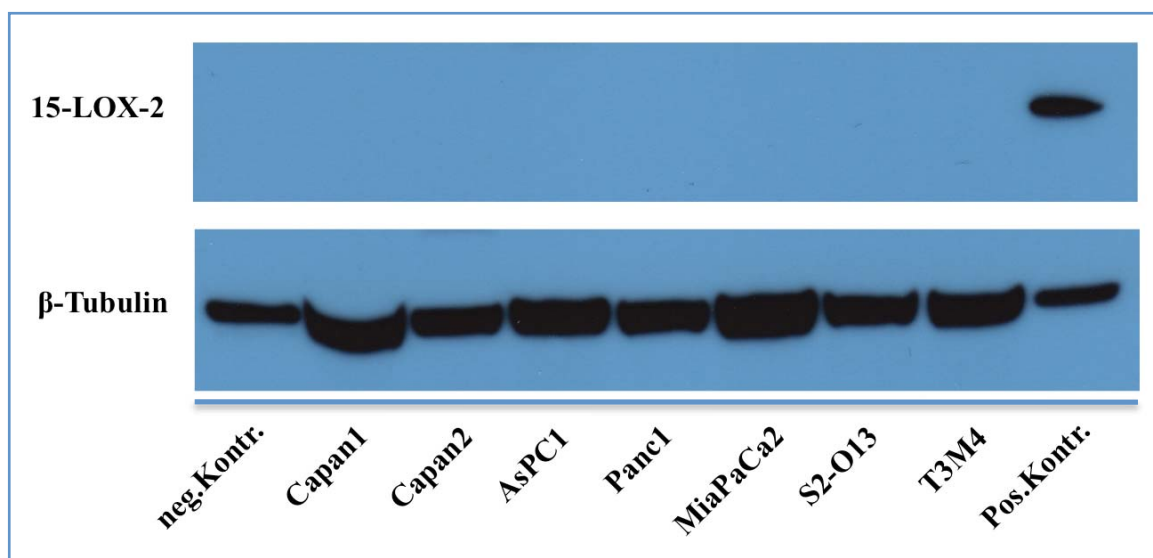


Abbildung 21: Immunoblot-Analyse der 15-LOX-2-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte in keiner der Zelllinien eine 15-LOX-2-Expression nachgewiesen werden. Als interne Kontrolle diente β -Tubulin.

4.2.Etablierung des 15-LOX-2-TET-ON Genexpressionssystem

In Vorversuchen mit transienten Transfektionen konnte gezeigt werden, dass die Expression des 15-LOX-2-Gens eine inhibierende Wirkung auf das klonale Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinien Panc1, MiaPaCa-2 und S2-O13 ausübte (Daten nicht gezeigt). Eine Reproduzierbarkeit und Validierung dieser Ergebnisse war jedoch auf Grund der variablen Transfektionseffizienz nur eingeschränkt möglich. Um die funktionelle Rolle von 15-LOX-2 *in vitro* näher untersuchen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit ein stabiles, induzierbares 15-LOX-2-Expressionssystem in Pankreaskarzinomzellen etabliert werden. Hierzu wurde zunächst das in unserem Labor bereits etablierte „TET-ON Gene Expression System“ der Firma Clontech verwendet. Dieses System basiert auf einer klassischen 2-Vektor Strategie. Ein Vektor enthält die Repressor-Funktion und der andere das Ziel-Gen mit der Promotor-Operator Sequenz (siehe Abschnitt 3.2.6.11). Die ersten Versuche zur funktionellen Analyse des 15-LOX-2-Gens in den Pankreaskarzinomzellen wurden mit Hilfe dieser 2-Vektor Strategie durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass in Zellen mit höherer Passagenzahl die 15-LOX-2-vermittelten Effekte zunehmend geringer wurden, die Induzierbarkeit des gesamten Systems in allen Klonen stark zurück ging und schlussendlich gänzlich verloren ging. Daher wurde für die weiteren

Versuche ein weiterentwickeltes TET-ON-System verwendet, welches auf einem episomal replizierenden Expressionsplasmid basiert. Der Vorteil dieses episomalen TET-ON-Vektorsystems (pRTS-Vektorsystem) besteht zunächst darin, dass im Unterschied zum klassischen 2-Vektor System alle Elemente auf nur einem Vektorkonstrukt lokalisiert sind. Des Weiteren enthält der 18,4 kbp große Vektor zusätzliche Repressoren und Aktivatoren, die eine basale Leckexpression minimieren und die DOX-induzierte Expression amplifizieren. Der pRTS-1 Ausgangsvektor besitzt einen cistronischen bidirektionalen Promotor, der die Expression von 2 Marker-Genen, GFP und Luciferase steuert. Beide Gene können gezielt durch verschiedene Restriktionsstellen mit dem „gene of interest“ ersetzt werden. Da der Vektor sich nicht ins Genom der Zielzelle integriert, sondern als Episom repliziert wird, ist für dieses System im Gegensatz zum klassischen TET-ON-System das Risiko einer Insertionsmutagenese sehr gering.

4.2.1. Konstruktion der 15-LOX-2-TET-ON Vektorplasmide

Für die Klonierung beider TET-ON Vektor-Systeme standen die Sequenzen der humanen 15-LOX-2 und der inaktiven Form der 15-LOX-2 in Form von eukaryontischen pcDNA3-Expressionsvektoren zur Verfügung. Die inaktive Enzymvariante wurde in vorangegangenen Arbeiten durch Austausch des essentiellen His³⁷³ durch ein Glu (H373Q-Mutation) hergestellt. Diese Punktmutation bewirkt einen Verlust des koordinierten Eisen Atoms (Fe²⁺) im katalytischen Zentrum der 15-LOX-2, der mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht [130]. Beide cDNA Sequenzen (15-LOX-2 und inakt.15-LOX-2) wurden mittels PCR - unter Verwendung von Primern mit integrierten geeigneten Schnittstellen - aus den pcDNA3-Vektoren amplifiziert. Zur Überprüfung der PCR wurden die Amplifikate sequenziert. Die verifizierten Sequenzen wurden im Anschluss in einen pcDNA3-IRES-EGFP-Vektor 5'flankierend vor das EGFP-IRES-Element des Vektors kloniert. Über die Schnittstellen EcoRI und SalI wurde das gesamte Element, bestehend aus der 15-LOX-2-EGFP-IRES-Sequenz, herausgeschnitten und in den Zielvektor pcDNA4-TO einligiert. Zur Überprüfung der PCR- und Klonierungsprodukte wurden im Anschluss die Inserts der Vektorkonstrukte über die komplette multiple Klonierungsstelle (MCS) hinweg sequenziert. Somit konnten nochmals Fehler der PCR oder Fehler während den einzelnen Klonierungsschritten

ausgeschlossen werden. Das eingesetzte TET-ON Repressorplasmid stand für die folgenden Analysen zur Verfügung und wurde nicht weiter modifiziert. Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die pcDNA4-TO-15-LOX-2-Vektoren transient in HEK293 Zellen transfiziert und die enzymatische Aktivität der Proteinlysate im Standard-LOX-Assay via HPLC-Analyse untersucht (Daten nicht gezeigt).

Somit standen alle Bestandteile des klassischen 2-Vektorsystems wie in Abbildung 22 dargestellt für ein funktionelles TET-ON-Expressionssystem zur Verfügung.

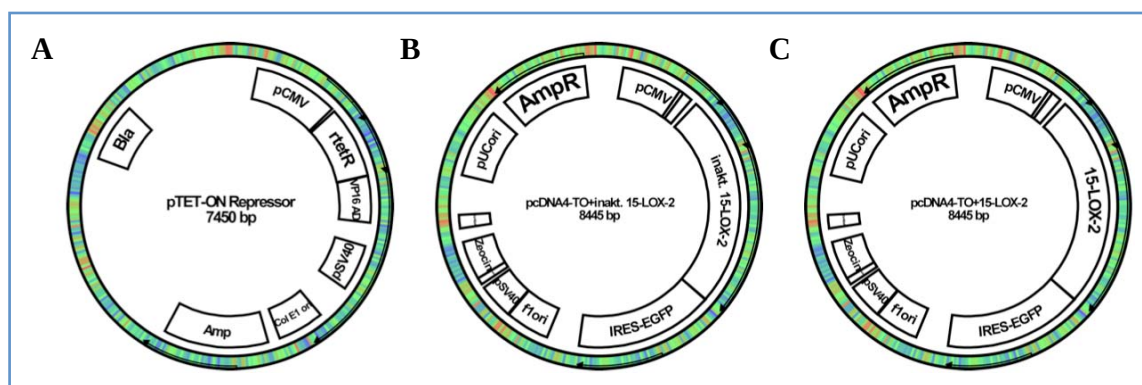
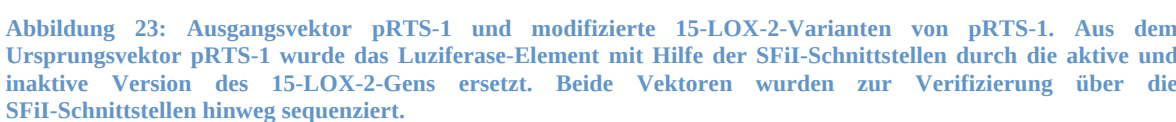


Abbildung 22: Verwendete Vektoren des klassischen TET-ON-Systems. Der pTET-ON Repressor enthält als regulatorisches Element den rtTA (TET-Repressor). Als Basis der beiden 15-LOX-2-Expressionsplasmide dient der pcDNA4-TO Vektor. Über die Schnittstellen EcoRI und SalI wurden die 15-LOX-2-IRES-EGFP-Sequenzen in den Vektor kloniert.

Analog zum erstgenannten System, wurde für das pRTS-1 Vektorsystem die Sequenz der aktiven und inaktiven 15-LOX-2-Variante mittels PCR und Primern mit integrierten SfiI-Schnittstellen aus dem pcDNA3-Expressionsvektor amplifiziert und zur Überprüfung sequenziert. Im pRTS-1 Vektor wurde das Luziferase-Element mit Hilfe von SfiI-Schnittstellen durch jeweils eine der beiden 15-LOX-2-Varianten ersetzt, wie es in Abbildung 23 dargestellt ist. Anschließend wurde die 15-LOX-2 der pRTS-Vektoren ebenfalls nach Transfektion mittels HPLC-Analyse auf ihre enzymatische Funktion überprüft. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die beiden modifizierten pRTS-1-Vektoren als pRTS-15-LOX-2 und pRTS-inakt.15-LOX-2 bezeichnet.



15-LOX-2-Expressionsplasmids wurden 800 µg/ml Zeocin verwendet, da 1000 µg/ml zu einem frühen Absterben nach 5 Tagen führten, während Konzentrationen unter 800 µg/ml nicht zum vollständigen Absterben der Zellen ausreichten (Abbildung 24 B).

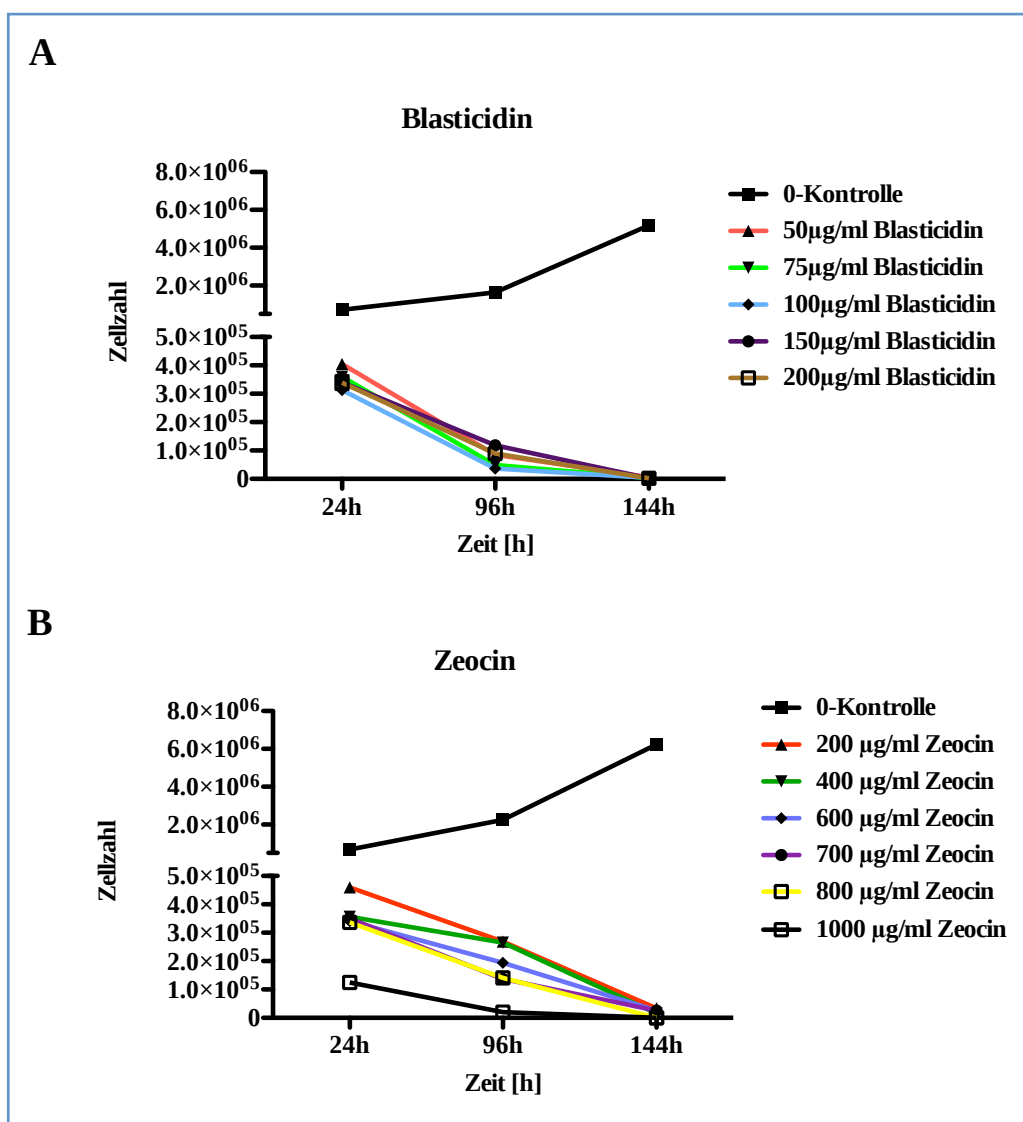


Abbildung 24: Bestimmung der optimalen Antibiotika-Selektionsbedingungen für die Pankreaskarzinomzelllinie Panc1. Die Zellen wurden am Vortag des Versuches mit 50000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen behandelt. Für Blastidicin wurden 0-200 µg/ml verwendet und für Zeocin 0-1000 µg/ml. Abbildung 24 zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten. Die ermittelte einzusetzende Konzentration für spätere Selektionen lag für Blastidicin bei 50 µg/ml und für Zeocin bei 800 µg/ml.

Für die Selektion zellulärer pRTS-15-LOX-2 Klone in Panc1 Zellen wurde Hygromycin B verwendet. Der Antibiotika-Selektionstest in den Mutterzellen Panc1 wurde analog zum klassischen TET-ON-System durchgeführt. Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, lag die ermittelte optimale Konzentration für Hygromycin B bei 200 µg/ml Medium.

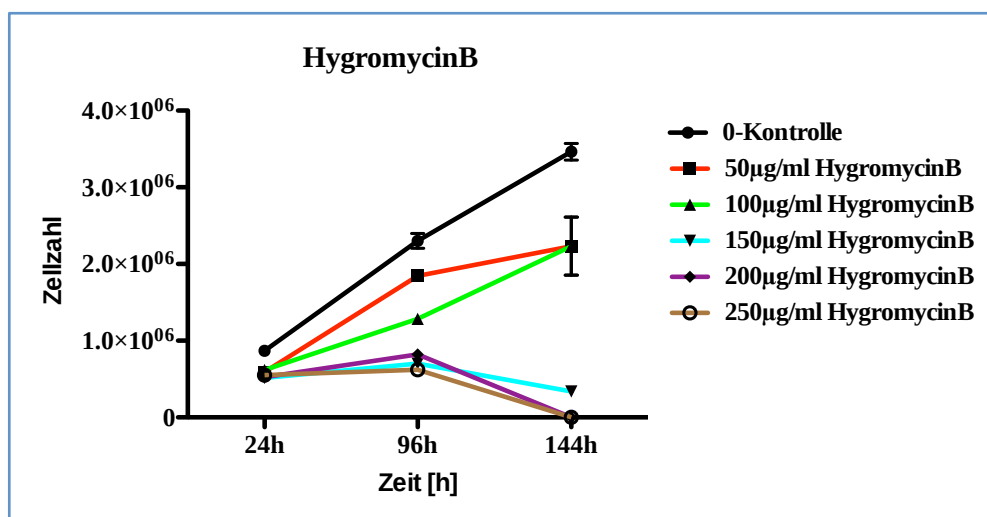


Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Antibiotika-Selektionsbedingungen für die Pankreaskarzinomzelllinie Panc1. Die Zellen wurden am Vortag des Versuches mit 50000 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Hygromycin B Konzentrationen behandelt. Das Diagramm zeigt den Mittelwert aus Triplikaten mit dem entsprechenden Standardfehler (SEM). Die ermittelte einzusetzende Konzentration für spätere Selektionen lag für Hygromycin B bei 200 µg/ml.

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Antibiotika in Kombination mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und die ermittelten Selektionskonzentrationen für Panc1 Karzinomzellen.

Antibiotika	Stock-Konzentration	Plasmid	Selektions-Konzentration
Blasticidin	50 mg/ml	TR6 Repr.	50 µg/ ml
Zeocin	100 mg/ml	pcDNA4-LOX	800 µg/ ml
Hygromycin B	50 mg/ml	pRTS-1	200 µg/ ml

4.2.3. Etablierung induzierbarer LOX-Expressionslinien

Die Etablierung des klassischen TET-ON-Systems basiert auf einer Doppeltransfektion. In der ersten Transfektion erfolgt die Inkorporation des Repressorplasmids in die Panc1 Zellen. Die Selektion der zellulären Klone erfolgte mit Hilfe des Antibiotikums Blasticidin. Nach sieben Tagen wurden 24 Klone in einer 24-Well-Platte isoliert und expandiert, von denen 12 Klone den Selektionsdruck überlebten. Diese wurden nun als stabile TET-Repressor-Klone kryokonserviert und auf ihre Induzierbarkeit getestet. Hierfür wurden die Klone 1 - 12 transient mit einem LacZ-Reporterkonstrukt (Invitrogen) transfiziert und mit Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation lysiert und die Induzierbarkeit der verschiedenen TET-Klone mit Hilfe des β -Galactosidase-Assays ermittelt. Essentiell für eine ideale Transaktivatorzelllinie ist der

Induktionsfaktor, der als Quotient der Geninduktion und der Hintergrundexpression des Gens definiert wird (Daten nicht gezeigt). Die besten drei Klone (pTR6 Klon 6, 8 und 10) wurden für die sekundären Transfektionen des aktiven und inakt.15-LOX-2-Expressionsplasmids ausgewählt. Aus der erneuten Selektion mit Zeocin gingen jedoch nur Klone der TR6-10+inakt.15-LOX-2-Doppeltransfektanten hervor (siehe Abbildung 26). Doppeltransfektanten mit aktivem 15-LOX-2-Expressionsvektor ließen sich auch nach mehreren Versuchen nicht als stabile Klone etablieren. Die in Abbildung 26 dargestellten Klone stammen ausschließlich aus der Doppeltransfektion des Repressor Klons 10 und dem inakt.15-LOX-2-Expressionsplasmid. Nach DOX-Induktion zeigten alle Klone ein unterschiedliches Expressionspotential für das 15-LOX-2-Gen, wobei die Klone 4 und 5 die stärkste Expression von inakt.15-LOX-2 aufwiesen. Im „ausgeschalteten“ Zustand des Systems, d.h. ohne DOX-Zugabe, ließ sich bei einigen Klonen jedoch auch eine leichte basale Expression feststellen, die entweder auf Rückstände an Tetracyclin im FCS des Kulturmediums oder auf eine systeminterne Leckexpression zurückzuführen war (Abbildung 26). Die Expression des TET-Repressorproteins in den verschiedenen Doppeltransfektanten wurde mittels Immunoblot analysiert. Alle Klone exprimierten den TET-Repressor, wenn auch in verschiedenen Expressionsstärken. Als interne Negativkontrolle diente die 15-LOX-2-Positivkontrolle (HEK 293 Transfektion nur mit 15-LOX-2-Expressionsplasmid, jedoch ohne Repressorplasmid). Für die weiterführenden Versuche wurden die Klone 4 und 5 ausgewählt sowie als Negativkontrolle der entsprechende Ausgangs-Repressor-Klon pTR6-10.

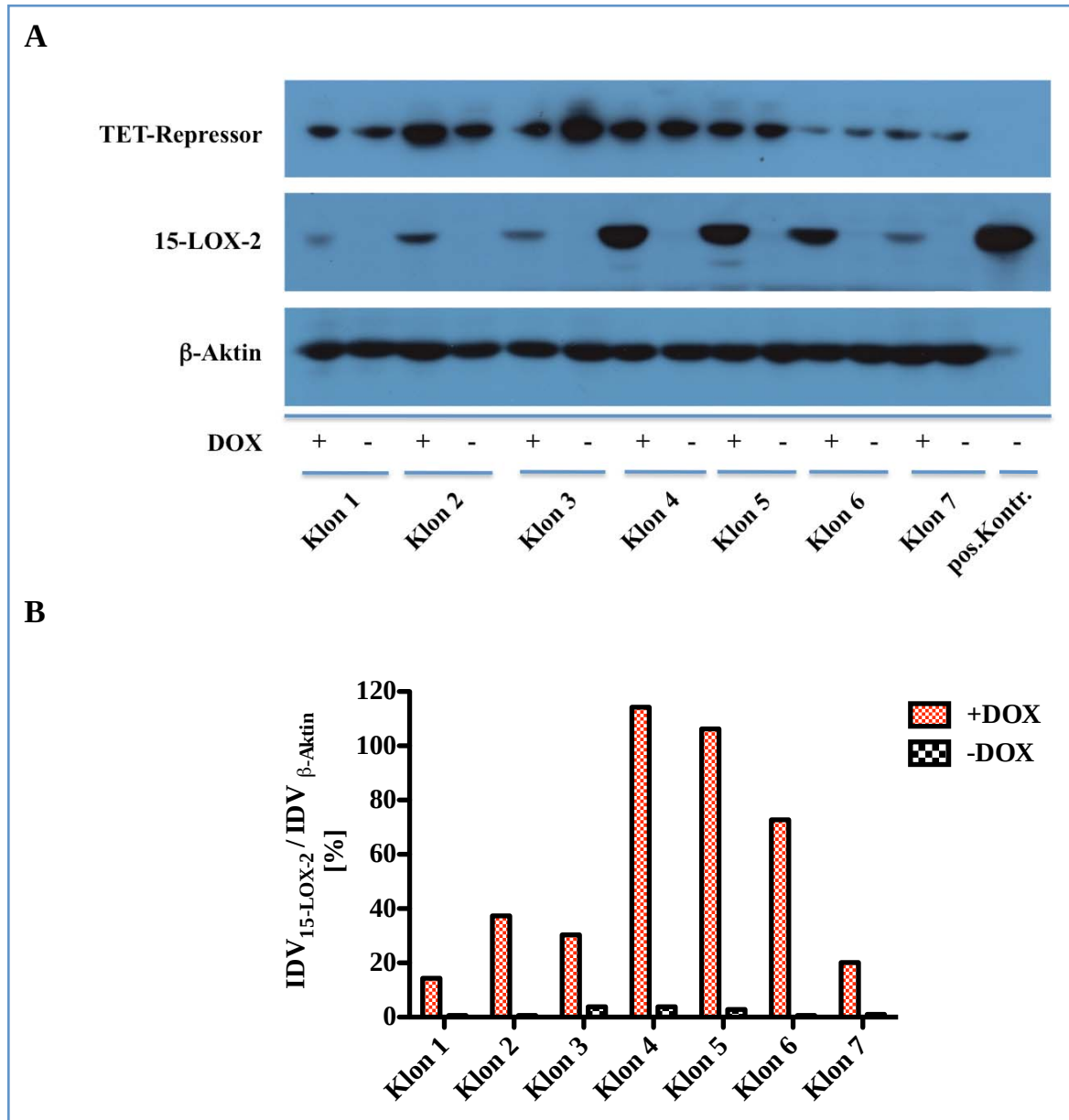


Abbildung 26: (A) DOX-induzierte 15-LOX-2-Expression in verschiedenen Doppeltransfektanten. Zellen der einzelnen Klone wurden 24 h nach Aussaat für 48 h mit 2 µg/ml DOX behandelt. 30 µg Gesamtprotein wurden in einem 7.5 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Immunoblot wurde anschließend mit einem 15-LOX-2-Antiserum bzw. anti-TET-Repressor und dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper visualisiert. Als Positivkontrolle (pos.Kontr.) dienen Proteinlysate aus transient mit einem 15-LOX-Expressionsplasmid transfizierten HEK 293-Zellen. β-Aktin diene als Ladungskontrolle. Alle dargestellten Klone exprimierten 15-LOX-2 sowie den TET-Repressor. Dabei exprimierten Klon 4 und 5 15-LOX-2 am Stärksten. (B) Semi-quantitative Analyse der LOX-Expression normiert über β-Aktin.

Im Gegensatz zum pTR6-System war für die Etablierung des pRTS-1-TET-ON-Systems nur eine Transfektion erforderlich. Die Selektion erfolgte mit Hygromycin B. Um die Ergebnisse beider Systeme vergleichen zu können, wurde erneut die Zelllinie Panc1 verwendet. Nach Transfektion der 18,4 kbp großen episomalen

pRTS1-15-LOX-2-Vektorkonstrukte (aktiv und inaktiv) wurden die zellulären Klone analog zum 2-Vektor-System expandiert. Während beim klassischen System nur eine Etablierung inaktiver 15-LOX-2 Klone möglich war, konnten mit dem pRTS-1-TET-ON-Vektor-System sowohl aktive als auch inaktive Klone etabliert werden. Abbildung 27 zeigt eine Auswahl an stabilen pRTS-15-LOX-2 Klonen nach 48-stündiger Induktion mit Doxycyclin. Analog zum klassischen System zeigten alle Klone eine unterschiedliche Expressionsstärke, die mittels densitometrischer Auswertung (normiert über β -Aktin) quantifiziert werden konnte (Abbildung 27 B). Abbildung 28 stellt die etablierten inakt.15-LOX-2 Klone des pRTS-TET-ON-Vektorsystems dar. Die inaktiven Klone wiesen im Vergleich zu den aktiven Klonen ein vergleichbares DOX-Induktionsverhalten auf. Für die weiteren Funktionsanalysen wurden die aktiven 15-LOX-2 Klone 5, 6 und 11 sowie die inaktiven 15-LOX-2 Klone 2 und 4 ausgewählt.

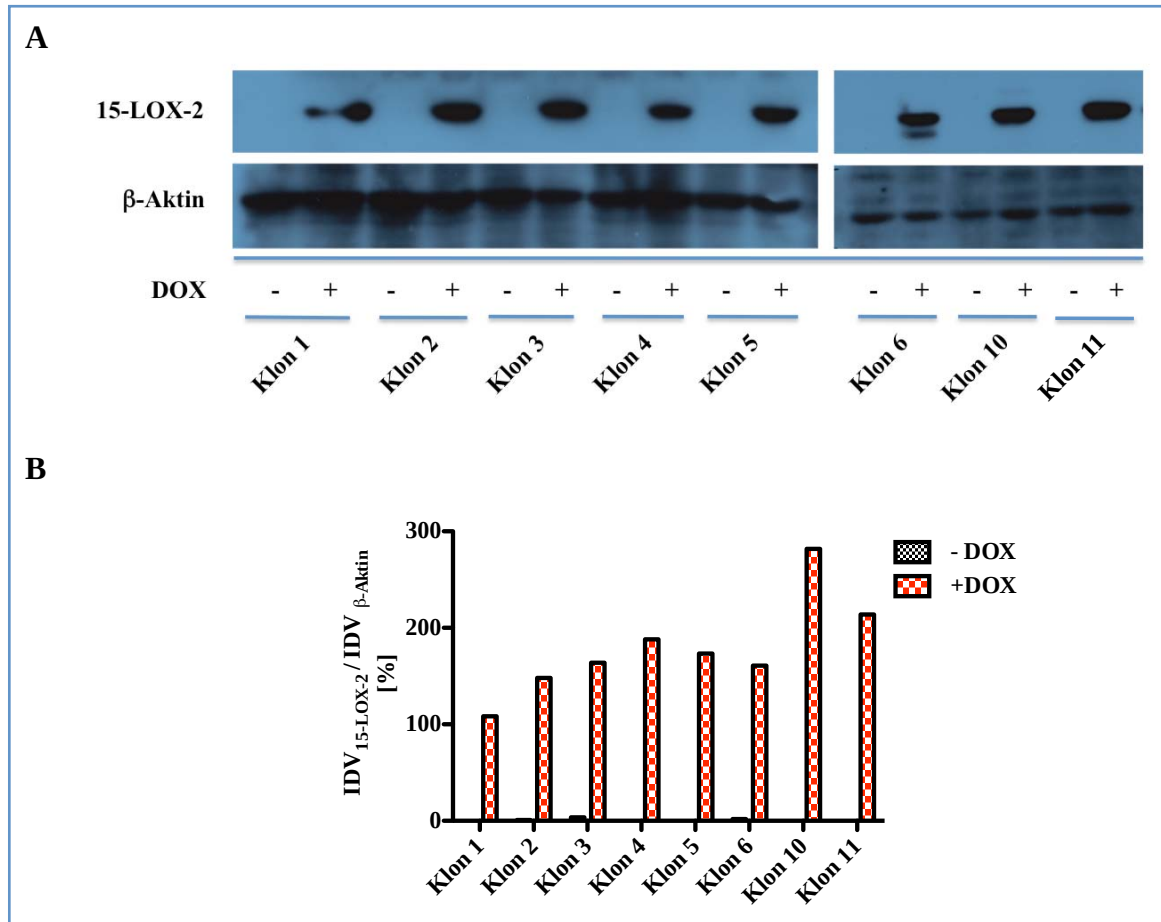


Abbildung 27: Bestimmung der DOX-induzierten Expressionsstärke von aktiver 15-LOX-2 in verschiedenen pRTS-15-LOX-2 Klonen. (A) 30 μ g Gesamtprotein wurden in einem 7.5 % SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Der Immunoblot wurde anschließend mit einem 15-LOX-2-Antiserum und dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper visualisiert. Nach 48-stündiger Induktion mit DOX exprimierten alle Klone 15-LOX-2 in unterschiedlichen Stärken. Dabei exprimierten Klon 10 und 11 nach der densitometrischen Analyse 15-LOX-2 am Stärksten. (B) Semi-quantitative Analyse der LOX-Expression normiert über β -Aktin.

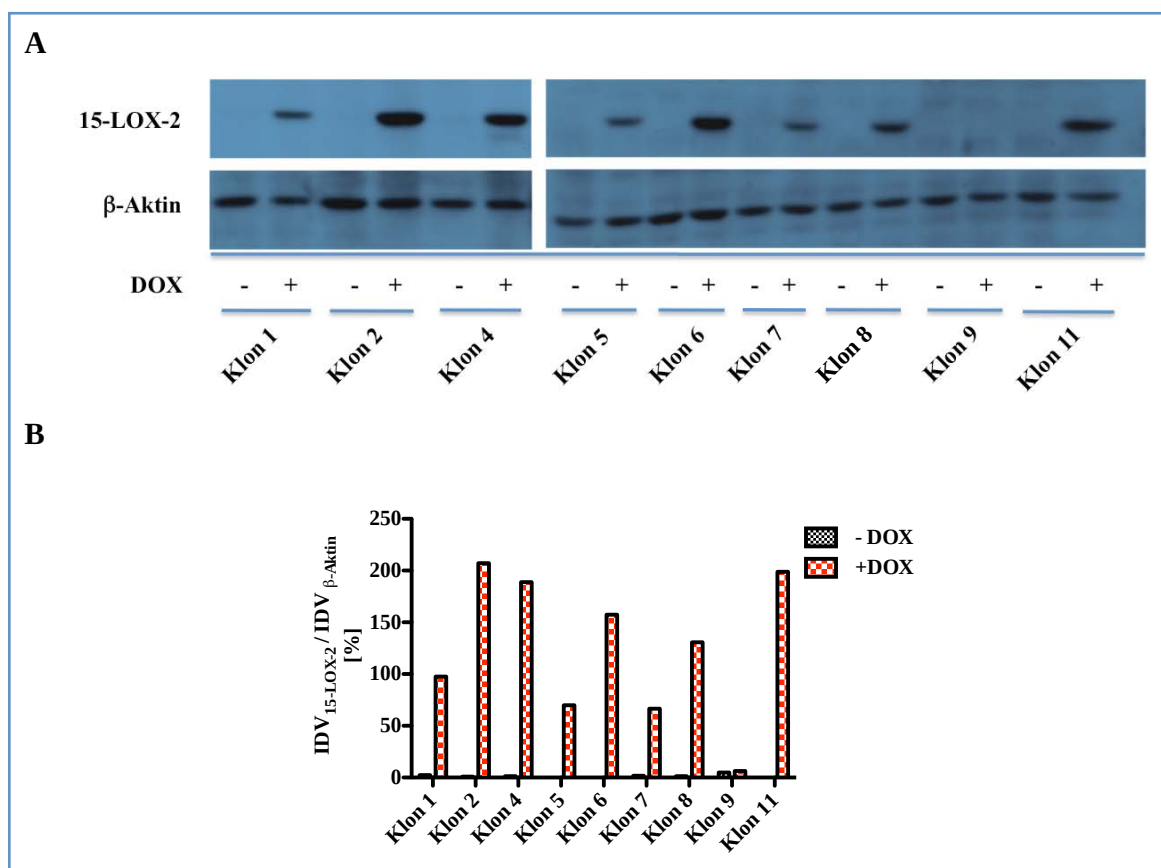


Abbildung 28: Bestimmung der DOX-induzierten Expressionsstärke von inaktiver 15-LOX-2 in verschiedenen inakt.pRTS-15-LOX-2 Klonen. (A) Nach 48-stündiger Induktion mit DOX exprimierten alle Klone 15-LOX-2 in unterschiedlichen Stärken. Dabei exprimierten Klon 2 und 11 nach der densitometrischen Analyse 15-LOX-2 am Stärksten. (B) Semi-quantitative Analyse der induzierten LOX-Expression normiert über β -Aktin.

4.2.3.1. Bestimmung der geeigneten DOX-Induktionsdosis

Zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit der DOX-induzierbaren 15-LOX-2-Expression wurden die Klone mit verschiedenen DOX-Konzentrationen von 0 – 2 μ g/ml für zwei Tage inkubiert und anschließend die jeweilige Proteinexpression durch Immunoblot-Analyse überprüft. In Abbildung 29 und Abbildung 30 sind repräsentativ die Ergebnisse der Induktionsversuche für beide Systeme dargestellt. Die Expression von 15-LOX-2 war ab einer Konzentration von 0,01 μ g/ml nachweisbar und erreichte beim Einsatz von 2 μ g/ml DOX das Maximum. Die densitometrische Auswertung des Western-Blots zeigte, dass eine DOX-Konzentration von 2 μ g/ml eine geringfügige Erhöhung der Expressionsstärke gegenüber 1 μ g/ml zur Folge hatte, so dass in allen weiteren Analysen diese Konzentration

zur Induktion des Systems gewählt wurde, um die maximale Expressionsstärke auszunutzen.

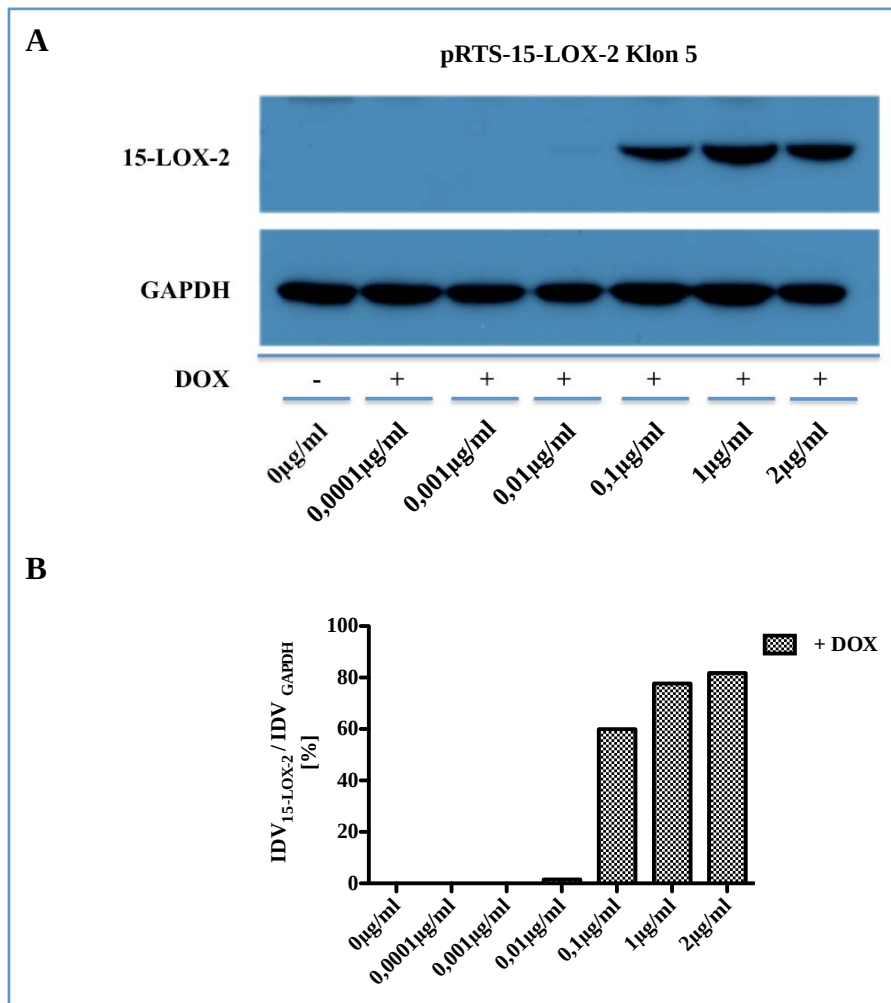


Abbildung 29: Bestimmung der Dosisabhängigkeit der 15-LOX-2-Expression. (A) Immunoblot-Analyse des DOX-induzierten pRTS-15-LOX-2 Klon: Nach 48-stündiger Induktion mit DOX erfolgte ab einer Konzentration von 0,01µg/ml eine Expression von 15-LOX-2 des pRTS-15-LOX2-Klons. (B) Densitometrische Analyse normiert über β -Aktin. Für die weiteren Versuchsreihen wurde eine Induktionskonzentration von 2 µg/ml festgelegt.

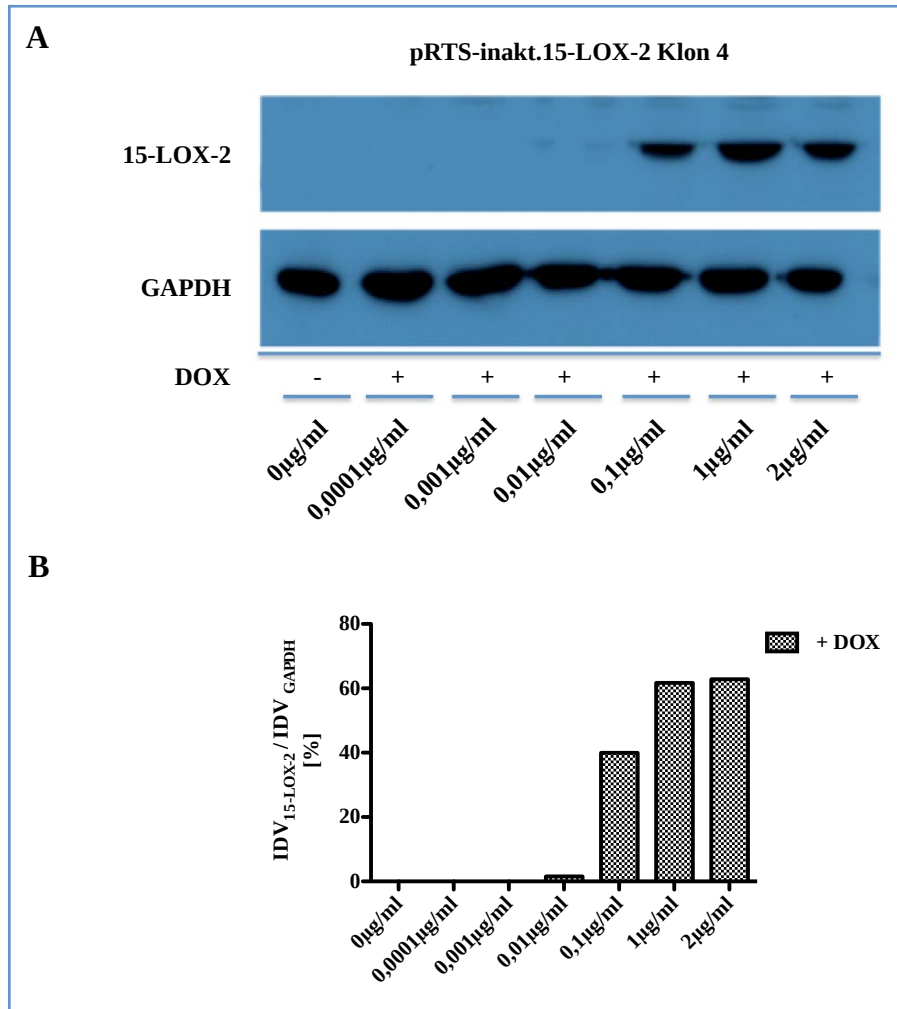


Abbildung 30: Bestimmung der Dosisabhängigkeit der 15-LOX-2-Expression. (A) Immunoblot-Analyse des DOX-induzierten pRTS-15-LOX-2 Klons: Nach 48-stündiger Induktion mit DOX erfolgte ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml eine Expression von 15-LOX-2 des pRTS-15-LOX2-Klons. (B) Densitometrische Analyse normiert über β -Aktin. Für die weiteren Versuchsreihen wurde eine Induktionskonzentration von 2 µg/ml festgelegt.

4.2.3.2. Zeitkinetik der DOX-induzierten LOX-Expression

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der induzierten Proteinexpression wurden die Doppeltransfektanten für mehrere Tage in Gegenwart von DOX bzw. ohne DOX kultiviert und die LOX-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten durch Western-Blot-Analyse bestimmt. In Abbildung 31 ist exemplarisch die DOX-abhängige 15-LOX-2-Expression in den zwei inaktiven Klonen des klassischen Systems dargestellt. Aufgrund der leichten basalen 15-LOX-2-Expression in den zwei inaktiven Klonen diente der pTR6-Repressorklon 10 als Negativkontrolle (siehe Abbildung 26). Bereits nach 24 h erreichte die Proteinexpression ein detektierbares Maximum und blieb über den

untersuchten Zeitraum konstant. Die densitometrische Analyse ergab für pTR6-inakt.15-LOX-2 Klon 4 eine ungefähr doppelt so starke Expression wie für pTR6-inakt.15-LOX-2 Klon 5.

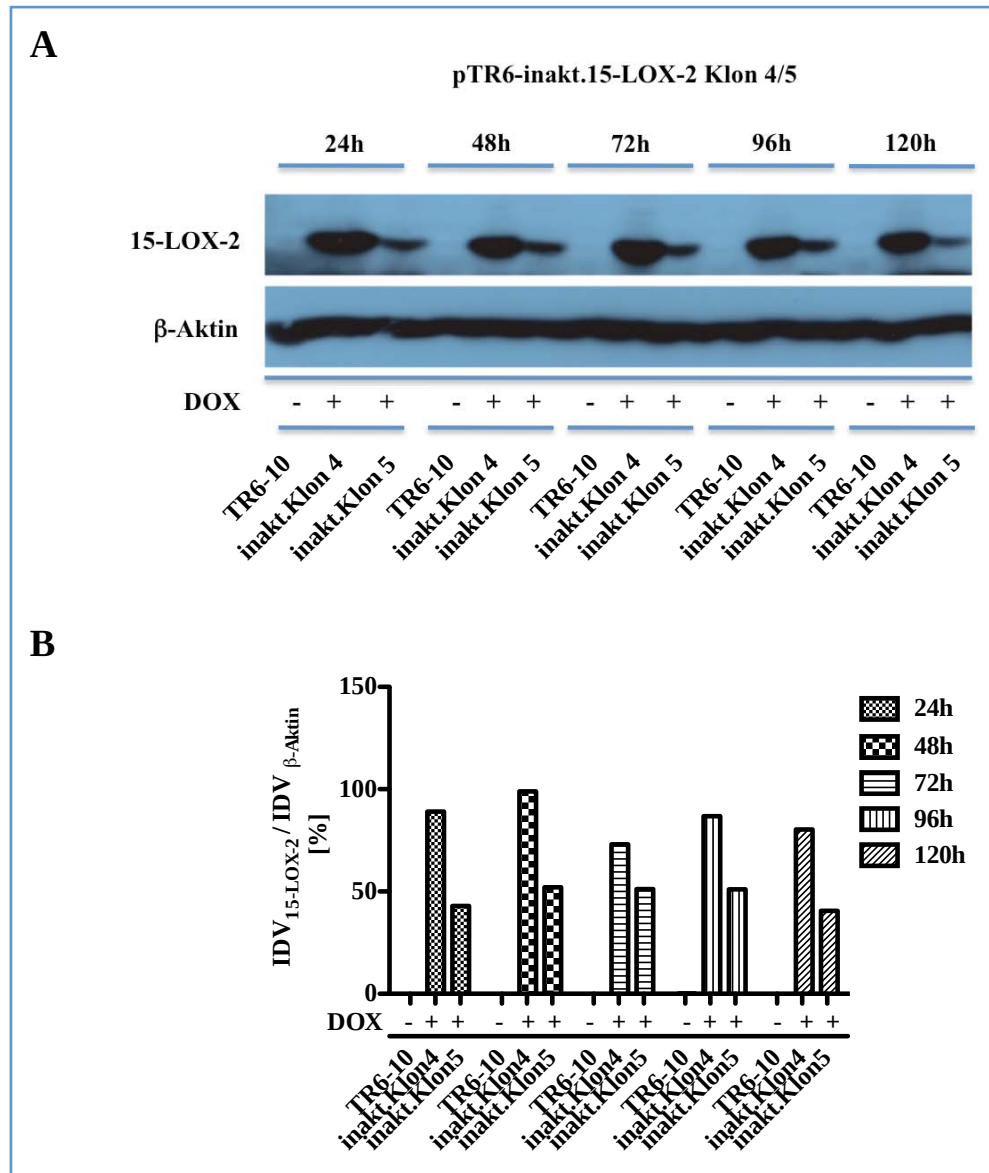


Abbildung 31: Immunoblot-Analyse der DOX-induzierten pTR6-inakt.15-LOX-2 Klone 4 und 5. (A) Die Klone wurden mit einer Zelldichte von 50000 Zellen/Well in Triplikaten in 6-Well Kulturschalen ausgesät und mit bzw. ohne DOX über fünf Tage inkubiert. Die Immunoblot-Analyse zeigt die zeitabhängige Expression von 15-LOX-2. Als Negativ-Kontrolle diente der TR6-10 Klon, da beide inaktiven 15-LOX-2 Klone eine leichte basale Expression aufwiesen. (B) Densitometrische Analyse normiert über β-Aktin.

Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die zeitabhängige Expression des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 und pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4 sowie die densitometrische Analyse normiert über GAPDH. Im Gegensatz zum klassischen System exprimierte das

pRTS-System 15-LOX-2 zeitlich leicht verzögert, jedoch mit vergleichbaren Intensitäten. Bei beiden Klonen konnte ein DOX-induzierter Anstieg der Signalstärke zwischen 24 h und 48 h bis zu einer Plateau-Phase ab 72 h beobachtet werden.

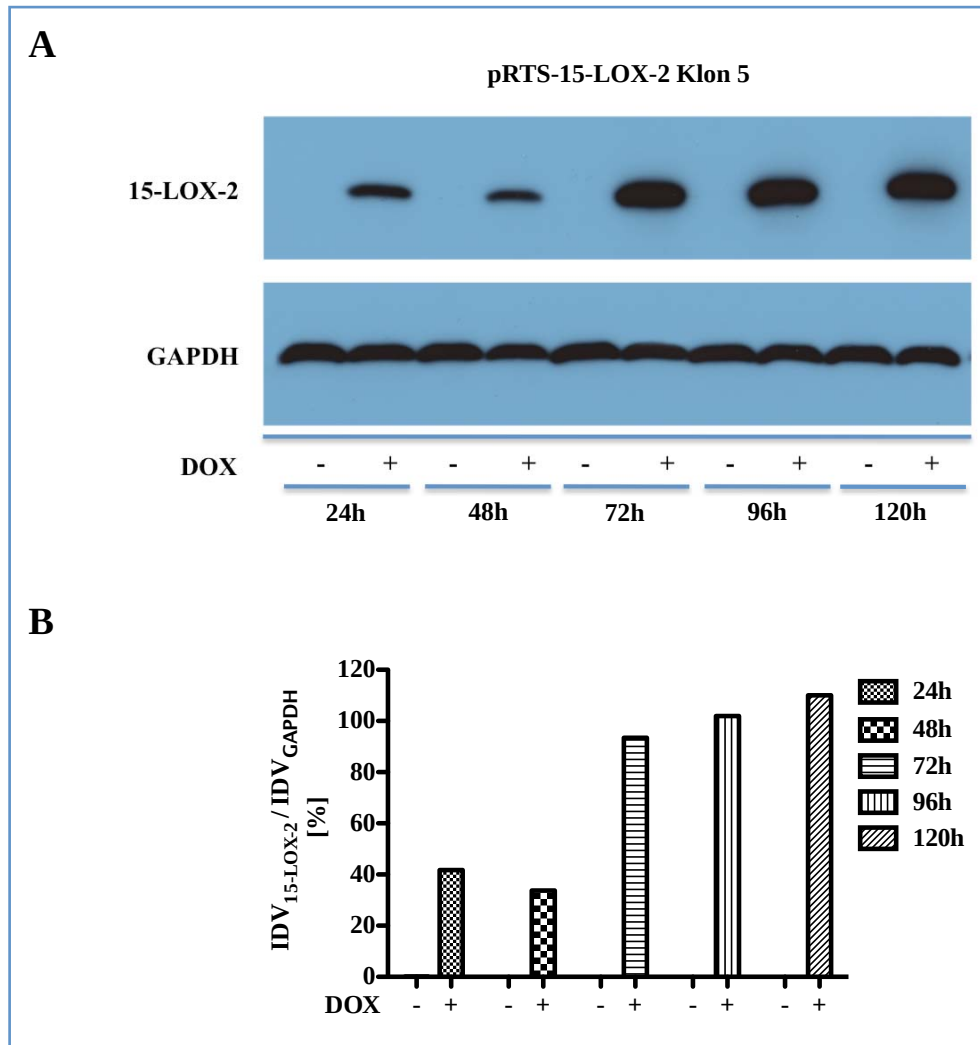


Abbildung 32: Zeitkinetik der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression im pRTS-System. (A) Immunoblot-Analyse des DOX-induzierten pRTS-15-LOX-2 Klon 5: Der Klon wurde mit einer Zelldichte von 50000 Zellen/Well in Triplikaten in 6-Well Kulturschalen ausgesät und mit bzw. ohne DOX über fünf Tage inkubiert. Die Immunoblot-Analyse zeigt die zeitabhängige Expression von 15-LOX-2. (B) Densitometrische Analyse normiert über GAPDH.

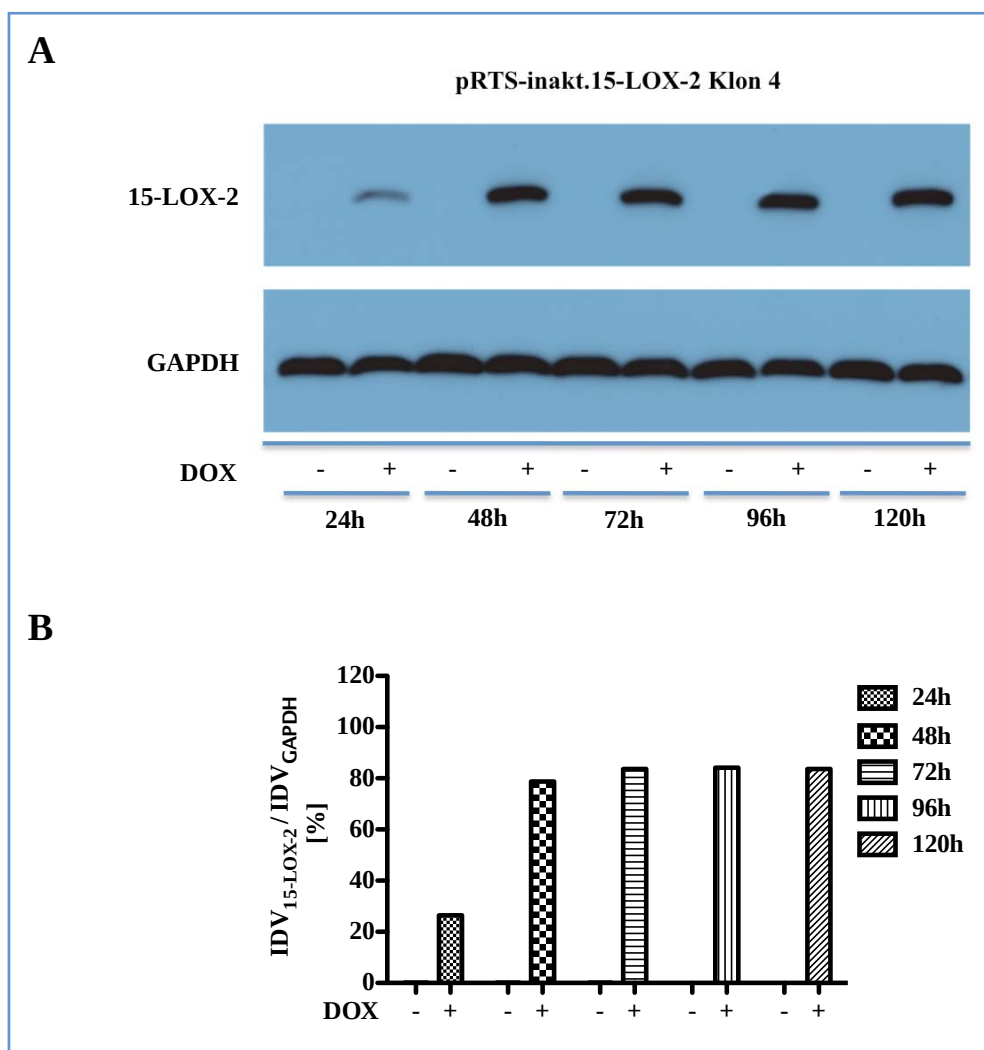


Abbildung 33: Zeitkinetik der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression im pRTS-System. (A) Immunoblot-Analyse des DOX-induzierten pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4: Der Klon wurde mit einer Zelldichte von 50000 Zellen/Well in Triplikaten in 6-Well Kulturschalen ausgesät und mit bzw. ohne DOX über fünf Tage inkubiert. Die Immunoblot-Analyse zeigt die zeitabhängige Expression von 15-LOX-2. (B) Densitometrische Analyse normiert über GAPDH.

4.2.3.3. Enzymatische Aktivität der 15-LOX-2-exprimierenden Panc1 Klone

Zum Nachweis der katalytischen Aktivität von 15-LOX-2 wurden die Proteinextrakte der Klone bei 37°C mit Arachidonsäure inkubiert und nach Reduktion sowie Lipidextraktion die Produkte durch RP-HPLC analysiert. Als interner Standard wurde eine 1:1 Mischung aus 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE verwendet. Als Positivkontrolle diente das Proteinlysate einer transienten Transfektion des 15-LOX-2-Expressionsplasmids in HEK

293 Zellen. Die Proteinextrakte des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 5 metabolisierten die zugesetzte Arachidonsäure zu 15-HETE (Abbildung 34 unten links blauer Pfeil), während die nicht-induzierten Zellklone keine Bildung von 15-HETE zeigten. Bei Inkubation der Proteinextrakte aus Zellen der inaktiven 15-LOX-2-Mutanten konnte erwartungsgemäß ebenfalls keine Metabolisierung der Arachidonsäure nachgewiesen werden.

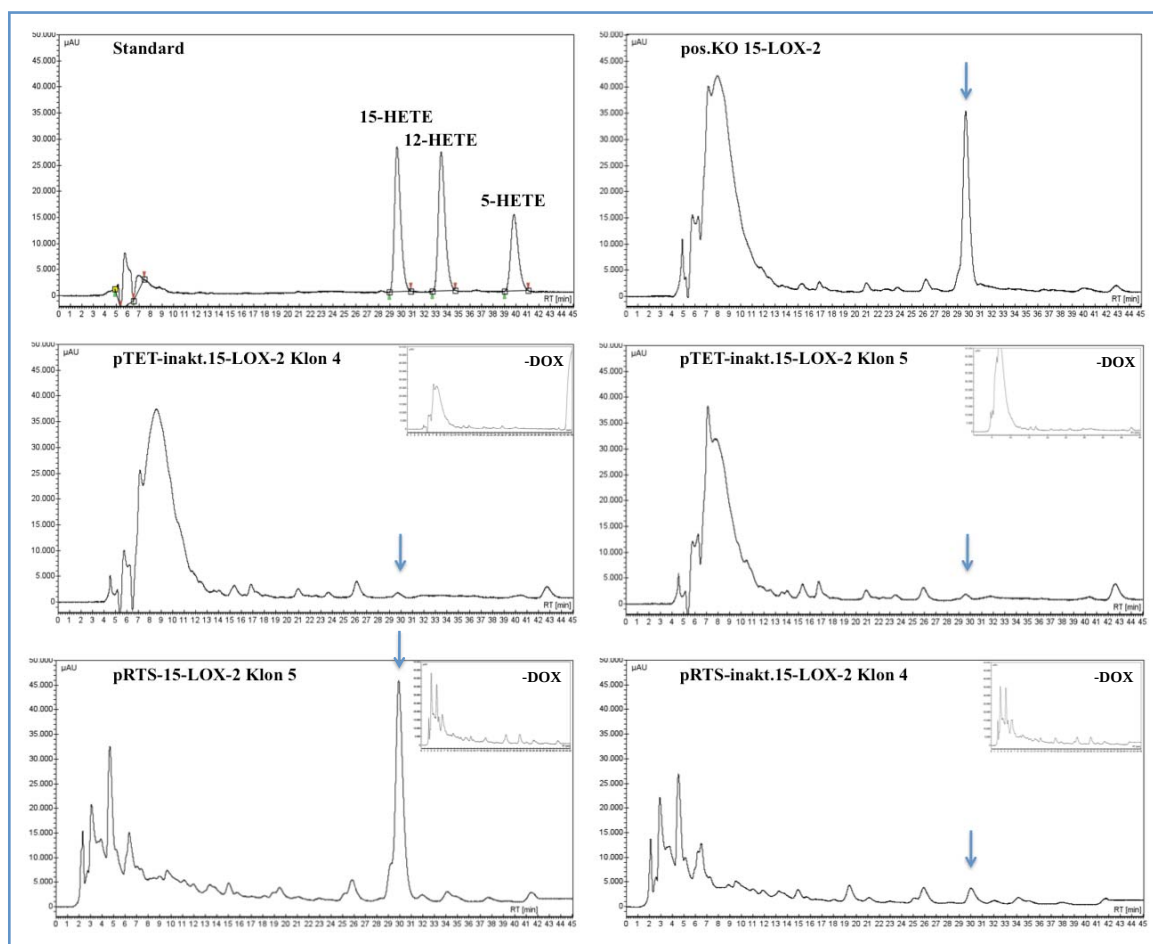


Abbildung 34: HPLC-Analyse der Produkte der DOX-induzierbaren 15-LOX-TET-ON-Expressionsklone. Die Proteinlysate der zellulären Klone beider Systeme wurden mit Arachidonsäure inkubiert und die LOX-Produkte mittels RP-HPLC mit einer YMC-Pack ODS-AM (C₁₈ endcapped) Säule und dem isokratischen Laufmittelsystem (MeOH:H₂O:AcOH = 82:18:0,01) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min analysiert. Als Standard dienten die aufgereinigten Metaboliten 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE (Cayman Chemicals). Die blauen Pfeile zeigen die Elutionszeiten von 15-HETE an, welche mit dem Standard korrelieren. Als Positivkontrolle diente das Proteinlysate einer transienten Transfektion in HEK 293 Zellen mit 15-LOX-2-Expressionsplasmid. 15-HETE-Produktion war nur in Extrakten des pRTS-15-LOX-2 Klon 5 nachweisbar. Die Elutionsprofile der inaktiven Klone pTET-inakt.15-LOX-2 Klon 4/ 5 und pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 gleichen denen der Negativkontrollen. Die minimalen 15-HETE-Mengen dieser Extrakte sind vermutlich auf Autoxidation von Arachidonsäure zurückzuführen und wurden als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet.

Die *in vitro* Aktivität der DOX-induzierten 15-LOX-2 in den Panc1 Klonen wurde mit Hilfe des spezifischen 15S-HETE-Immunsorb-Assays bestimmt. Die quantitative Analyse des Arachidonsäuremetaboliten 15S-HETE erfolgte aus Zellkulturüberständen von

DOX-induzierten zellulären pRTS-(inakt.)-15-LOX-2 Klonen. Wie Abbildung 35 zeigt, konnte nach 24-stündiger Induktion mit DOX im Zellkulturüberstand des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 5 4 ng/ml_{Medium} 15S-HETE detektiert werden. 15S-HETE akkumulierte 72 h im Medium zu einer Endkonzentration von 92,6 ng/ml_{Medium}. Aufgrund eines Mediumwechsels nach 72 h fiel die Konzentration von 15S-HETE ab und erreichte nach weiterem 48-stündigen Zellmetabolismus eine erneute Endkonzentration von 81 ng/ml_{Medium} (120h Zeitwert). Der pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 zeigte dagegen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Konzentrationsanstieg an 15S-HETE, was erneut die enzymatische Inaktivität des Klon bestätigt.

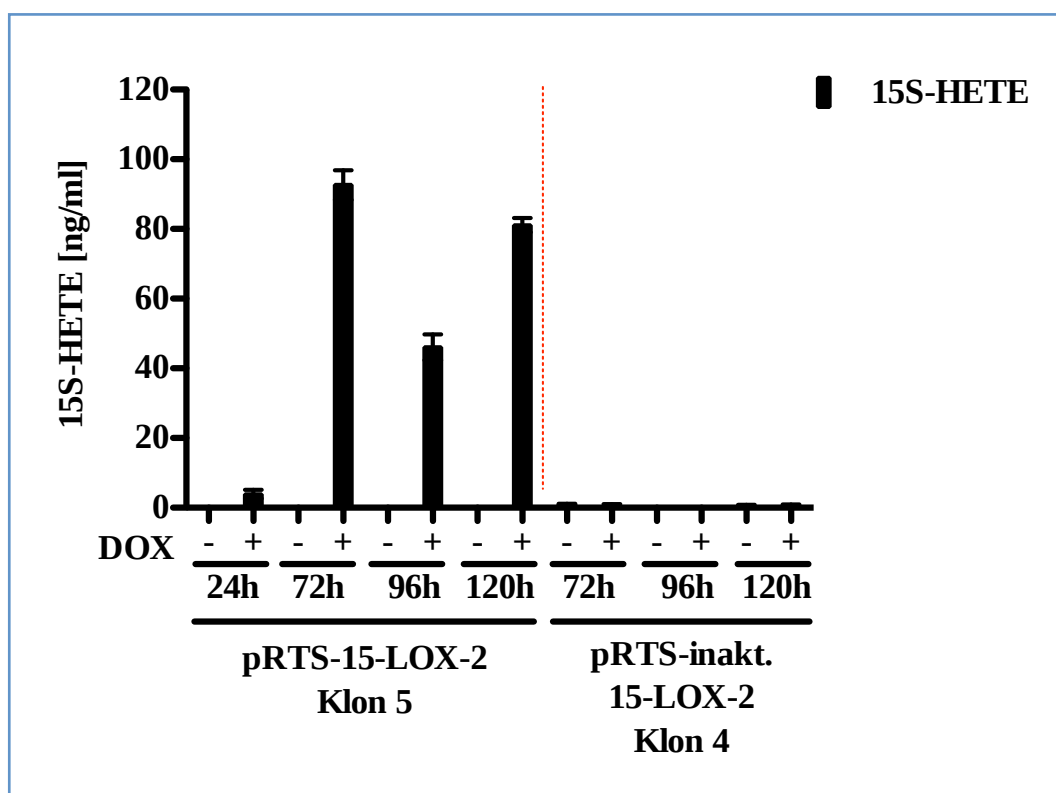


Abbildung 35: Immunosorb-Assay für die Bestimmung von 15S-HETE im Kulturüberstand der DOX-induzierten zellulären Klone. Die zellulären Klone pRTS-15-LOX-2 Klon 5 und pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 wurden in Triplikaten in 6-Well Kulturschalen mit einer Zellzahl von 50000 Zellen/Well ausgesät und am Folgetag mit DOX induziert. Der Zellkulturüberstand der Triplikate wurde von jedem Zeitwert vereint und 50 µl des 6 ml Gesamtvolumens für den ELISA eingesetzt. Die Analyse erfolgte in 3-fach Bestimmung. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SEM eines repräsentativen Versuchs aus drei separaten Analysen. Im aktiven Klon konnte zu den gemessenen Zeitpunkten sezernierte 15S-HETE detektiert werden, während im inaktiven Klon keine 15S-HETE nachgewiesen werden konnte.

4.2.3.4. Intrazelluläre Lokalisation der 15-LOX-2-Expression in den Panc1 Klonen

Die immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit hatten gezeigt, dass für 15-LOX-2 neben einer vorwiegend zytoplasmatischen Lokalisation im gesunden Pankreasgewebe in einzelnen Tumorzellen von Pankreastumor-Gewebsschnitten auch eine Expression im Zellkern nachweisbar war. Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte die Detektion der intrazellulären Verteilung von 15-LOX-2 in den Panc1 Klonen. Abbildung 36 A zeigt, dass ohne DOX-Induktion keine Expression von 15-LOX-2 nachweisbar war. Nach 4-stündiger Induktion des 15-LOX-2-TET-ON-Systems konnte eine schwache 15-LOX-2-Expression ausschließlich im Zytoplasma detektiert werden (B). Zur Verifizierung der zytoplasmatischen Lokalisation wurde eine Querschnittsaufnahme des Kerns angefertigt (C). Nach acht-stündiger Inkubation mit DOX konnte eine schwache aber flächendeckende 15-LOX-2-Färbung des Zytoplasmas beobachtet werden (D). Die Färbung war perinukleär stärker als im Zytoplasma. Die Z-Achsenaufnahme zeigte zusätzlich eine schwache Färbung des Nukleus. Die erneute photographische Aufnahme der Zelle nach dieser zeitintensiven Querschnittsaufnahme bestätigte anhand der ausgeblichenen Areale die korrekte Schnittebene durch den Kern (F). Nach 12-stündiger Induktion mit DOX zeigte sich eine starke Färbung des Zytoplasmas (G), aber auch im Querschnitt des Kerns (H). Das Fluoreszenzsignal-Muster in Abbildung 36 I ähnelt dem von Strukturproteinen der Zelle. Jedoch konnten in weiteren Immunfluoreszenzanalysen die Strukturproteine β -Aktin und γ -Tubulin als mögliche Koloalisationspartner von 15-LOX-2 ausgeschlossen werden.

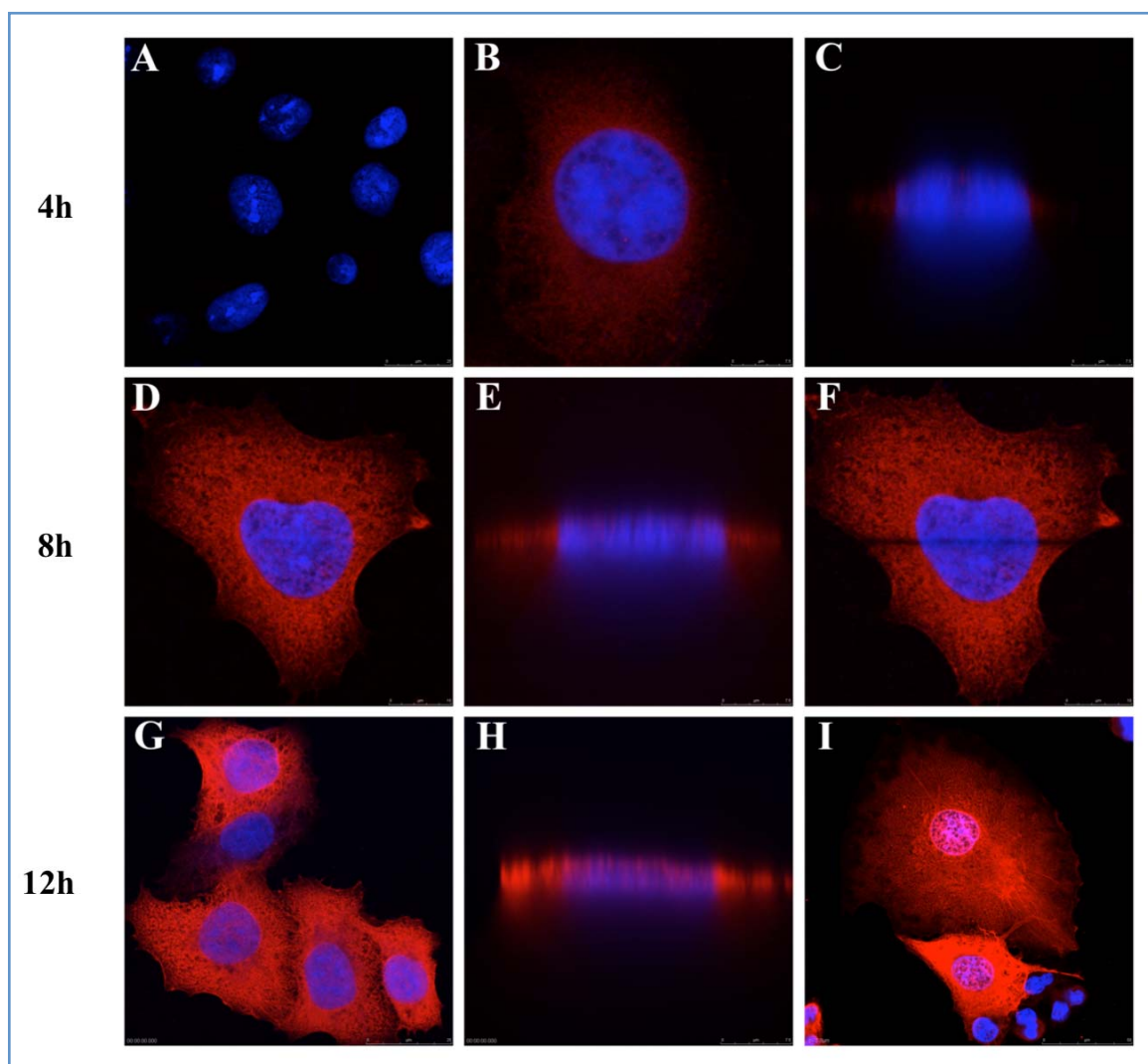


Abbildung 36: Immunlokalisation von 15-LOX-2 in den Zellen des pRTS-15-LOX-2 Klons 5. Die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von 15-LOX-2 wurde mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Die Lokalisation von 15-LOX-2 ist als rotes Cy3-Fluoreszenzsignal zu erkennen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst Farbstoff blau angefärbt. Während ohne DOX keine Expression von 15-LOX-2 nachweisbar war (A), konnte nach 4 Stunden eine schwache zytoplasmatische 15-LOX-2-Expression detektiert werden (B). Die Querschnittaufnahme des Kerns zeigte keine 15-LOX-2-Färbung (C). Nach acht-stündiger Inkubation mit DOX konnte eine schwache aber flächendeckende Färbung des Zytoplasmas detektiert werden (D). Die Färbung war perinukleär prominenter als im Zytoplasma. (E) Die Z-Achsenaufnahme zeigt deutlich eine schwache Färbung des Nukleus für 15-LOX-2. (F) Die erneute Aufnahme der Zelle nach dieser zeitintensiven Querschnittaufnahme bestätigte durch die ausgeblichenen Fluoreszenzfarbstoffe des Areal die korrekte Schnittebene der Kernaufnahme. (G) Nach 12-stündiger Induktion mit DOX zeigte sich eine starke Färbung des Zytoplasmas aber auch im Querschnitt (H) des Kerns. Das Fluoreszenzsignal-Muster in Abbildung I könnte auf eine Kolokalisation von 15-LOX-2 mit Strukturproteinen der Zelle im Zytoplasma hinweisen. Vergrößerung x 630 mit 5-fachem Zoom mittels des konfokalen Lasermikroskops Leica SP5.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Analyse wurden im Folgenden durch biochemische Zellfraktionierung bestätigt. Hierzu wurden Proteinlysate des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 in nukleäre und zytosolische Fraktionen aufgereinigt und mittels Immunodetektion die intrazelluläre Verteilung der 15-LOX-2-Expression untersucht (Abbildung 37). Zur Kontrolle der erfolgreichen Trennung der beiden Zellfraktionen

(zytoplasmatisch/nukleär) wurde die Expression des zytosolischen Proteins Laktatdehydrogenase (LDH) detektiert, die wie in Abbildung 37 gezeigt, ausschließlich in den zytoplasmatischen Fraktionen nachweisbar war. In Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Analysen ließ sich eine frühe 15-LOX-2-Expression ab vier Stunden nach Induktion zuerst im Zytoplasma und dann ab acht Stunden etwas schwächer auch in der Kernfraktion nachweisen.

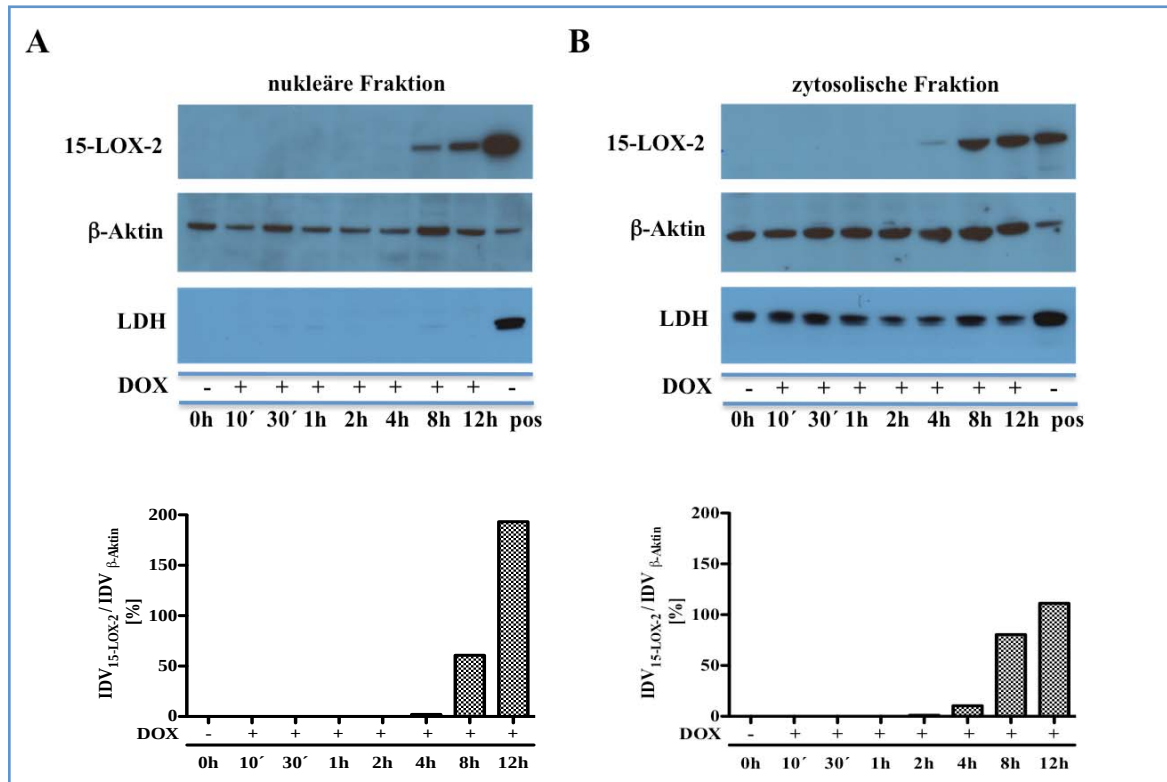


Abbildung 37: Immunoblot von 15-LOX-2 mit aufgereinigten nukleären und zytoplasmatischen Proteinfractionen von DOX-induzierten Proteinlysaten des pRTS-15-LOX-2 Klon 5. Die Zellen wurden über die untersuchten Zeiträume mit DOX inkubiert und die gewonnenen Proteinlysate über das Nuclear-Extract-Kit der Firma Active Motif aufgereinigt. Die beiden aufgereinigten Fraktionen wurden für die Immunodetektion für 15-LOX-2 eingesetzt. (A) Eine nukleäre Lokalisation von 15-LOX-2 in den Lysaten des pRTS-15-LOX-2 Klon 5 konnte erst nach 8-stündiger Inkubation mit DOX beobachtet werden. Die densitometrische Analyse, normiert über β -Aktin, zeigt über den gewählten Zeitraum den relativen Anstieg der 15-LOX-2-Expression in den Zellkernen. (B) In den zytoplasmatischen Fraktionen der Proteinlysate konnte eine Detektion von 15-LOX-2 schon nach vierstündiger Induktion mit DOX erfolgen. Die densitometrische Analyse zeigt die Zunahme der Expression im Zeitverlauf.

4.2.4. Einfluss der 15-LOX-2-Expression auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1

Die ersten Versuche zur funktionellen Analyse des 15-LOX-2-Gens in den Pankreaskarzinomzellen wurden mit Hilfe des klassischen TET-ON-Systems durchgeführt. Mit fortschreitender Passagenzahl stellte sich jedoch heraus, dass die 15-LOX-2-vermittelten Effekte rasch abnahmen und die Induzierbarkeit des kompletten Systems in allen Klonen stark zurück und schlussendlich verloren ging. Mit Hilfe des pRTS-Vektor-Systems wurden die Ergebnisse, welche mit dem klassischen System gewonnen wurden, verifiziert und die Analysen fortgeführt. Als Kontrollen dienten beim pRTS-Vektor-System jeweils die nicht induzierten Klone und beim klassischen System der Repressorklon pTR6-10. Zusätzlich wurden vergleichende Analysen der Mutterzelllinie Panc1 und der Vektor-Kontrollzelllinie pRTS-1 (ohne LOX-Insert) durchgeführt, um den Einfluss von DOX bzw. den systemischen Einfluss des TET-ON-Systems zu evaluieren. Alle Versuche wurden mit TET-freiem Medium durchgeführt, um die basale Leckexpression gering zu halten. Während der Analysen fand alle 72 h zur Erneuerung der entsprechenden Zusätze ein Mediumwechsel statt.

Abbildung 38 stellt die Wachstumsanalysen der Negativkontrollen Panc1 und pRTS-1 dar. Die Behandlung mit DOX hatte keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 38 A). Vergleichbare Ergebnisse zeigten die Negativkontrollen des pRTS-1-Systems (Klon 3, 4, 10 und 15). Dargestellt ist exemplarisch die Wachstumsanalyse des pRTS-1-Klons 3 (Abbildung 38 B). Zusammenfassend ergaben alle durchgeführten Kontroll-Experimente, dass die Behandlung mit DOX alleine über den gesamten Analysezeitraum keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen ausübte.

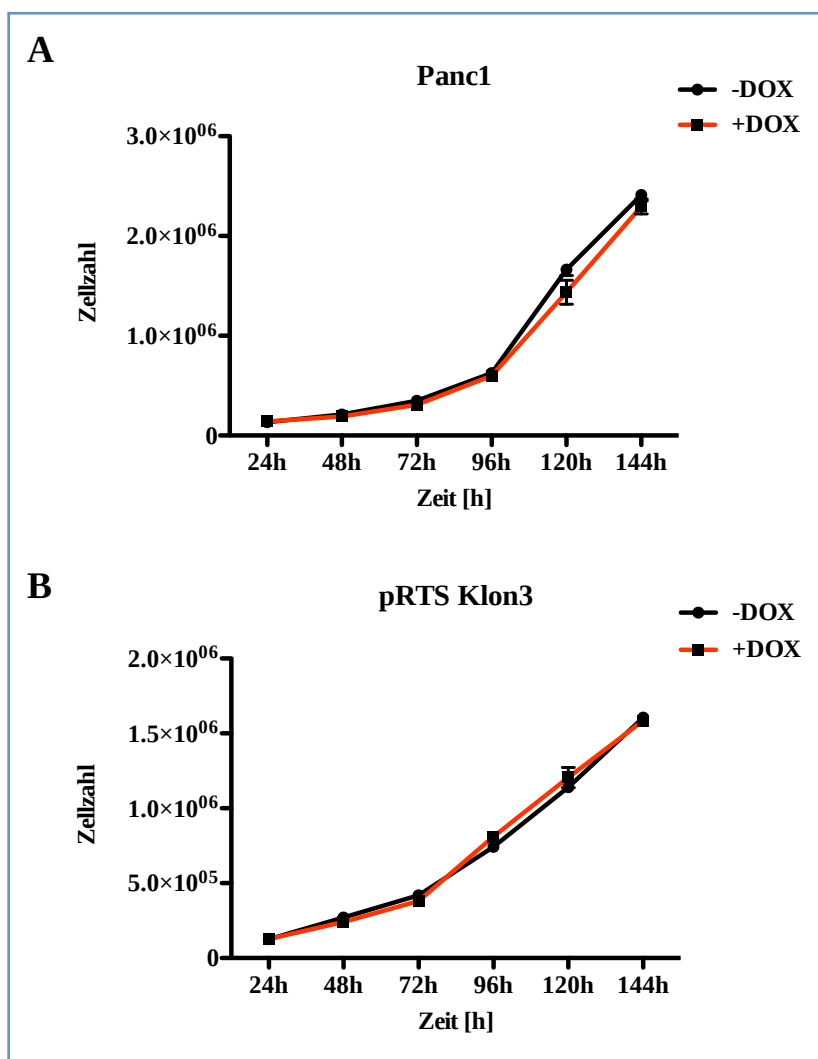


Abbildung 38: Einfluss von DOX auf das Wachstum von Panc1 Kontrollzelllinien. Die Zellen wurden in Triplikaten mit einer Zellzahl von 50000 Zellen/Well in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Am Folgetag erfolgte der Mediumwechsel mit bzw. ohne DOX. Im Abstand von 24 h wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl mittels Guava-PCA-System bestimmt. Die Anwesenheit von DOX zeigte keinen Effekt auf das Wachstum der beiden Negativkontrollen Panc1 (A) und pRTS-Klon 3 (B).

4.2.4.1. Hemmung der Zellproliferation in Panc1 durch Expression von 15-LOX-2

Zur Analyse der 15-LOX-2-vermittelten zellulären Effekte in Panc1 Zellen wurden die etablierten stabilen Zellklone beider Systeme in An- bzw. Abwesenheit von DOX kultiviert. Das Zellwachstum wurde anhand von Zellzahlbestimmungen und Proliferationsanalysen mit dem WST-1-Test untersucht. In Abbildung 39 sind die Wachstumsanalysen des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 und des pRTS-inakt.15LOX-2 Klons 4

dargestellt. Die Wachstumskurven beider Klone zeigen nach DOX-Induktion eine signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den nicht induzierten Kontrollen. Im Folgenden sind alle Wachstumsanalysen als prozentuale Hemmung in Abhängigkeit zu den nicht induzierten Kontrollen dargestellt. Die prozentuale Darstellung ermöglicht aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten einzelner Klone einen besseren Vergleich untereinander.

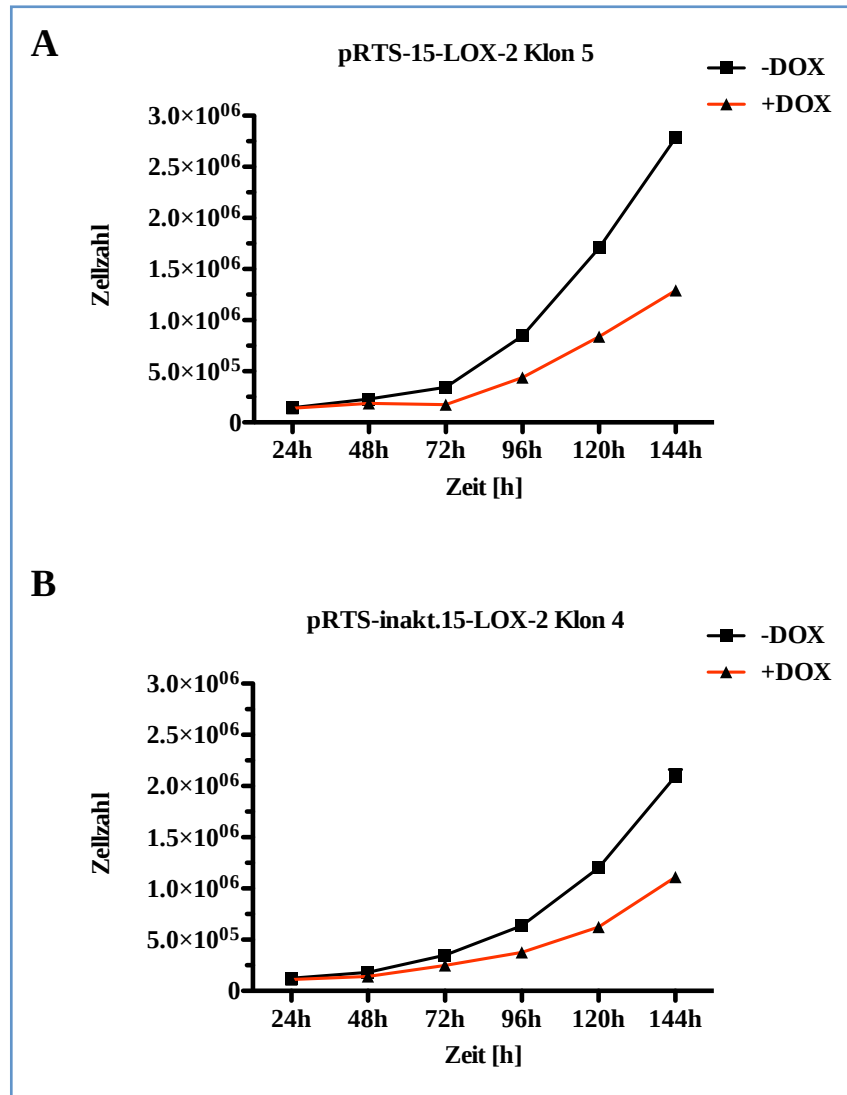


Abbildung 39: Wachstumsanalyse der DOX-behandelten pRTS-Klone pRTS-15-LOX-2 Klon 5 (A) und pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 (B). Die Zellen wurden in Triplikaten mit einer Zellzahl von 50000 Zellen/Well in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Am Folgetag erfolgte der Mediumwechsel mit bzw. ohne DOX. Im Abstand von 24 h wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl mittels Guava-PCA-System bestimmt. Die Induktion mit DOX führte bei beiden Klonen im zeitlichen Verlauf ab 72 h zu einer signifikanten Wachstumshemmung.

Bei allen 15-LOX-2 exprimierenden Klonen, auch bei denen, welche die inaktive Enzymvariante exprimierten, führte die DOX-Induktion zu einer signifikanten Wachstumshemmung. Wie in Abbildung 40 dargestellt, konnten mit den inaktiven Klonen des klassischen TET-ON-Systems eine signifikante Wachstumshemmung bereits nach 24 h Induktion mit DOX erzielt werden, welche über den weiteren Verlauf bis 120 h geringfügig anstieg. Die Hemmung betrug während dieser Zeiträume für Klon 4 zwischen 45 und 72 %, für Klon 5 zwischen 40-60 %. Die Unterschiede in der Wachstumshemmung können auf die unterschiedliche Expressionsstärke der beiden Klone zurückgeführt werden, die bei pTR6-inakt.15-LOX-2 Klon 4 fast doppelt so groß war wie bei pTR6-10-inakt.15-LOX-2 Klon 5 (vgl. Abbildung 31).

Die Klone des pRTS-Vektor-Systems wiesen alle ein zeitverzögertes Ansprechverhalten auf die Induktion der 15-LOX-2-Expression auf, was jedoch mit der späteren Proteinexpression im pRTS-System im Vergleich zum klassischen pTR6-System korrelierte (vgl. Abbildung 31 bis Abbildung 33). Der pRTS-15-LOX-2 Klon 5 reagierte auf die Induktion mit DOX mit einer Wachstumshemmung in den ersten 48h um 16 %, während über den weiteren Verlauf eine Hemmung von 50 % erreicht wurde. Die Stärke der DOX-induzierten Wachstumshemmung in den unterschiedlichen pRTS-Klonen korrelierte ebenfalls, analog zu den Klonen des klassischen Systems, mit der Expressionsstärke von 15-LOX-2. Die pRTS-15-LOX-2 Klone 6 und 11 wiesen eine zeitlich stärker verzögerte und schwächere Wachstumshemmung auf, die maximal 30 % (Klon 11) bzw. 50 % (Klon 6) erreichte, wobei sich bei Klon 11 eine schwache Hemmung von 20 % erst ab 72 h nach Induktion abzeichnete (Abbildung 40). Der inaktive pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 zeigte im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle einen kontinuierlichen Anstieg der Hemmung auf durchschnittliche 37 % nach 120 h. Die Ergebnisse dieser Wachstumsanalysen zeigten, dass die Expression der enzymatisch inaktiven 15-LOX-2-Mutante in den Panc1 Zellen ein ähnliches Ausmaß an Wachstumshemmung verursachte wie die Expression des aktiven Enzyms. Die Stärke der Hemmung zu den jeweiligen Zeitpunkten korrelierte mit der Expressionsstärke des DOX-induzierten Transgens in den unterschiedlichen Klonen und war unabhängig von der enzymatischen Aktivität des exprimierten Proteins. Zell-Proliferationsmessungen bei den verschiedenen Klonen mit dem WST-1-Assay führten zu vergleichbaren Ergebnissen (siehe Abbildung 41).

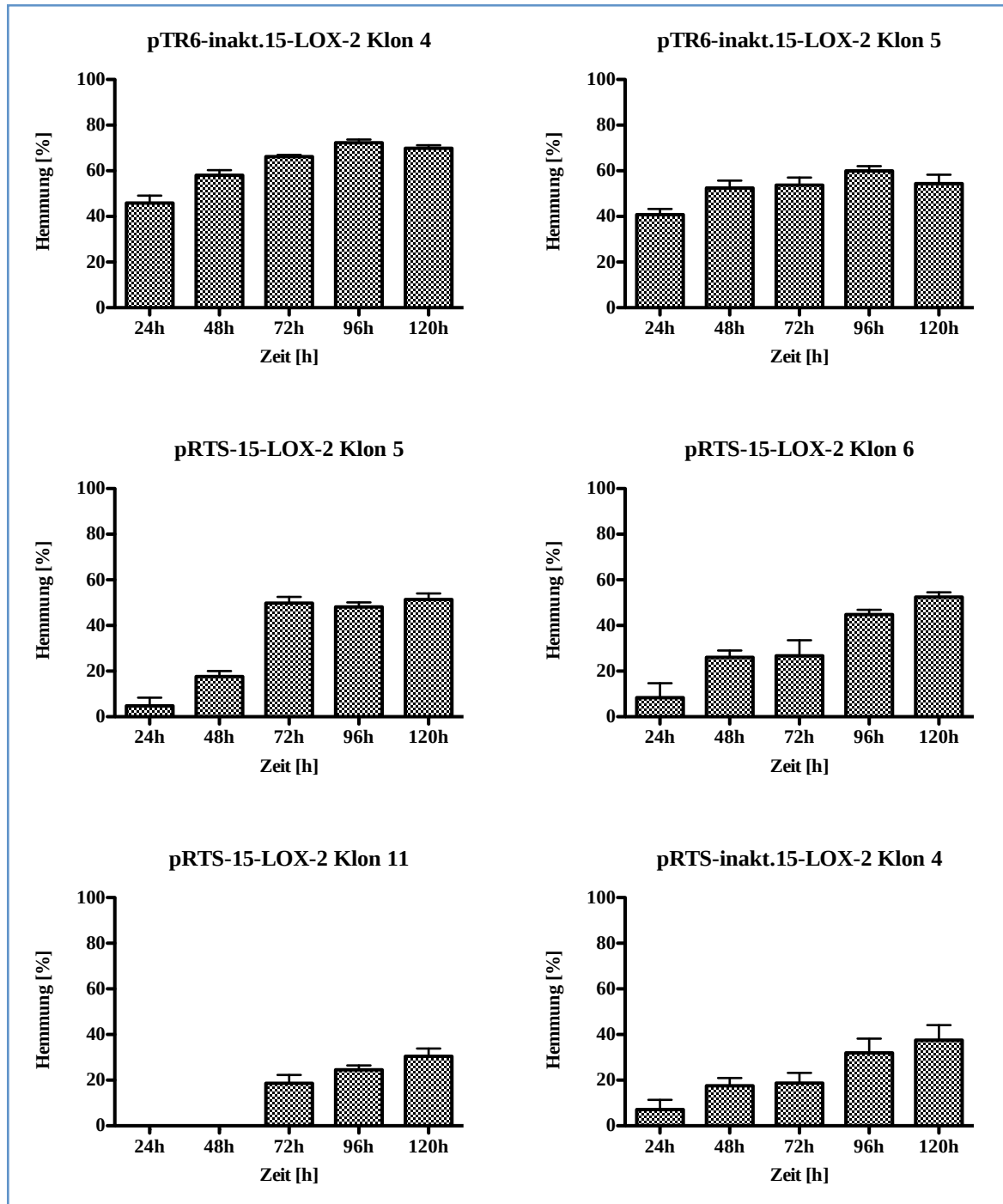


Abbildung 40: Wachstumshemmung der Klone beider TET-ON-Systeme nach Induktion von 15-LOX-2. Die prozentuale Wachstumshemmung errechnet sich aus der reduzierten Zellzahl der induzierten Klone im Vergleich zu ihren nicht induzierten Kontrollen.

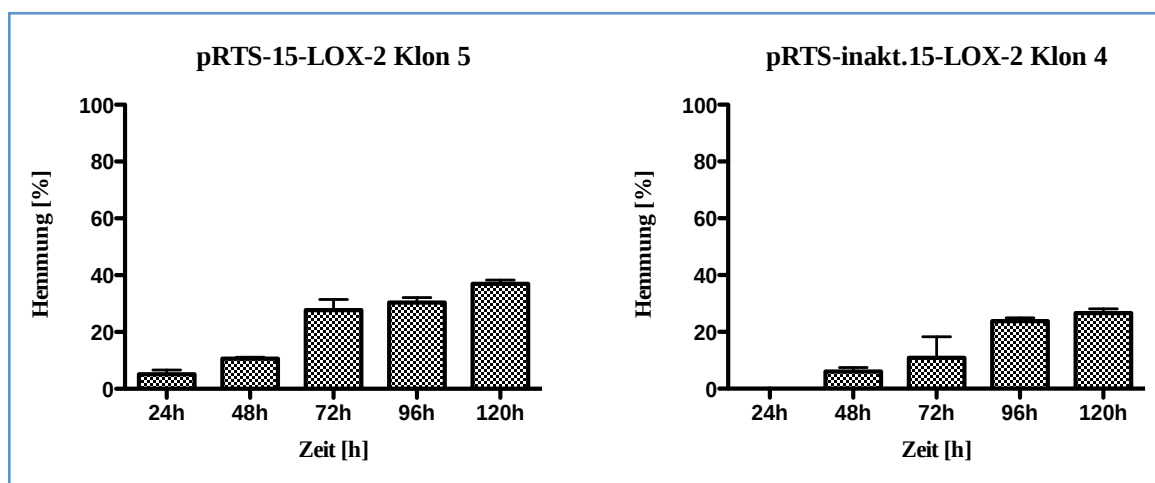


Abbildung 41: Proliferationsanalyse mit WST-1 Assay für den aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon5 und den inaktiven pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon4. Die Zellen wurden zu den festgelegten Zeitpunkten nach Zugabe von 10 µl WST-1 Reagenz für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend der Farbumschlag des WST-1 Reagenz im Medium am Elisareader bei 450nm vermessen. Die prozentuale Hemmung der Proliferation errechnet sich aus dem Verhältnis des Farbumschlags der induzierten zu den nicht induzierten Klonen. Der aktive Klon 5 zeigte über den zeitlichen Verlauf eine Proliferationshemmung von bis zu 40 %, während der inaktive Klon 4 eine Proliferationshemmung von bis zu 30 % aufwies.

4.2.4.2. Einfluss des 15-LOX-2-Metaboliten 15S-HETE auf das Zellwachstums

Die Ergebnisse der unter 4.2.4.1 beschriebenen Analysen zeigten, dass die wachstumshemmenden Effekte von 15-LOX-2 unabhängig von der enzymatischen Aktivität waren, und die alleinige Präsenz des 15-LOX-2-Proteins die beobachteten Effekte bedingte. Bei vergleichbarer Expressionsstärke induzierte die aktive Form der 15-LOX-2 eine etwas stärkere Hemmung als die inaktive Variante, was auf zusätzliche, durch die Enzymaktivität hervorgerufene, wachstumshemmende Effekte hindeutete.

Das Enzym 15-LOX-2 setzt Arachidonsäure zu 15S-HETE und in sehr geringen Mengen Linolsäure zu 13S-HODE um [81]. Aufgrund von vorangegangenen Analysen konnte ein Effekt von 13S-HODE, dem zweiten Metaboliten von 15-LOX-2, ausgeschlossen werden [120]. Ob und in welchem Ausmaß sich das durch die inaktive 15-LOX-2-Variante bereits inhibierte Zellwachstum zusätzlich durch LOX-Metabolite beeinflussen lässt, wurde durch Zugabe von externer 15S-HETE untersucht. Hierzu wurden Zellen des pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 in An- bzw. Abwesenheit von DOX exogen mit 15S-HETE behandelt. Die benötigte Konzentration an 15S-HETE für die Behandlung der Zellen wurde aus Vorversuchen übernommen (Daten nicht gezeigt) [120].

Wie in Abbildung 42 dargestellt, führte die exogene Zugabe von 1 μ M 15S-HETE nach 120 h zu einer signifikant erhöhten Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zu den DOX-induzierten Kontrollen. Dies zeigte, dass der inaktive pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 durch eine simulierte katalytische Aktivität mittels exogener Zugabe von 15S-HETE ein höheres wachstumshemmendes Potential aufwies als die unbehandelte Kontrolle.

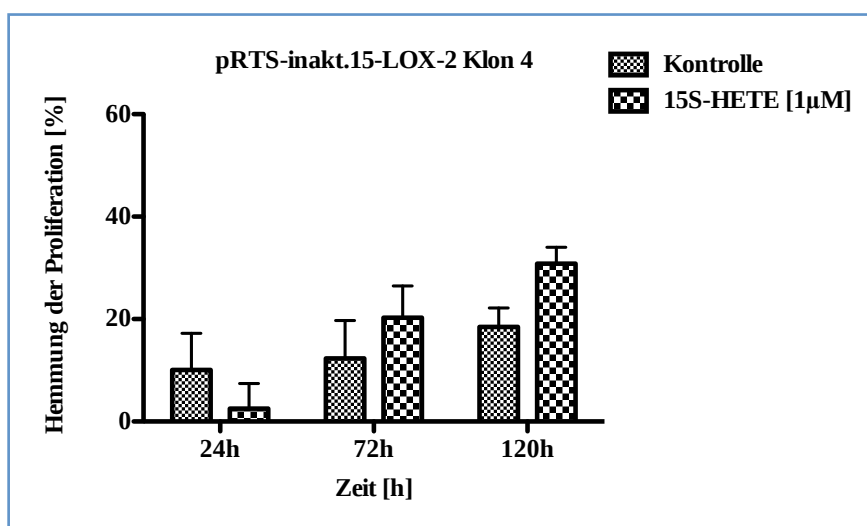


Abbildung 42: Additiver wachstumshemmender Effekt von 15S-HETE in 15-LOX-2-exprimierenden Panc1 Zellen. Die Zellen wurden in Triplikaten mit einer Zellzahl von 50000 Zellen/Well in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und in An- und Abwesenheit von DOX und 1 μ M 15S-HETE inkubiert. Die Zellen wurden zu den festgelegten Zeitwerten trypsiniert und mit dem Guava-PCA-System die Zellzahl bestimmt. Die prozentuale Wachstumshemmung errechnet sich aus der reduzierten Zellzahl der induzierten Klone im Vergleich zu ihren nicht induzierten Kontrollen mit den jeweils entsprechenden Behandlungen von 15S-HETE (Student's t-TEST: $p < 0,05$).

Zur weiteren Charakterisierung der durch die Enzymaktivität verursachten Effekte in den Panc1 Zellen wurde die 15-LOX-2-vermittelte Wachstumshemmung unter gleichzeitiger Ausschaltung der Enzymaktivität durch einen Lipoxygenaseinhibitor untersucht.

Hierzu wurde der aktive pRTS-15-LOX-2 Klon 5 in An- bzw. Abwesenheit des LOX-Inhibitors Nordihydroguajaretsäure (NDGA) mit DOX induziert und das Wachstum der Zellen durch Zellzahlbestimmung gemessen. Die Expression von 15-LOX-2 wurde mittels Immunoblot-Analyse verifiziert und die enzymatische Aktivität des Enzyms wurde durch Messung des 15S-HETE-Gehalts im Zellkulturüberstand via Immunosorb-Assay bestimmt. In Abbildung 43 ist exemplarisch die ELISA-Analyse und der entsprechende Immunoblot einer 120-stündigen Induktion des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klons 5 mit DOX und Behandlung mit 10 μ M NDGA dargestellt. Die NDGA Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Stärke der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression, führte aber zu einer

effektiven Enzymhemmung. Im Medium des DOX-induzierten Klon konnte nach 120h eine 15S-HETE Konzentration von 80 ng/ml Medium nachgewiesen werden. Die NDGA Behandlung bedingte eine Reduktion des 15S-HETE-Gehaltes im Kulturüberstand auf 0,7 ng/ml Medium.

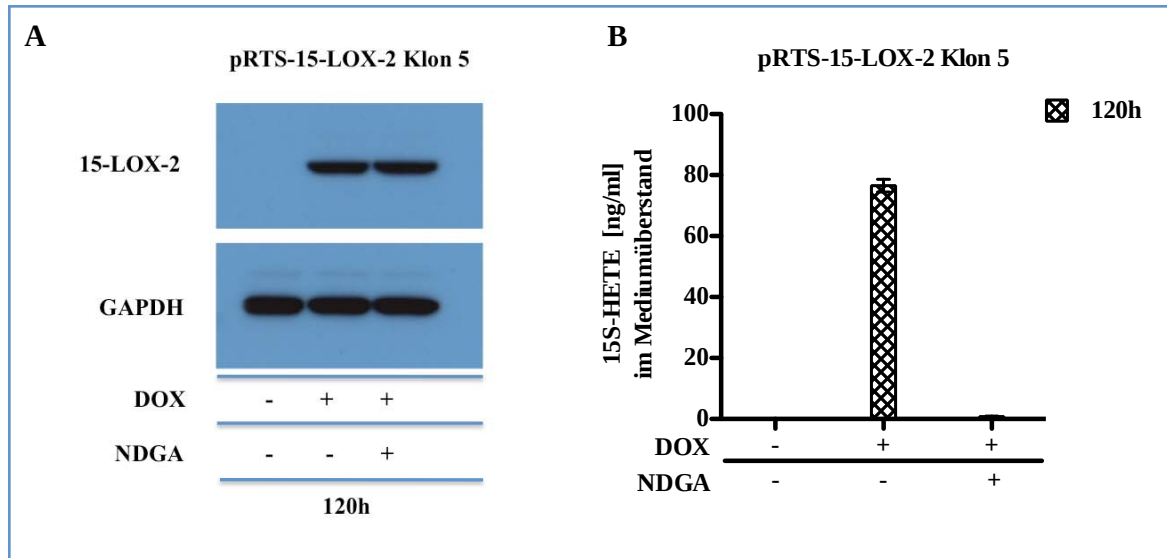


Abbildung 43: (A) Immunoblot-Analyse des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 5 in Ab- bzw. Anwesenheit von DOX und Behandlung mit NDGA. Die Induktion mit DOX führte zur Expression von 15-LOX-2. Diese Expression wurde durch die Zugabe von 10 μ M NDGA nicht beeinflusst. (B) 15S-HETE-ELISA der Zellkulturüberstände des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 5. Durch Induktion mit DOX kam es zur Expression von 15-LOX-2 und damit zu einer hohen 15S-HETE-Konzentration von 80 ng/ml Medium. Die enzymatische Hemmung von 15-LOX-2 durch 10 μ M NDGA führte zu einer Reduktion der Konzentration an 15S-HETE auf 0,7 ng/ml Medium. Die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von 15-LOX-2 erreichte nahezu 100 %.

Die in Abbildung 44 dargestellte vergleichende Auswertung der Zellzahlbestimmung zeigt, dass im zeitlichen Verlauf der 15-LOX-2-vermittelte wachstumshemmende Effekt durch Behandlung mit NDGA reduziert werden konnte. Während nach 72 h Behandlung die Wachstumsunterschiede noch gering waren, konnte nach 120 h eine signifikante Verminderung der Wachstumshemmung durch NDGA beobachtet werden ($p < 0,05$).

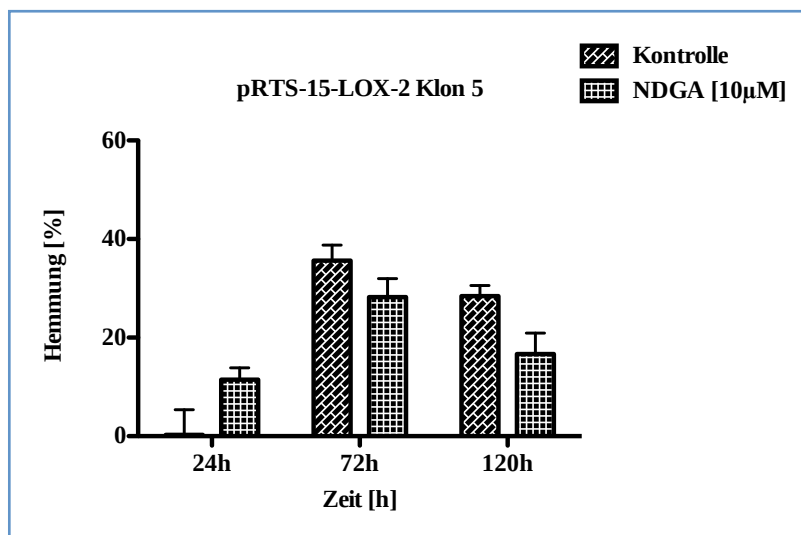


Abbildung 44: Reduktion der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung durch den Lipoxigenase-Inhibitor NDGA. Die Zellen des pRTS-15-LOX-2 Klon 5 wurden in Triplikaten mit einer Zellzahl von 50000 Zellen/Well in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und in An- bzw. Abwesenheit von DOX und 10 µM NDGA inkubiert. Die Zellen wurden zu den ausgewählten Zeitpunkten trypsiniert und mit dem Guava-PCA-System wurde die Zellzahl bestimmt. Die prozentuale Wachstumshemmung ergibt sich aus der reduzierten Zellzahl der induzierten Klone im Vergleich zu ihren nicht induzierten Kontrollen. Durch NDGA Behandlung konnte nach 120 h eine Reduktion der Wachstumshemmung des induzierten pRTS-15-LOX-2 Klon 5 beobachtet werden. Die Inhibierung der enzymatischen Aktivität führte zu einer Verminderung der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumseffekte. (Student's t-Test: $p < 0,05$).

4.2.4.3. Die Expression von 15-LOX-2 induziert Apoptose in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1, jedoch keine Zell-Seneszenz

Die DOX-induzierte Expression von 15-LOX-2 in den verschiedenen Klonen der Tumorzelllinie Panc1 führte zu einer Hemmung der Proliferation sowie zu einer erheblichen Reduktion der Tumorzellzahl. Die Wachstumshemmung könnte auf eine erhöhte Apoptoserate oder auf Zell-Seneszenz zurückzuführen sein.

Der aktive Klon 5 und inaktive Klon 4 des pRTS-Systems zeigten nach Induktion mit DOX im gemessenen Analysezeitraum eine langgestreckte abgeflachte Morphologie, die typisch für seneszente Zellen ist [131]. Im Vergleich waren die Zellen der nicht induzierten Kontrollen weniger abgeflacht und wiesen eine normale Morphologie auf. Mehrere Versuche, Seneszenz in den Zellen anhand des Seneszenz-Markers SA- β -Galaktosidase nachzuweisen, ergaben jedoch alle negative Ergebnisse [131] (Daten nicht gezeigt). Es ist daher anzunehmen, dass die 15-LOX-2-vermittelte Wachstumshemmung auf andere Netzwerke zurückzuführen war.

Zur Überprüfung einer möglichen 15-LOX-2-vermittelten Induktion von Apoptose wurde ein AnnexinV-Assay (Guava-PCA-System) durchgeführt. Abbildung 45 und Abbildung 46 zeigen die Ergebnisse der AnnexinV Analyse für den 24h bzw. 120h Zeitwert. Im jeweils linken unteren Quadranten sind die lebenden Zellen dargestellt, im rechten unteren Quadranten die früh apoptotischen und im rechten oberen Quadranten die spät apoptotischen Zellen. Im linken oberen Quadranten sind Zelldebris und tote Zellen dargestellt. Wie aus Abbildung 45 zu erkennen ist, nahm die frühe Apoptoserate des pRTS-15-LOX-2 Klons 5, gemessen anhand der AnnexinV-Färbung der Zellen, im Vergleich zu den nicht induzierten Kontrollen signifikant zu.

Während nach 24-stündiger Induktion das Verhältnis von lebenden zu früh apoptotischen Zellen bei den nicht induzierten und induzierten Klonen keine signifikanten Unterschiede ergab, zeigte sich im späteren Verlauf der Analyse eine Verschiebung des Verhältnisses von lebenden zu früh apoptotischen Zellen in Richtung Apoptose. In Tabelle 19 ist die prozentuale Verteilung zusammengefasst. Demnach kam es im gemessenen Analysezeitraum durch die Expression von 15-LOX-2 zu einer 35 %-igen Zunahme an apoptotischen Zellen, bei gleichzeitiger prozentualer Reduktion lebender Zellen.

Tabelle 19: Prozentuale Auswertung des AnnexinV-Assays für den pRTS-15-LOX-2 Klon 5.

	24h		120h	
-DOX	Lebende Zellen	92,7 %	Lebende Zellen	95 %
	Früh apoptotische Zellen	0,7 %	Früh apoptotische Zellen	1,5 %
+DOX	Lebende Zellen	90 %	Lebende Zellen	57,5 %
	Früh apoptotische Zellen	2,14 %	Früh apoptotische Zellen	36,6 %

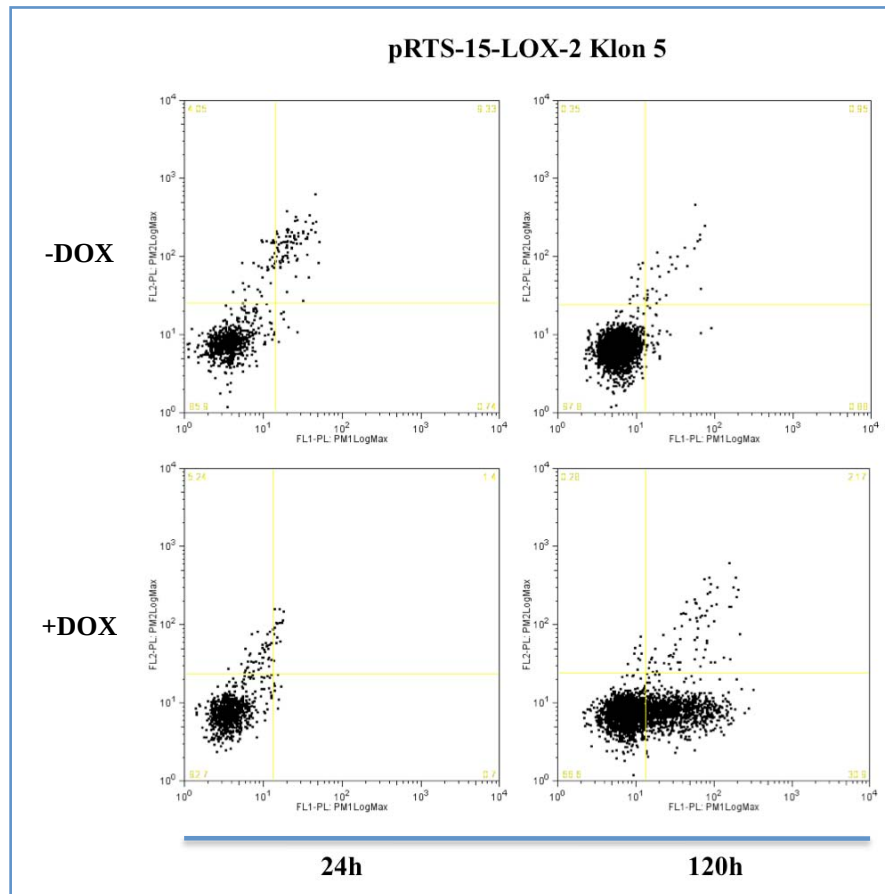


Abbildung 45: AnnexinV Assay des pRTS-15-LOX-2 Klons 5. Die Analyse wurde mit dem Guava-PCA-System durchgeführt. Quadranteneinteilung: lebende Zellen (links unten), tote Zellen und Debris (links oben), früh apoptotische (rechts unten) und spät apoptotische Zellen (rechts oben). Die Induktion der 15-LOX-2-Expression bedingte die Verschiebung des Verhältnisses „Lebende Zellen vs. früh apoptotische Zellen“ zu Gunsten der Apoptose. Nach 120 h kam es zu einem 35 % -igen Anstieg an früh apoptotischen Zellen.

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der AnnexinV-Analyse für den pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 dargestellt. Der inaktive Klon zeigte ähnlich wie der aktive Klon eine Zunahme an apoptotischen Zellen nach 72 h Induktion der 15-LOX-2-Expression. In Tabelle 20 sind die prozentualen Verhältnisse der lebenden vs. der apoptotischen Zellen zusammengefasst.

Tabelle 20: Prozentuale Auswertung des AnnexinV-Assays für den pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4.

24h			120h	
-DOX	Lebende Zellen	91,5 %	Lebende Zellen	95,9 %
	Früh apoptotische Zellen	1,32 %	Früh apoptotische Zellen	2,07 %
+DOX	Lebende Zellen	94,4 %	Lebende Zellen	64,9 %
	Früh apoptotische Zellen	0,75 %	Früh apoptotische Zellen	22,9 %

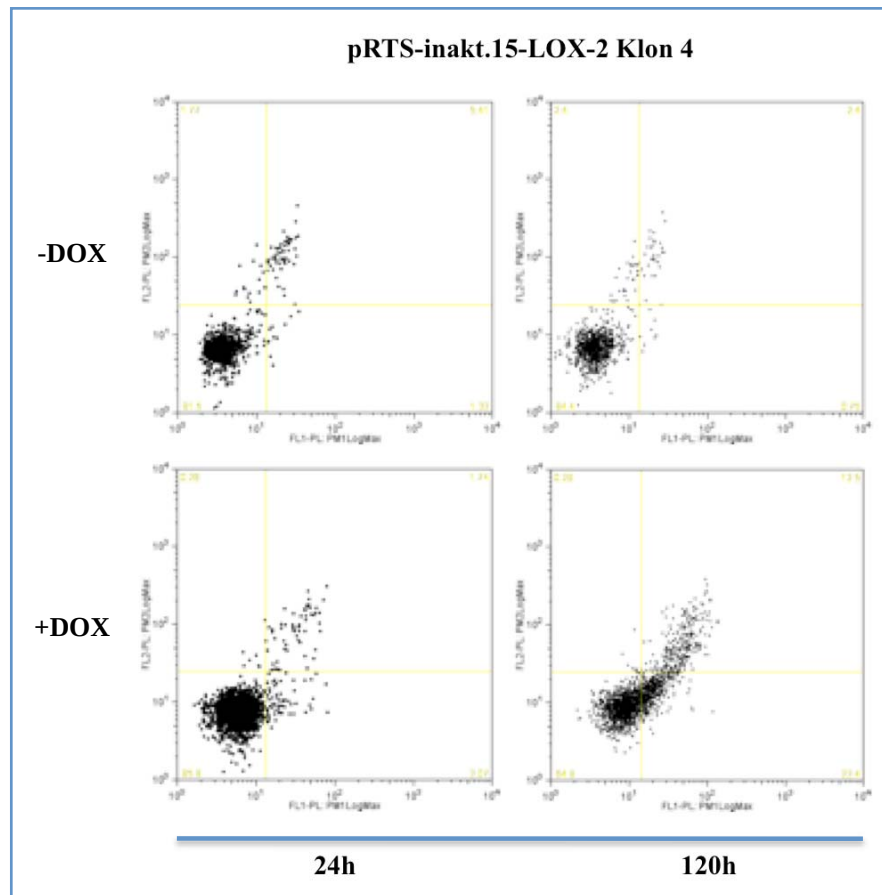


Abbildung 46: AnnexinV Assay des pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4. Die Analyse wurde mit dem Guava-PCA-System durchgeführt. Quadranteneinteilung: lebende Zellen (links unten), tote Zellen und Debris (links oben), früh apoptotisch (rechts unten) und spät apoptotisch (rechts oben). Die Induktion der 15-LOX-2 Expression bedingte die Verschiebung des Verhältnisses „Lebende Zellen vs. früh apoptotische Zellen“ zu Gunsten der Apoptose. Nach 120h kam es zu einem 22 %-igen Anstieg an früh apoptotischen Zellen.

Zusammenfassend ergibt sich durch Expression von 15-LOX-2 sowohl für den aktiven als auch für den inaktiven Klon eine erhöhte Apoptoserate. In beiden Klonen konnte eine Verschiebung des Verhältnisses „lebende vs. früh apoptotische Zellen“ erst ab einer 72-stündigen Induktion mit DOX nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Verschiebung resultierte in einem 35 %-igen Anstieg der früh apoptotischen Zellen im aktiven Klon 5 sowie in einem 22 %-igen Anstieg im inaktiven Klon 4.

4.2.5. Identifikation von 15-LOX-2-induzierten Signalwegen mittels Chip-Array-Analyse

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Induktion des TET-Systems und somit die Expression von 15-LOX-2 zu einer starken Hemmung des Zellwachstums von bis zu 60 % führte. Die 15-LOX-2-vermittelten Wachstumseffekte waren weitestgehend unabhängig von der enzymatischen Aktivität. Die Metabolisierung von LA zu 13S-HODE hatte keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Klone, dem AA-Metaboliten 15S-HETE konnte dagegen ein leichter additiver wachstumshemmender Effekt zugeschrieben werden. Die generelle Wachstumshemmung durch die Expression von 15-LOX-2 war verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate in den verschiedenen Klonen. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die alleinige Anwesenheit von 15-LOX-2 als auch sein Produkt 15S-HETE einen anti-proliferativen Effekt auf die Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 hatte. Zur Identifizierung möglicher Netzwerke in die 15-LOX-2 und sein Metabolit 15S-HETE involviert sein könnten, wurden mit Hilfe des Eppendorf-Transkriptionsfaktor-Chip-Arrays (TF-Chip-MAPK) mögliche Interaktionspartner im *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Signalweg analysiert. Die Aktivierung der MAPKs wird durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale ausgelöst und erfolgt über eine lineare Kaskade von nacheinander agierenden Proteinkinasen, welche sequentielle Phosphorylierungsreaktionen vermitteln, die bei der Regulation von Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Inflammation beteiligt sind. ERK1/2, JNK, p38 und ERK5 aktivieren, abhängig von ihrer Stimulation, unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie z.B. Stat1/3, c-Jun oder p53. Die TF-Chip-MAPK-Analyse ermöglicht eine simultane Untersuchung acht verschiedener durch MAPK aktivierte Transkriptionsfaktoren. Mit Hilfe dieser Technik wurde der Einfluss von 15-LOX-2 und seiner inaktiven Mutante auf die MAPK-Signalwege in den pRTS-15-LOX-2 Klonen analysiert. Hierzu wurden zum Zeitpunkt 48 h nukleäre Proteinextrakte aus DOX-induzierten und nicht induzierten Zellen der Klone pRTS-15-LOX-2 Klon 5 und pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 aufgereinigt und für die Chip-Array-Analyse eingesetzt. Mit Hilfe von integrierten Positiv- und Negativkontrollen konnten die gewonnenen Daten anhand der gefärbten Spots auf dem Chip miteinander verrechnet und so die unterschiedlich aktivierten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Wie in Abbildung 47 A ersichtlich, zeigte der Vergleich zwischen der nicht induzierten Kontrolle

und dem induzierten pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 eine Veränderung im Aktivierungsstatus der untersuchten Transkriptionsfaktoren. Die 15-LOX-2-vermittelte Expression induzierte eine Hochregulation der Transkriptionsfaktoren c-Jun und p53. Die Veränderungen in den anderen Transkriptionsfaktoren waren entweder nicht signifikant wie die von MEF2 oder unterhalb der Detektionsgrenze.

Ein ähnliches Aktivierungsprofil zeigte sich auch für den aktiven Klon, wobei das Ausmaß der Aktivierung in diesen Zellen deutlich höher war. Die Messwerte für p53 lagen hier sogar außerhalb des linearen Messbereiches, so dass eine quantitative Auswertung nicht möglich war. Im Gegensatz zum inaktiven Klon ergab die Analyse der Daten für den aktiven Klon auch signifikante Unterschiede in den Werten für den MEF2-Transkriptionsfaktor.

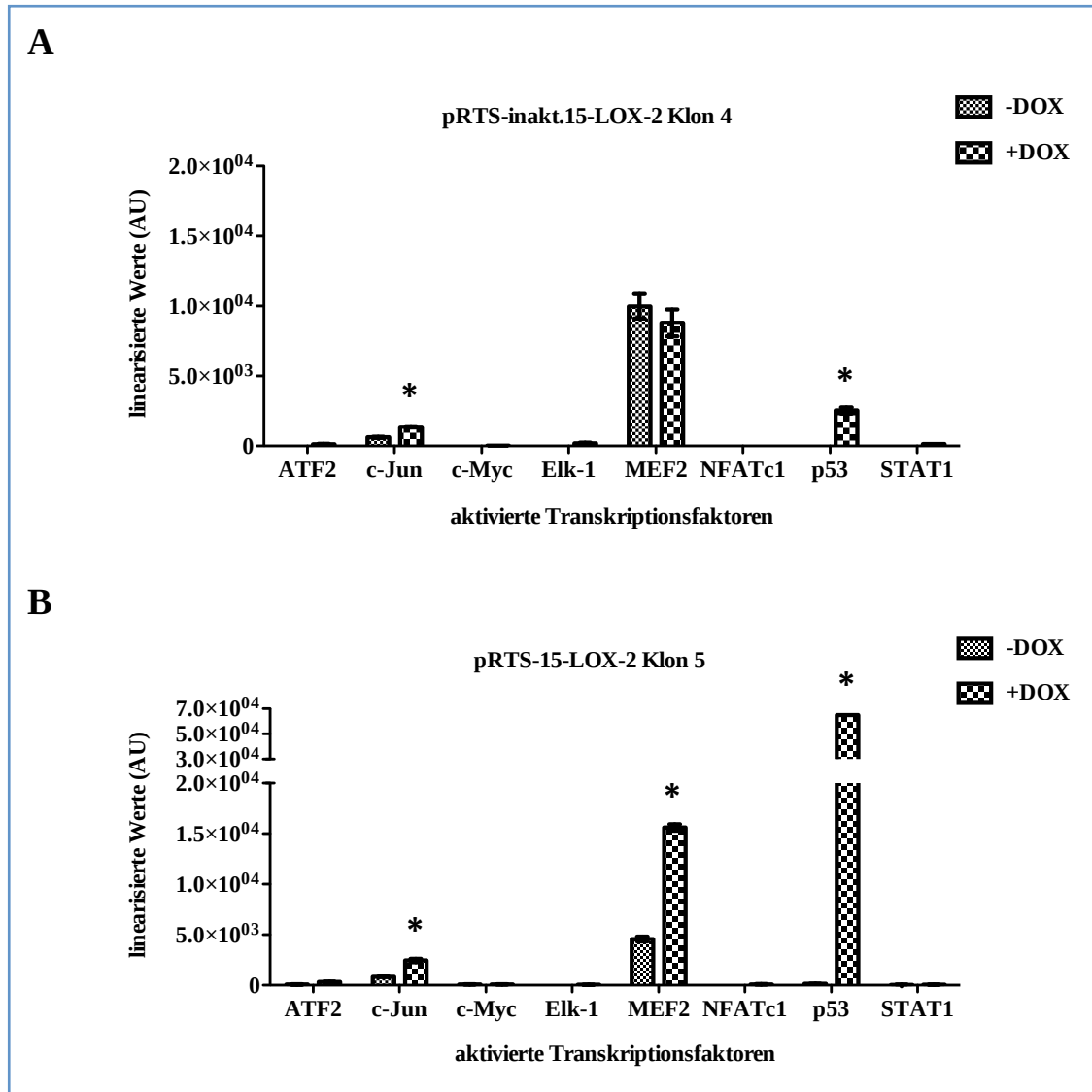


Abbildung 47: Vergleichende TF-Chip-MAPK-Analyse zwischen den Klonen pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 und pRTS-15-LOX-2 Klon 5 in An- bzw. Abwesenheit von DOX. Beide Klone wurden mit DOX induziert und nach 24 h wurden nukleare Proteinextrakte isoliert, aufgereinigt und der TF-Chip-MAPK-Analyse zugeführt. Die Auswertung der Silverquant® Färbung machte deutlich, dass durch Expression von 15-LOX-2 die untersuchten Transkriptionsfaktoren aberrant aktiviert wurden. (A) Der inaktive pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 wies eine Erhöhung von c-Jun und p53 auf, während der aktive pRTS-15-LOX-2 Klon 5 Erhöhungen von c-Jun, p53 und MEF2 zeigte (B). (Student's t-Test: $p < 0,001$).

4.2.6. 15-LOX-2 vermittelt eine Hochregulation der Expression des Transkriptionsfaktors p53

Die in der TF-MAPK-Chip-Analyse gewonnenen Daten wurden zunächst für den Transkriptionsfaktor p53 eingehender untersucht. Abbildung 48 zeigt zusammenfassend die Auswertung des Chip-Arrays für die Werte von p53 nach 24-stündiger Expression von 15-LOX-2. Im Vergleich zu den nicht induzierten Kontrollen stieg die Konzentration an aktiviertem p53 im inaktiven pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 auf 2537 Einheiten und im aktiven Klon pRTS-15-LOX-2 Klon 5 auf sehr hohe Werte außerhalb des linearen Bereiches. Die Ergebnisse zeigten, dass die Induktion von 15-LOX-2 eine Aktivierung von p53 bewirkte. Die Analyse des ChipArrays beruht auf der Messung des transkriptionell aktiven, d.h. phosphorylierten p53.

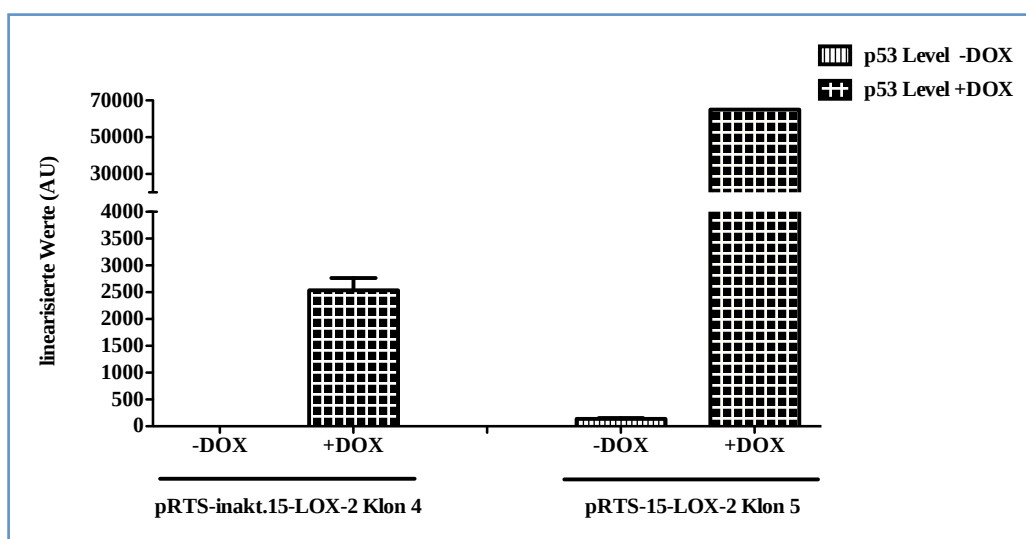


Abbildung 48: Vergleichende TF-Chip-MAPK-Analyse für den Transkriptionsfaktor p53 zwischen den Klonen pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 und pRTS-15-LOX-2 Klon 5 in An- und Abwesenheit von DOX. Beide Klone wurden mit DOX induziert und nach 24h nukleare Proteinextrakte isoliert. Diese wurden aufgereinigt und der TF-Chip-MAPK-Analyse zugeführt. Die Auswertung der Silverquant® Färbung machte deutlich, dass durch Expression von 15-LOX-2 der Transkriptionsfaktor p53 aberrant exprimiert wurde. Der inaktive pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 wies eine Erhöhung von p53 auf 2537 Einheiten auf, während der aktive pRTS-15-LOX-2 Klon 5 Erhöhungen bis zu 65000 Einheiten zeigte.

Inwieweit die p53 Aktivierung auch auf eine Erhöhung der p53-Proteinkonzentration in den Zellen zurückzuführen war, wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Dafür wurden beide Klone in 100 mm Kulturschalen mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ ausgesät, in An- bzw. Abwesenheit von DOX inkubiert und nach 24-stündiger Inkubation Proteinlysate für die Western-Blot-Analyse isoliert.

Wie aus Abbildung 49 ersichtlich ist, lag die Expressionsstärke des p53-Proteins in den nicht induzierten Zellen kaum über der Detektionsgrenze. Nach Induktion konnte eine hohe Proteinkonzentration an p53 beobachtet werden. In Übereinstimmung mit den Daten der Chip-Analyse war die Hochregulation von p53 in den Zellen, welche die aktive 15-LOX-2 exprimierten, etwa doppelt so stark wie in denen, die das inaktive Enzym exprimierten.

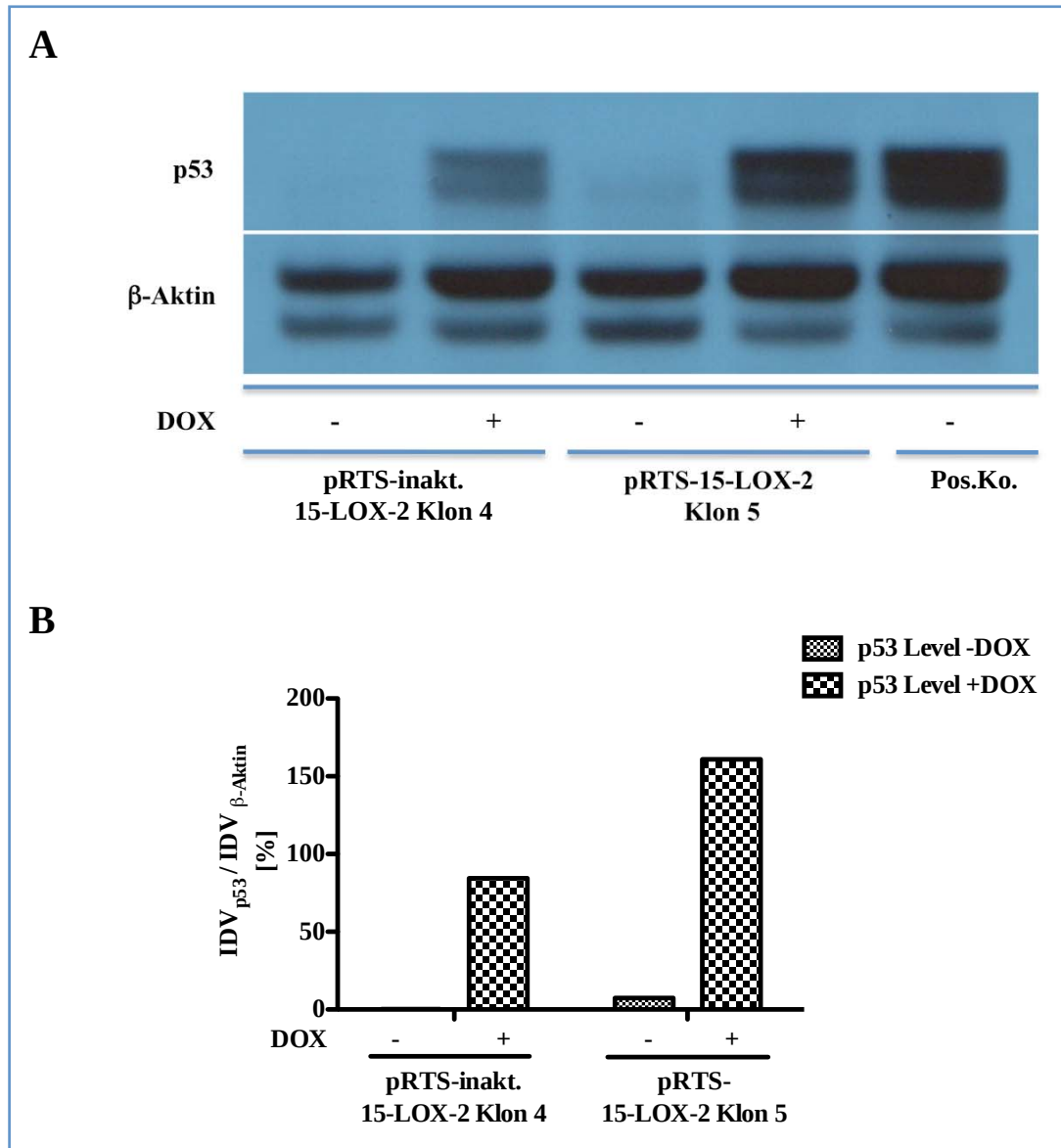


Abbildung 49: (A) Immunoblot für p53 von den Klonen pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 und pRTS-15-LOX-2 Klon 5 in An- bzw. Abwesenheit von DOX. 24h nach DOX-Induktion wurden Proteinlysate gewonnen und für den Immunoblot verwendet. Bei den nicht induzierten Kontrollen konnte keine signifikante Expression von p53 detektiert werden. Jedoch erfolgte in den induzierten Proben eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors p53. (B) Semiquantitative Analyse des Immunoblots, normiert über β -Aktin. Die aktive Form von 15-LOX-2 induzierte eine doppelt so hohe Induktion der Expression von p53 wie die nicht aktive Mutante.

Zur Abklärung, ob die Expression von 15-LOX-2 tatsächlich eine *de-novo* Synthese von p53 induzierte, wurde die Expression von p53 auf transkriptioneller Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Abbildung 50 zeigt exemplarisch anhand des pRTS-15-LOX-2 Klon 5 die Expressionsänderung der p53 mRNA nach Induktion des Klon mit DOX. Für die übersichtliche Darstellung wurde die semiquantitative Analyse auf die basale Expression von p53 zum Zeitpunkt 0 h normiert. Ab 12-stündiger Induktion zeigten sich deutlich erhöhte Expressionswerte für p53-mRNA, die im gemessenen Analysezeitraum bis 120 h auf das 6-fache des Ausgangswertes (0h) anstiegen.

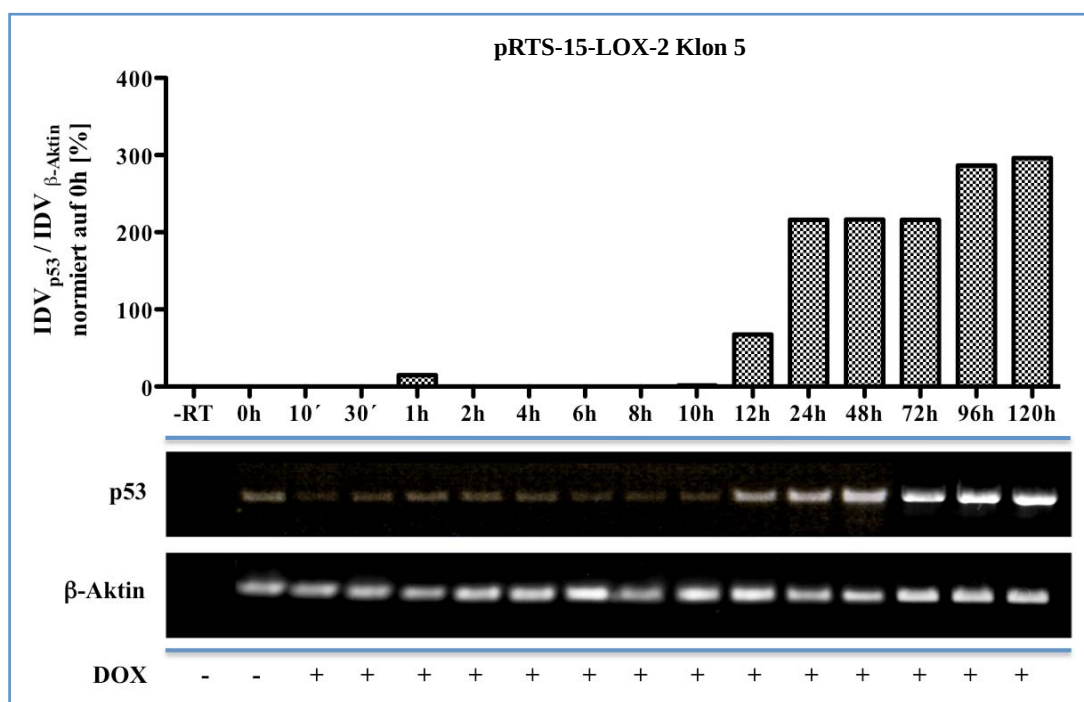


Abbildung 50: 15-LOX-2-vermittelte Änderung der p53-Expression auf transkriptioneller Ebene im pRTS-15-LOX-2 Klon 5. Die Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen mit einer Zelldichte von 200000 Zellen/Schale ausgesät und mit DOX inkubiert. Zu den ausgewählten Zeitpunkten wurde die RNA aus den Zellen isoliert, aufgereinigt und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die PCR erfolgte mit p53-spezifischen Primern. Als Kontrolle diente β -Aktin. Die semiquantitative Analyse wurde auf den Ausgangswert 0 h über β -Aktin normiert. Eine Erhöhung der p53-mRNA konnte ab einer 12-stündigen Induktion mit DOX beobachtet werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf stieg die Expression von p53-mRNA auf das 6-fache des Ausgangswertes von 0 h an.

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden durch Real-Time-PCR-Analysen bestätigt. Die quantitative Auswertung der Analysen in Abbildung 51 zeigt nach 12-stündiger Induktion eine im Vergleich zur nicht-induzierten Negativkontrolle graduelle Expressionssteigerung bis auf den 10-fachen Wert zum Zeitpunkt 120 h.

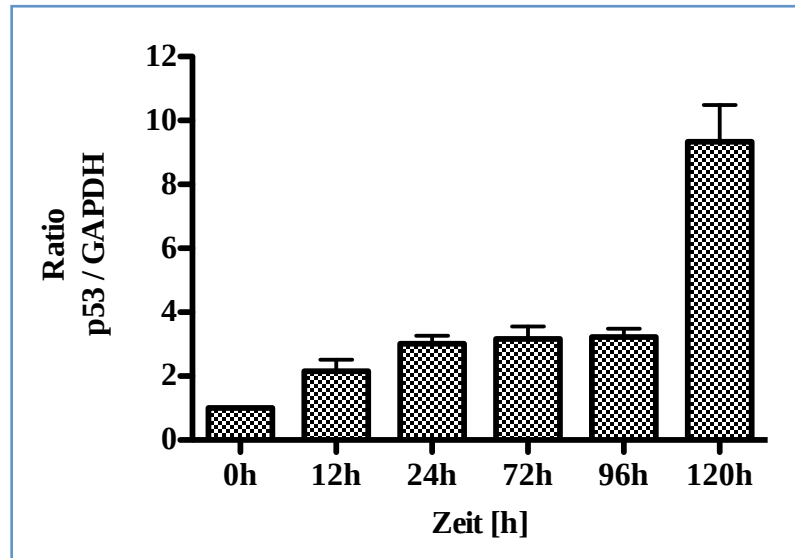


Abbildung 51: Real-Time-PCR-Analyse der 15-LOX-2-vermittelten Änderung des p53-Expressionsniveaus im pRTS-15-LOX-2 Klon 5. Die Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen mit einer Zelldichte von 200000 Zellen/Schale ausgesät und mit DOX inkubiert. Zu den ausgewählten Zeitpunkten wurde die RNA aus den Zellen isoliert, aufgereinigt und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Real-Time-PCR erfolgte mit p53-spezifischen Primern. Als interne Kontrolle diente GAPDH. Eine Erhöhung der p53-mRNA um den Faktor 2 konnte ab einer 12-stündigen Induktion mit DOX beobachtet werden. Im gemessenen Analysezeitraum stieg die Expression von p53-mRNA auf das 10-fache des Kontrollwertes an.

4.2.7. Einfluss von p53 auf die 15-LOX-2-vermittelte Wachstumshemmung

Die induzierte Expression von 15-LOX-2 in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 führte unabhängig von der katalytischen Aktivität zu einer Hemmung der Proliferation in den Tumorzellen, sowie zu einer gesteigerten Apoptoserate, die mit einer Hochregulation von p53 korrelierte. Um den kausalen Zusammenhang zwischen 15-LOX-2-induzierter Wachstumshemmung und der Hochregulation von p53 zu analysieren, wurde mit Hilfe der siRNA-Technologie die 15-LOX-2-vermittelte Hochregulation von p53 supprimiert.

4.2.7.1. Etablierung der p53-spezifischen siRNA-Transfektionsstrategie in Panc1

Die siRNA-Targets für p53 wurden von der Firma Qiagen bezogen. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Targets in einem Real-Time basierten Verfahren als spezifisch für p53 mit einer 70%-igen Knockout-Effizienz validiert.

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten siRNAs für p53 wurde der pRTS-15-LOX-2 Klon 5 mit vier verschiedenen siRNAs (Konzentration 1 nmol), einem Mix aus allen vier eingesetzten siRNAs sowie den entsprechenden Kontrollen transfiziert und mit DOX induziert. Nach 72-stündiger Inkubation wurden von den Zellen Proteinlysate gewonnen und eine Immunoblot-Analyse für p53 durchgeführt. Wie Abbildung 52 zeigt, konnte durch die Transfektion mit den einzelnen siRNAs eine Reduktion in der Expression von p53 bewirkt werden. Das Transfektionsprotokoll an sich hatte, wie die Kontrolle mit der unspezifischen scrambled siRNA belegt, keinen Einfluss auf die Expression von p53. Die verwendeten siRNAs zeigten ein unterschiedliches Potenzial ihrer hemmenden Wirkung. So erzielte siRNA Nr. 3 eine 40 %-ige Reduktion der p53-Proteinmenge, Nr. 7 eine 54%-ige, Nr. 9 eine 46 %-ige und Nr. 13 eine 45 %-ige. Der Mix aus allen vier einzeln eingesetzten siRNAs potenzierte die hemmende Wirkung und erzielte eine 62 %-ige Reduktion der p53-Translation. Eine Erhöhung der eingesetzten Konzentration an siRNAs von 1 nmol auf 5 nmol bewirkte eine fast 100 %-ige Reduktion der p53-Expression, so dass in den folgenden Versuchsansätzen ein Mix aus den vier siRNAs mit einer Konzentration von 5 nmol eingesetzt wurde.

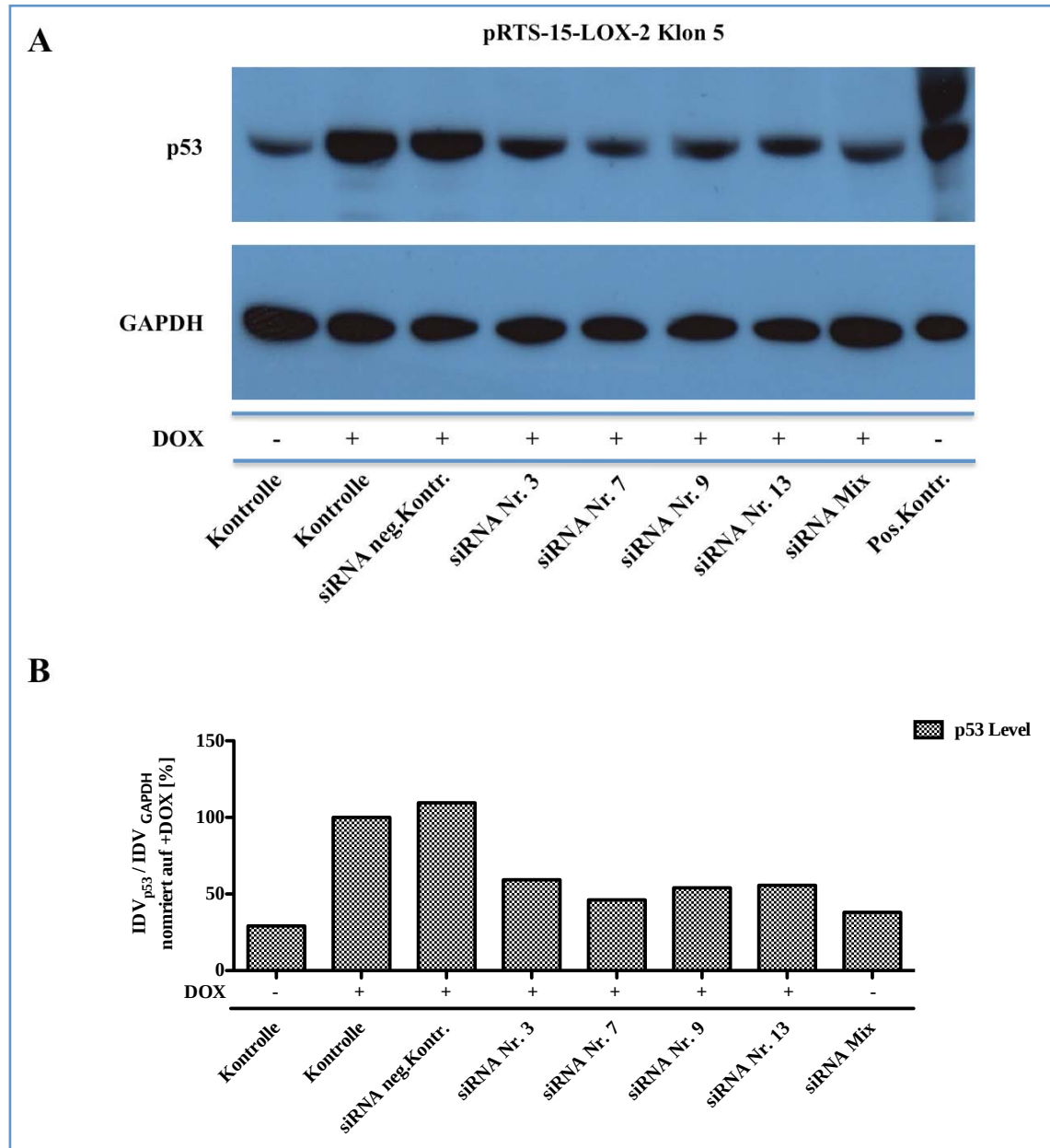


Abbildung 52: (A) Evaluation der spezifischen p53-siRNAs für die Transfektion der pRTS-Klone. Die Zellen des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 wurden in 60 mm Kulturschalen mit einer Zelldichte von 200000 Zellen/Schale ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte die Transfektion mit vier verschiedenen siRNAs, einer negativen Kontroll-siRNA, bestehend aus unspezifischer scrambled siRNA sowie einem Mix aus allen vier einzeln eingesetzten siRNAs. Anschließend wurden die Zellen mit DOX induziert. Nach 72-stündiger Inkubation wurden aus den Zellen Proteinlysate gewonnen und für die Western-Blot-Analyse für p53 verwendet. Durch die Transfektion mit den unterschiedlichen siRNAs konnte eine Reduktion der p53-Translation erreicht werden. (B) Semiquantitative Analyse des Immunoblots normiert über GAPDH und der DOX-induzierten Kontrolle. Während mittels Transfektion mit siRNA Nr. 3 eine Reduktion von 40 % erreicht wurde, reduzierte Nr. 7 die p53-Translation um 54 %, Nr.9 um 46 % und Nr. 13 um 45 %. Ein Mix aus allen vier einzeln eingesetzten siRNAs reduzierte die Translation von p53 um 62 % .

4.2.7.2. Eine Hemmung der p53-Expression reduziert die 15-LOX-2-vermittelte Wachstumshemmung

Um zu überprüfen, ob ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen vermittelter 15-LOX-2-Expression und der p53-Induktion bestand, wurde der pRTS-15-LOX-2 Klon 5 mit dem p53-spezifischen siRNA-Mix transfiziert, mit DOX induziert und zu ausgewählten Zeitpunkten mittels Immunoblot die Koexpression von 15-LOX-2 und p53 detektiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Guava-PCA-System, um den Einfluss der p53-Expression auf die Hemmung der Zellproliferation zu analysieren. Repräsentativ für den gemessenen Analysezeitraum ist der Immunoblot für 120 h, normiert über die interne Ladekontrolle GAPDH, in Abbildung 53 dargestellt.

Wie bereits unter 4.2.6 gezeigt korrelierte die DOX-induzierte Expression von 15-LOX-2 mit einem starken Anstieg der p53-Expression. Die gleichzeitige Applikation des spezifischen siRNA-Mixes führte zu einer vollständigen Repression der p53-Expression ohne die 15-LOX-2-Expression zu beeinflussen. Die Kontroll-Transfektion mit scrambled siRNA hatte auf das DOX-induzierte Expressionslevel von p53 keinen Einfluss.

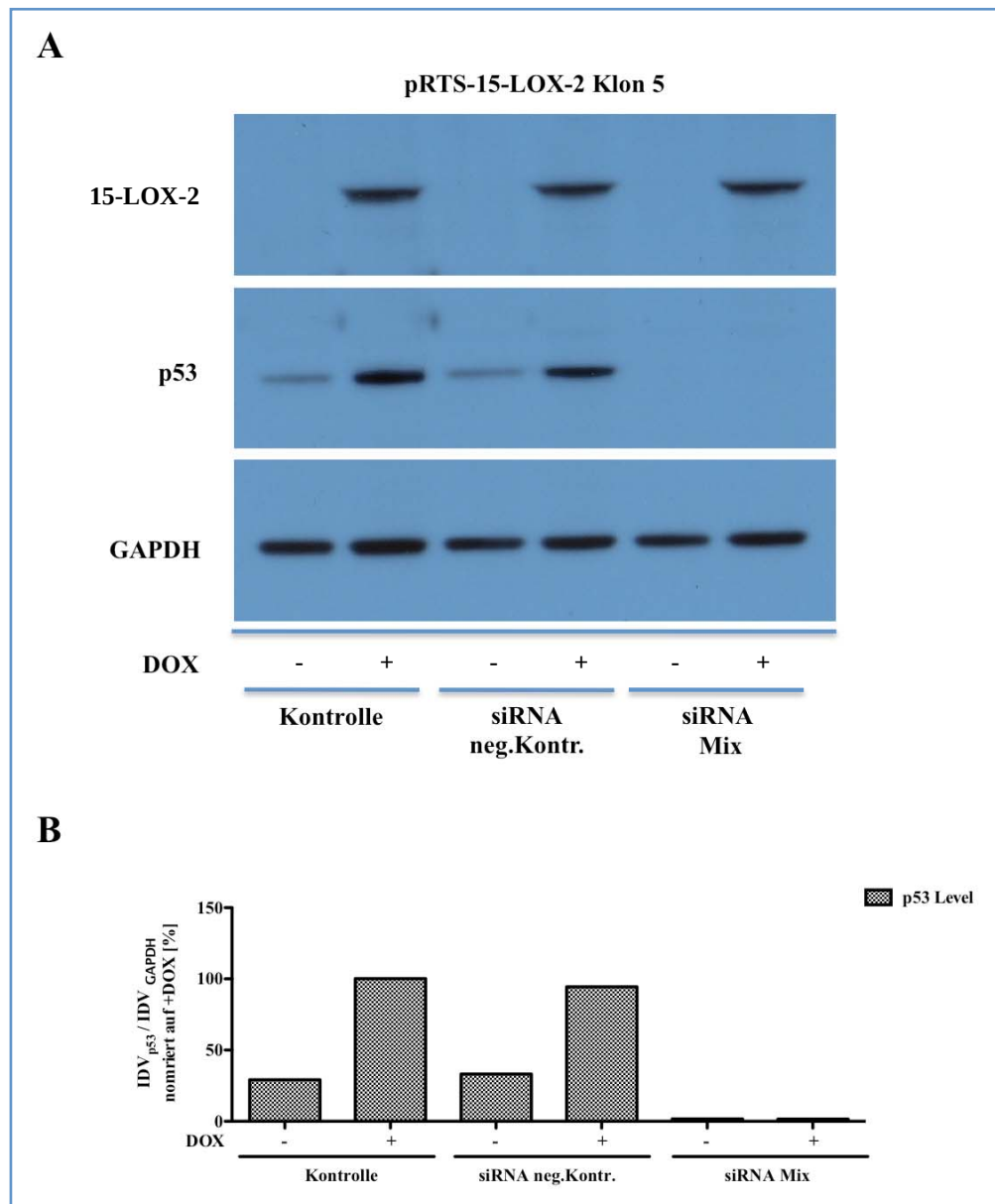


Abbildung 53: (A) Immunoblot der 120 h Stunden Behandlung des pRTS-15-LOX-2 Klon 5 mit DOX und Transfektion der p53-spezifischen siRNA. Die 15-LOX-2-vermittelte Expression resultierte in einer erhöhten p53-Koexpression. Die Transfektion mit der spezifischen p53-siRNA suppressierte fast vollständig die p53-Expression. Als Ladekontrolle diente GAPDH. (B) Semiquantitative Analyse des Immunoblots normiert über GAPDH zeigt eindeutig die suppressierende Wirkung des siRNA-Mixes auf die 15-LOX-2-vermittelte p53-Expression.

Abbildung 54 stellt die prozentuale Verteilung der Wachstumshemmung des Klon 5 nach DOX-Behandlung sowie p53-siRNA-Transfektion für 96 h, 120 h und 144 h gegenüber. Die DOX-induzierte 15-LOX-2-Expression resultierte über den gemessenen Zeitraum in einer 45-60 % Hemmung der Proliferation. Bei gleichzeitiger Transfektion mit p53-spezifischen siRNA-Mix war diese hemmende Wirkung nahezu vollständig aufgehoben (Student's t-Test: $p < 0,05$). Nach 144 h Koinkubation mit DOX und

p53-spezifischen siRNA-Mix konnten nur noch 20 % der Zellen in ihrer Proliferation inhibiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die 15-LOX-2-vermittelte p53-Expression kausal mit der Hemmung der Zellproliferation korrelierte.

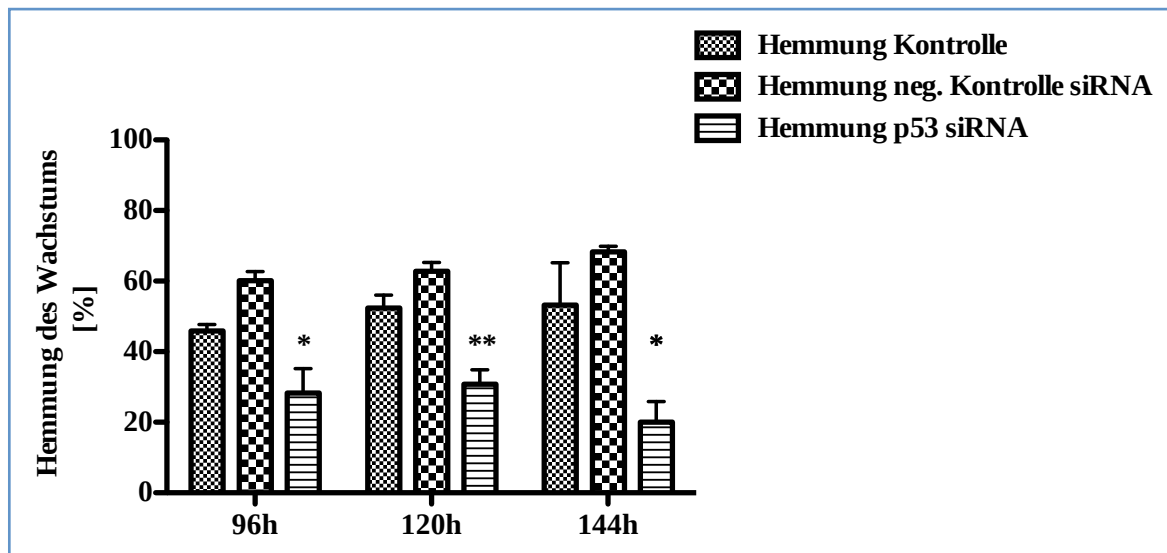


Abbildung 54: Wachstumshemmung der DOX-induzierten sowie p53-siRNA transfizierten Klone in einem zeitlichen Verlauf von 96-144 h. Die DOX-induzierte 15-LOX-2-Expression führte über den gemessenen Zeitraum zu einer Hemmung der Proliferation von 45-60 %, während die gleichzeitige Transfektion mit p53-spezifischen siRNA-Mix diese hemmende Wirkung supprimierte. Somit korreliert die 15-LOX-2-induzierte Wachstumshemmung mit der Hochregulation von p53 (Student's t-Test: $p < 0,05$).

4.2.8. Mutation des Tumorsuppressors p53

Die vorangegangenen Analysen wiesen auf eine wichtige Funktion des Tumorsuppressors p53 bei der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung in den Panc1 Tumorzellen hin. Die Inaktivierung von p53 stellt eine entscheidende genetische Aberration während der Pankreaskarzinogenese dar. In 50-75 % aller Pankreaskarzinome liegt p53 entweder mutiert oder deletiert vor. Dabei konnte beobachtet werden, dass auf den Verlust eines Allels meist eine Mutation im zweiten Allel folgt (loss of heterozygosity). Die Mutationen erfolgen gehäuft in der DNA-Bindungsdomäne des p53-Gens zwischen den Codons 175 und 273 und sind überwiegend vom Typ einer CpG-Transition [60]. Diverse Pankreaskarzinomzelllinien sind bezüglich des p53-Gens homozygot und weisen Mutationen auf [132]. Wie die Arbeitsgruppe um James Butz zeigen konnte, ist die Zelllinie Panc1 ebenfalls homozygot bezüglich p53 und besitzt eine Mutation im Codon 273 [133]. Zur Überprüfung der beschriebenen p53-Mutation wurden sowohl die

Mutterzellen Panc1, als auch der pRTS-15-LOX-2 Klon 5 mit spezifischen p53-Primern über den betreffenden Mutations-Hotspot-Bereich sequenziert. Wie Abbildung 55 zeigt, wies die Mutterzelle Panc1 und somit auch der pRTS-15-LOX-2 Klon 5 die beschriebene Mutation in Codon 273 auf. Es handelte sich um eine CpG-Transition von CGT nach CAT, was einen Austausch von Arginin zu Histidin zur Folge hatte.

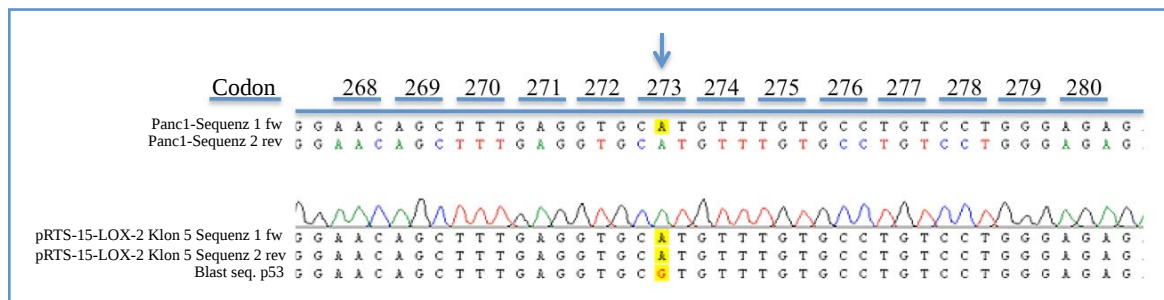


Abbildung 55: Nachweis einer CpG-Transitionsmutation im Codon 273 des p53-Gens in Panc1 und pRTS-15-LOX-2 Klon 5 [133]. Mittels p53-spezifischen Primer wurde der kodierende Bereich von Codon 5-390 via PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, isoliert, gereinigt und nach Klonierung sequenziert. Die vergleichende Sequenzanalyse wurde mit dem Programm NTI von Invitrogen durchgeführt. Der blaue Pfeil markiert die Mutation im Codon 273 sowohl in Panc1 als auch im Klon 5.

Wie Abbildung 56 zeigt ist das p53-Protein in mehrere Domänen strukturiert und besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne, einer Oligomerisierungsdomäne sowie einer C-terminalen Regulationsdomäne. Die einzelnen Domänen werden durch verschiedene Mechanismen posttranslational modifiziert und besitzen unterschiedliche Aufgaben. Die vorliegenden Daten implementieren, dass die Mutation in der DNA-Bindungsdomäne im Codon 273 des Tumorsuppressors p53 eine mögliche Interaktion mit 15-LOX-2 nicht beeinflusste.

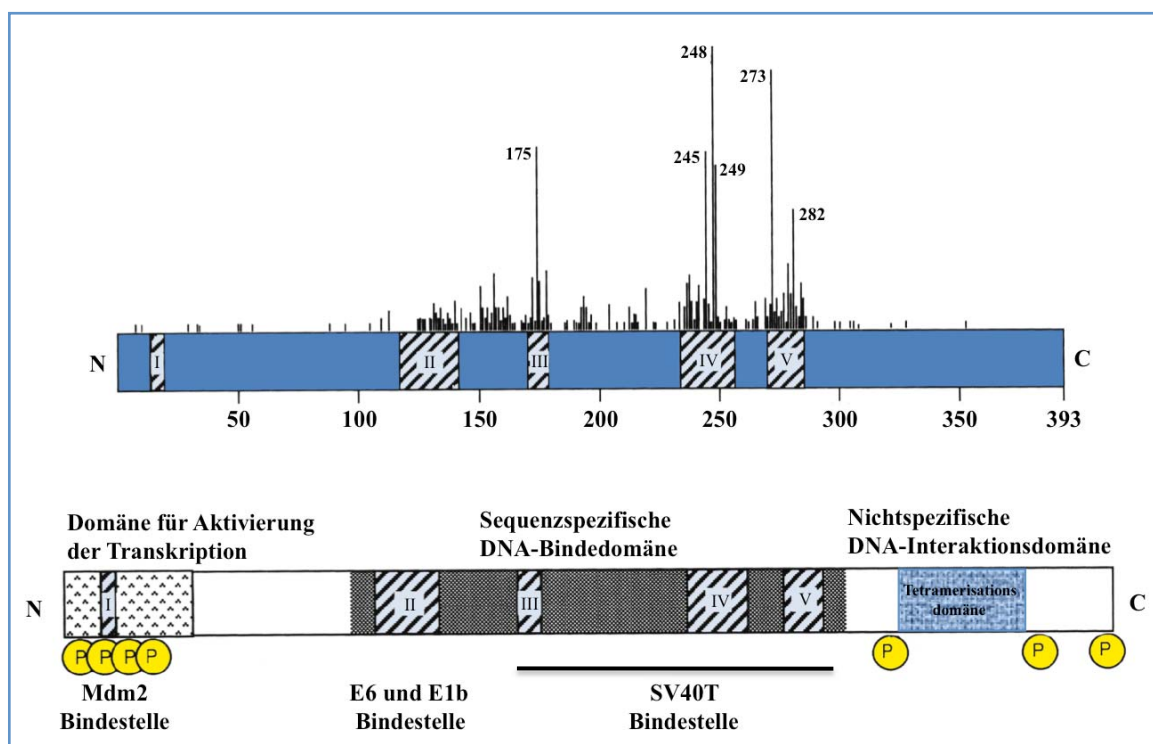


Abbildung 56: Strukturelle Charakteristika des p53-Protein. Oben: Häufigkeit (vertikale Linien) der in humanen Tumoren nachgewiesenen Mutationen mit den dazugehörigen Aminosäurepositionen der „hot spot“ Mutationen. Die hellblauen Bereiche symbolisieren die konservierten Genbereiche von p53. Die „hot spot“-Mutationen konzentrieren sich ausschließlich auf die DNA-Bindedomäne. Unten: Struktureller Aufbau des p53-Proteins mit den konservierten Domänen und den Phosphorylierungsstellen für diverse Kinasen (z.B. DNA-PK, ATM oder JNK). Die Phosphorylierung der Mdm2-Bindungsstelle stabilisiert p53, da Mdm2 nicht länger binden kann. Die Bindung weiterer Proteine, wie das E6 oder E1b inhibiert p53 in seiner Funktion (modifiziert nach [134]).

4.2.9. 15-LOX-2-Expression als neues Element einer molekularen Kombinationstherapien

Gemzar ist gegenwärtig das Chemotherapeutikum der Wahl zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms. Obwohl es ein gutes Ansprechverhalten zeigt, ist seine Effizienz dennoch nicht ausreichend, so dass viele Forschungsgruppen eine molekulare Kombinationstherapie mit der klassischen Chemotherapie als zukünftiges Therapiemodell favorisieren. Wie in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt werden konnte, führte die Expression von 15-LOX-2 in allen untersuchten Tumorzelllinien zu einer starken Hemmung des Tumorzellwachstums. Um zu überprüfen, ob der 15-LOX-2-Stoffwechselweg als mögliches therapeutisches Target in Kombination mit den Chemotherapeutika Gemzar und Cisplatin dienen könnte, erfolgte die Analyse einer

möglichen Kombination beider Systeme und der daraus folgenden Effektivität des therapeutischen Ansatzes. Dazu wurden Zellen des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 und des pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4 mit Gemzar sowie Cisplatin behandelt. Gleichzeitig wurde die Expression von 15-LOX-2 durch DOX-Zugabe induziert. Mittels Zellzahlbestimmung und Viabilitätsanalysen wurde der Effekt der Einzelbehandlungen sowie der kombinierten Behandlungen verglichen. Abbildung 57 stellt anhand des aktiven Klons 5 und des inaktiven Klons 4 des pRTS-Systems die unbehandelten Kontrollen der alleinigen Behandlung mit Gemzar und der Kombination aus Gemzar und 15-LOX-2-Expression gegenüber. Dabei wird ersichtlich, dass schon die Behandlung mit 0,1 μ M Gemzar eine starke Reduktion der Zellzahl in beiden Klonen verursachte, jedoch nicht ausreichte, um die Zellzahl über den gesamten zeitlichen Verlauf konstant niedrig zu halten oder weiter zu reduzieren. Die Behandlung mit 1 μ M Gemzar führte zu einer 6-fach höheren Wachstumshemmung als mit 0,1 μ M und zu einer konstant niedrigen Zellzahl. Die Kombination aus induzierter 15-LOX-2-Expression und 0,1 μ M Gemzar hatte die gleiche Effizienz wie eine Behandlung mit 10-fach höherer Dosis des Chemotherapeutikums. Ähnliche Ergebnisse mit einer additiven Wirkung der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression bei einer Kombinationsbehandlung ließen sich auch mit dem inaktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 4 erzielen (Abbildung 57 B).

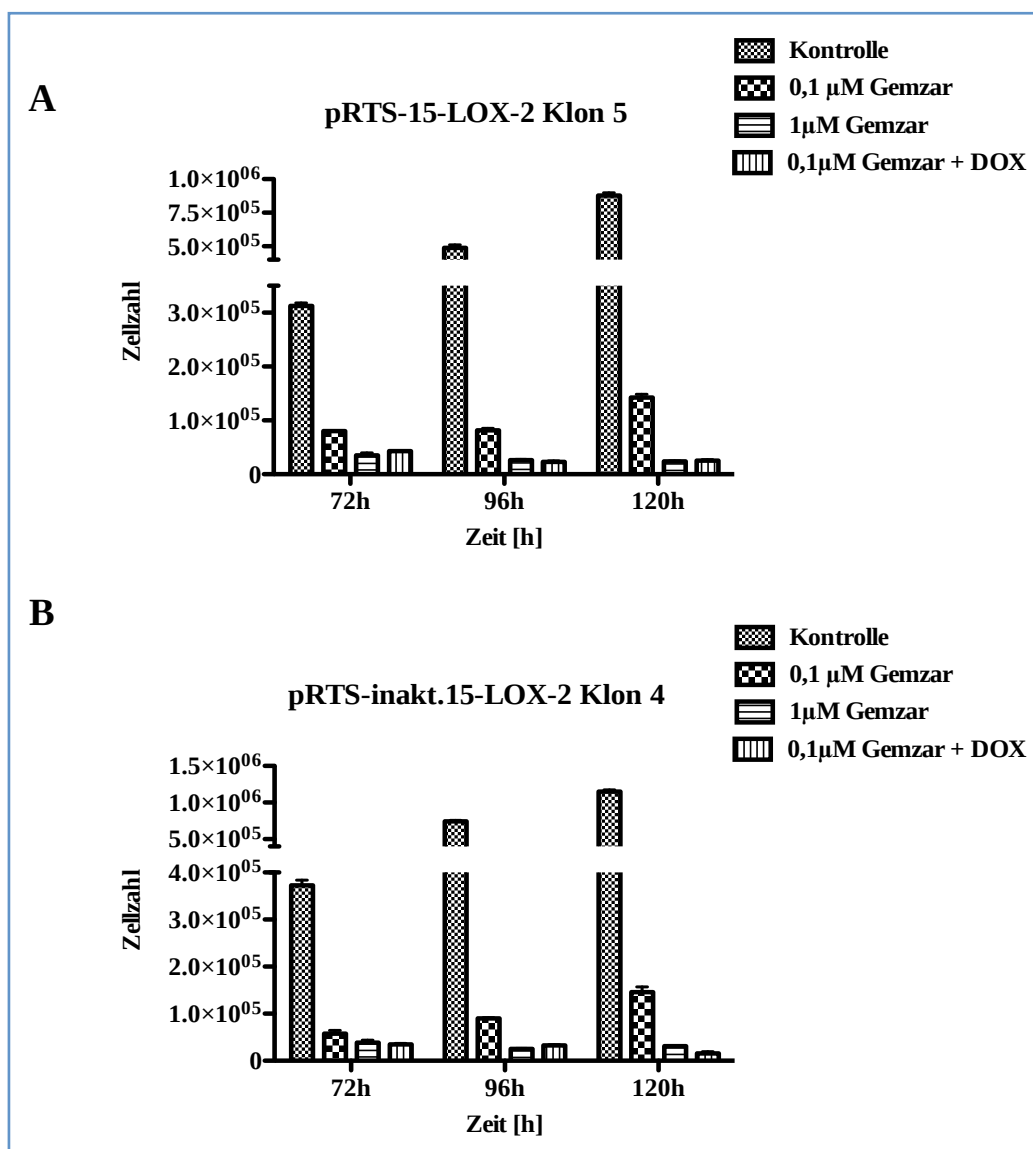


Abbildung 57: Wirkung einer Gemzar-Kombinationstherapie auf das Wachstum von Panc-1-Zellen. (A) Wachstumshemmung des aktiven Klons 5 im zeitlichen Verlauf durch Behandlung mit Gemzar und induzierter Expression von 15-LOX-2. Durch Behandlung von 0,1 µM Gemzar konnte die gleiche Wachstumshemmung in 15-LOX-2-exprimierenden Zellen erzielt werden wie durch die alleinigen Behandlung der Zellen mit einer 10-fach höheren Konzentration an Gemzar (1 µM). (B) Im inaktiven Klon 4 konnte durch identische Behandlung die gleiche Wachstumshemmung erzielt werden wie im aktiven Klon 5. Die 15-LOX-2-Enzymaktivität hatte keinen Einfluss auf die Wachstumshemmung. Die Unterschiede in der Zellzahl zwischen nicht induzierten Kontrollen nach Behandlung mit 0,1 und 1 µM Gemzar sowie nach Kombinationsbehandlung waren sowohl für den aktiven als auch für den inaktiven Klon signifikant (Student's t Test: $p < 0,01$).

Das Chemotherapeutikum Cisplatin wird derzeit in der CapRI Studie in Kombination mit Bestrahlung und Interferon α Gabe verwendet. Erste Versuche einer ähnlichen Kombinationsbehandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin zeigten, dass eine Konzentration von 0,5 µM ausreichte, um das Zellwachstums zu inhibieren (Abbildung 58). Jedoch konnte im zeitlichen Verlauf beim aktiven Klon 5 einen erneuten anstieg des Tumorzellwachstums beobachtet werden. Eine Behandlung mit 0,5 µM

Cisplatin des 15-LOX-2-exprimierenden pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4 führte zu einer stabilen durchgehenden Wachstumshemmung über den untersuchten Zeitraum. Die Zellzahl reduzierte sich im zeitlichen Verlauf bis 120 h noch zusätzlich. Eine Kombination aus induzierter 15-LOX-2-Expression und Behandlung mit 0,5 μ M Cisplatin führte zu einer signifikant niedrigeren Zellzahl als durch die alleinige Cisplatin-Behandlung. Versuche mit höheren Cisplatin-Konzentrationen konnten, ebenso wie die Wiederholung der Experimente, im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die gewonnenen Ergebnisse können aber als wichtige Grundlage für weitere Analysen dienen.

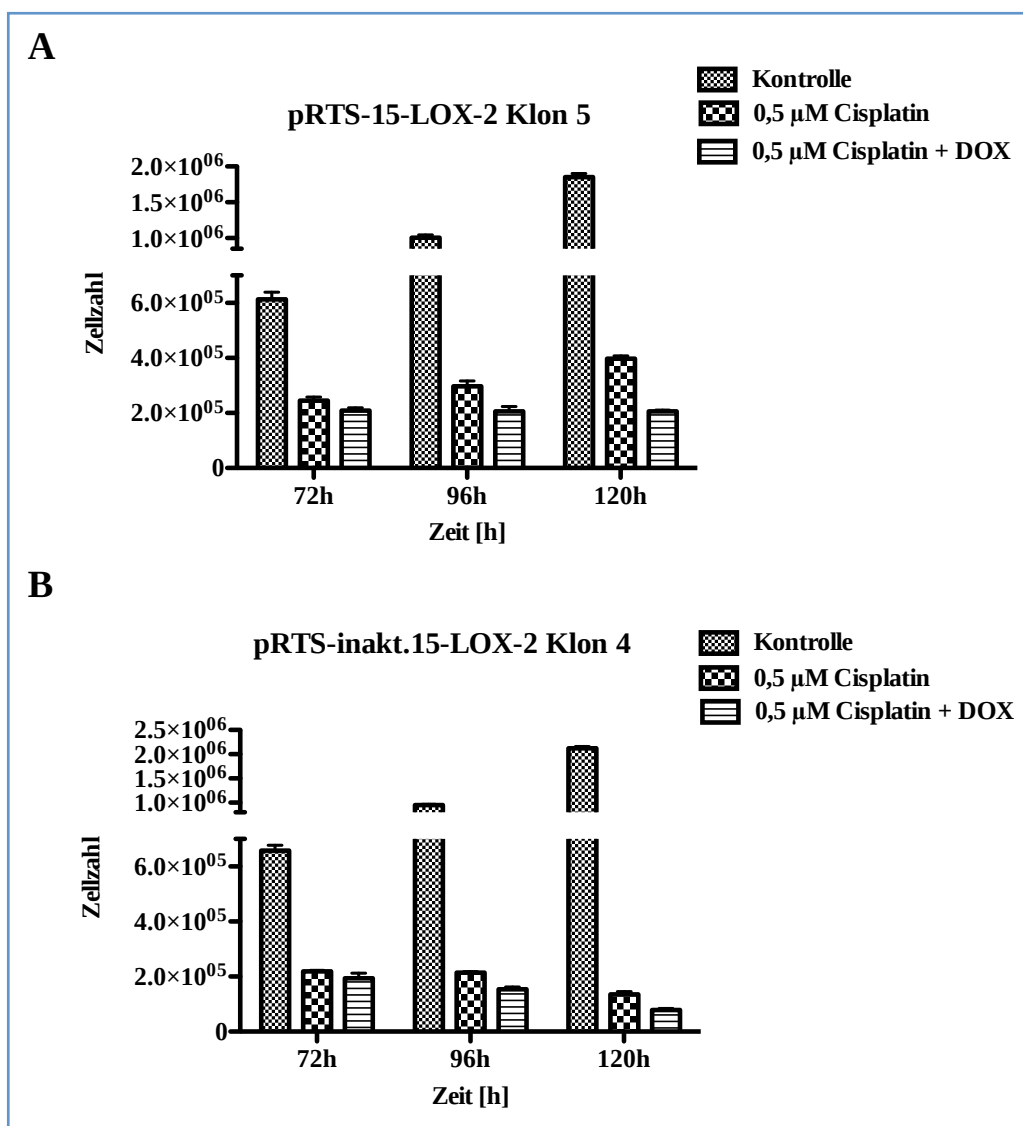


Abbildung 58: Wirkung einer Cisplatin-Kombinationstherapie auf das Wachstum von Panc-1-Zellen. (A) Wachstumskurve des aktiven Klon 5 im zeitlichen Verlauf mit bzw. ohne Behandlung von Cisplatin und Expression von 15-LOX-2. 0,5 µM Cisplatinbehandlung führte zu einer signifikanten Wachstumshemmung. Jedoch kam es im weiteren zeitlichen Verlauf zu einem rezidiven Wachstum. Die zusätzliche Expression von 15-LOX-2 bedingte eine konstante Reduktion der Zellzahl. (B) Im pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 hatte die Behandlung mit Cisplatin einen stärkeren Effekt. Über den untersuchten Zeitraum konnte eine zunehmende Wachstumshemmung detektiert werden. Die zusätzliche Induktion von 15-LOX-2 bewirkte eine zusätzliche signifikante Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Cisplatin. (Student's t Test: $p < 0,01$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung mit den Chemotherapeutika Gemzar oder Cisplatin und gleichzeitiger Induktion der 15-LOX-2-Expression, unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität, eine effizientere Wachstumshemmung bewirkte als eine alleinige Chemotherapeutika-Behandlung. Bei einer Kombinationsbehandlung konnte die Konzentration des Chemotherapeutikums um das 10-fache reduziert werden, ohne einen Verlust an Effektivität zu beobachten, was

insbesondere in Hinblick auf die starken toxischen Nebenwirkungen von Cisplatin eine große Verbesserung für den Patienten darstellen würde.

4.3. Rekonstitution der 15-LOX-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass epigenetische Veränderungen bei der Entstehung und der Progression von Krebs neben den genetischen Aberrationen (Mutationen) von besonderer Bedeutung sind. Die Methylierung von CpG-Inseln sowie die Modifikation von Histonen gehören zu den wichtigsten Regulationsmechanismen der Genexpression auf epigenetischer Ebene. Histonmodifikationen durch Acetylierung oder Methylierung sind in vielen Fällen mit den Methylierungen von CpG-Inseln gemeinsam auftretende Ereignisse dieser epigenetischen Regulationen. Eine übermäßige DNA-Methylierung von Tumorsuppressorgenen, durch welche diese Gene inaktiviert werden, sind initiale Ereignisse in der Tumorgenese. Durch Blockierung der DNA-Methylierung können diese epigenetisch stillgelegten Tumorsuppressorgene wieder reaktiviert werden [135]. Die Expressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass es während der Tumorgenese im Pankreas zu einem Verlust der 15-LOX-2-Expression kommt. In allen untersuchten Tumorzellen war die Expression von 15-LOX-2 vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 21). In vorangegangenen Arbeiten konnte dasselbe Muster für die Expression der 15-LOX-1-Isoform gezeigt werden [120]. In diesen Studien konnte weiterhin durch Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa2 mit Natriumbutyrat (NaBu), ein Histondeacetylase Inhibitor (HDAC-Inhibitor), eine schwache Re-Expression von 15-LOX-1 induziert werden. Dies implementierte, dass die fehlende Expression von 15-LOX-1 in Pankreaskarzinomzellen teilweise auf die Modifikation von Histonen zurückzuführen war. Im Folgenden wurde untersucht, in wieweit der Verlust der 15-LOX-2-Expression in den Pankreaskarzinomzellen auf epigenetisches Silencing zurückzuführen ist, und ob durch Modulierung der epigenetischen Regulations-Mechanismen die Expression wieder hergestellt werden kann.

Zur Überprüfung eines Silencings durch Methylierung wurde der Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und Colo357 auf CpG-Dinukleotid Methylierung untersucht. Des Weiteren wurden die Zellen sowohl mit

den HDAC Inhibitoren NaBu, SAHA sowie Valproat behandelt. Zur Demethylierung wurde 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza) eingesetzt, eine Substanz, die durch Inhibition der DNA-Methyltransferase-Aktivität die DNA-Methylierung blockiert.

4.3.1. Analyse des Methylierungsmuster der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von 15-LOX-2

Zur Untersuchung eines potentiellen Methylierungsmusters von CpG-Dinukleotiden innerhalb des Promotorbereiches von 15-LOX-2 wurde die Java-basierte Software Methprimer verwendet [136]. Mit Hilfe dieser Software konnte zusätzlich die für die Amplifikation der CpG-Inseln benötigten Bisulfit-PCR-Primer *in silico* erstellt werden. Abbildung 59 stellt eine ca. 6,5 kb große 5' flankierende Region des 15-LOX-2-Gens dar, die den gesamten Promotorbereich beinhaltet. Der blau hinterlegte Abschnitt markiert den Teil des Promotorbereiches, in dem besonders viele CpG-Dinukleotide lokalisiert sind, was als CpG-Insel bezeichnet wird. Die Primer zur Amplifikation dieses Bereiches wurden durch die Kürzel F1-F9 (forward) bzw. R1-R9 (reverse) dargestellt.

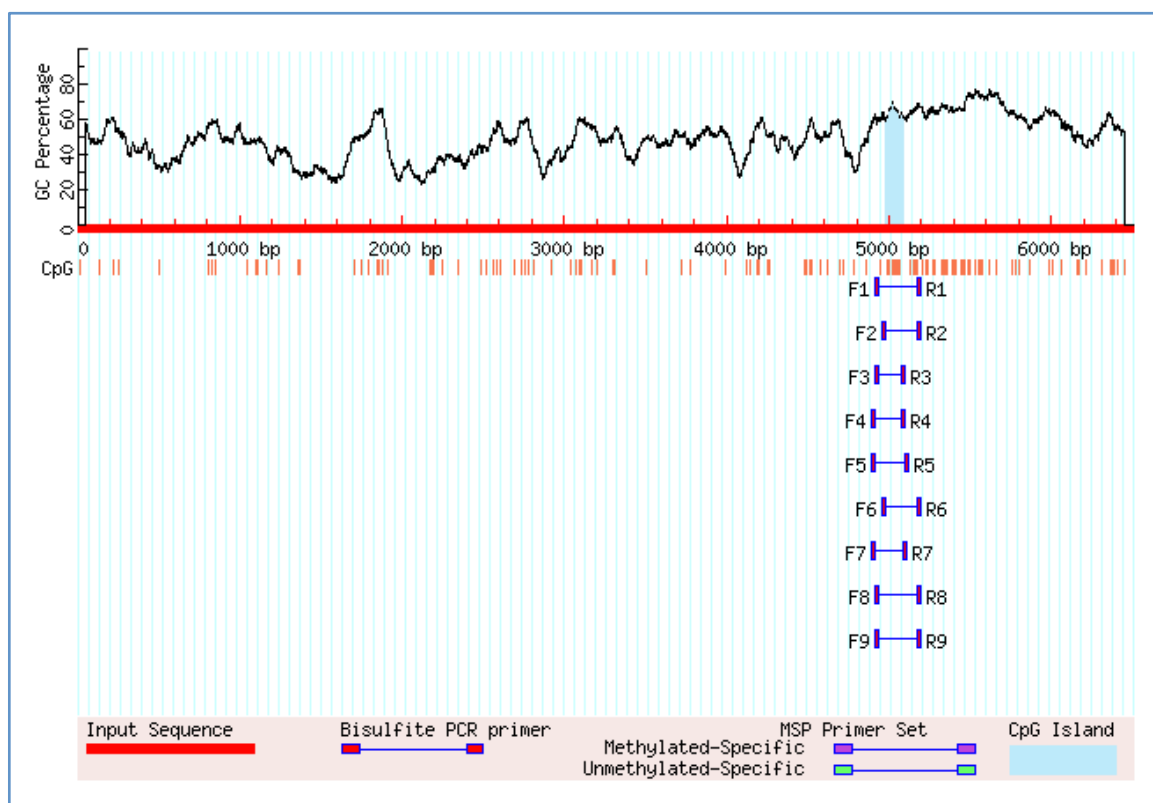
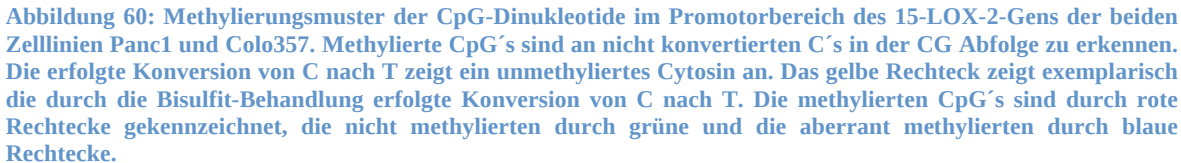


Abbildung 59: Identifizierung einer CpG-Insel im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens. Der blau hinterlegte Bereich der 15-LOX-2-Promotor-Sequenz deutete auf besonders viele CpG's im Promotorbereich hin. Die für die Amplifikation definierten spezifischen Primer sind als F1-F9 bzw. R1-R9 dargestellt.

Von den Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und Colo357 wurde genomische DNA isoliert, mit Bisulfit behandelt (siehe 3.2.3.11) und anschließend mit Hilfe der spezifischen Bisulfit-Primer spezielle Bereiche des 15-LOX-2-Promotorbereichs amplifiziert. Die PCR Produkte wurden nach Klonierung sequenziert. Abbildung 60 stellt den Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide innerhalb des 15-LOX-2-Promotorbereiches in Panc1 und Colo357 dar. Die ermittelten Methylierungsstellen im Promotorbereich der DNA aus Colo357 und Panc1 sind in Abbildung 59 dargestellt. Ausgehend von der 15-LOX-2-Gensequenz (NCBI Datenbank, Stand Dez/2008, Entrez: 247) konnte für den Promotorbereich der beiden untersuchten Zelllinien eine CpG-Dinukleotid-Methylierung an der nicht erfolgten Konversion von C nach T beobachtet werden. Die Panc1 Zelllinie wies mit Ausnahmen von 2 CpG's (Position 5066 und 5153) ausschließlich methylierte CpG-Dinukleotide auf (12/14 Fällen). Im Vergleich dazu waren in Colo357 10 von 14 CpG's methyliert.



4.3.2. Analyse des Methylierungsmusters der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich von 15-LOX-2 nach 5-Aza-Behandlung

Aufgrund des Methylierungsmusters der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens der beiden untersuchten Zelllinien lag die Vermutung nahe, dass die Unterdrückung der 15-LOX-2-Expression durch epigenetische Mechanismen verursacht wurde. Eine gängige Methode zur Demethylierung von DNA stellt die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor der DNA-Methyltransferase 5-Aza-2'-desoxycytidin dar. Die Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und Colo357 wurden 60 Stunden mit 10 μ M 5-Aza inkubiert und die genomische DNA extrahiert. Die Analyse der Methylierungsmuster in der DNA erfolgte analog zum vorangegangenen Abschnitt. In Abbildung 61 ist das Methylierungsmuster des 15-LOX-2-Promotorbereiches der Zelllinien Panc1 und Colo357 vor und nach 5-Aza-Behandlung dargestellt. In der Zelllinie Panc1 waren, analog zur vorangegangenen Untersuchung, 12 der 14 möglichen CpG-Dinukleotide methyliert. Die Behandlung dieser Zellen mit 5-Aza konnte den Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide nicht verändern. Die untersuchte Colo357 Zelllinie wies im Vergleich zu Panc1 aberrant methylierte CpG-Dinukleotide auf, drei der 14 CpG's waren schon vor der Behandlung unmethyliert. Durch die Behandlung mit 5-Aza konnte in 9 der 11 CpG's der Methylierungsstatus revertiert werden.

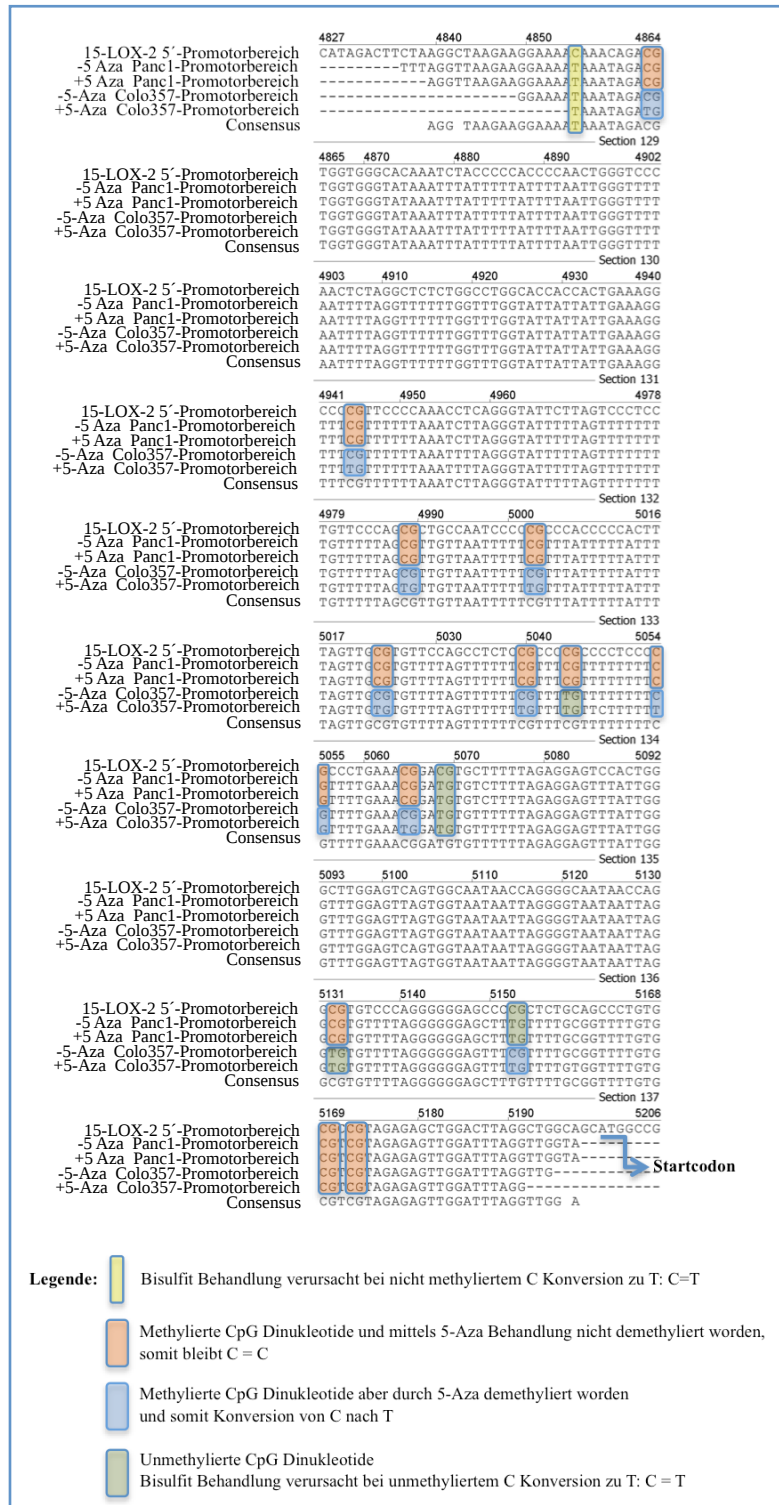


Abbildung 61: Methylierungsmuster der CpG's im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens der Zelllinien Panc1 und Colo357 vor und nach 5-Aza-Behandlung. Methylierte CpG-Dinukleotide waren an unveränderten C's in der CG Abfolge zu erkennen. Die erfolgte Konversion von C nach T zeigt ein unmethyliertes Cytosin an. Die methylierten Dinukleotide sind durch rote Rechtecke gekennzeichnet, die unmethylierten durch grüne und die aberrant methylierten durch blaue Rechtecke. Das gelbe Rechteck zeigt exemplarisch die durch die Bisulfit-Behandlung erfolgte Konversion von C nach T. Durch die 5-Aza-Behandlung wurden die CpG's im Promotorbereich von 15-LOX-2 in der Zelllinie Colo357 bis auf 2 der 11 möglichen Positionen komplett demethyliert. Im Gegensatz dazu konnte in Panc1 eine Behandlung mit 5-Aza keine Demethylierung der untersuchten methylierten CpG's bewirken.

4.3.3. Wiederherstellung der 15-LOX-2-Expression durch Demethylierung des 15-LOX-2-Promotors

Um zu überprüfen, ob die Demethylierung der CpG's durch die Behandlung mit 5-Aza (10 μ M) zu einer Re-Expression von 15-LOX-2 führt, wurden Zellen beider Linien in An- bzw. Abwesenheit von 5-Aza (10 μ M) kultiviert und anschließend Proteinlysate isoliert. Die Immunoblot-Analyse in Abbildung 62 zeigt, dass die Behandlung mit 5-Aza in den Panc1 Zellen keine Re-Expression von 15-LOX-2 zur Folge hatte. Diese Beobachtung deckte sich mit der CpG-Dinukleotid-Methylierungsanalyse von Panc1 im vorangegangenen Abschnitt. Im Gegensatz dazu konnte in Colo357 eine schwache Re-Expression von 15-LOX-2 nach 72-stündiger Behandlung mit 5-Aza beobachtet werden, die im weiteren Analysezeitraum leicht anstieg.

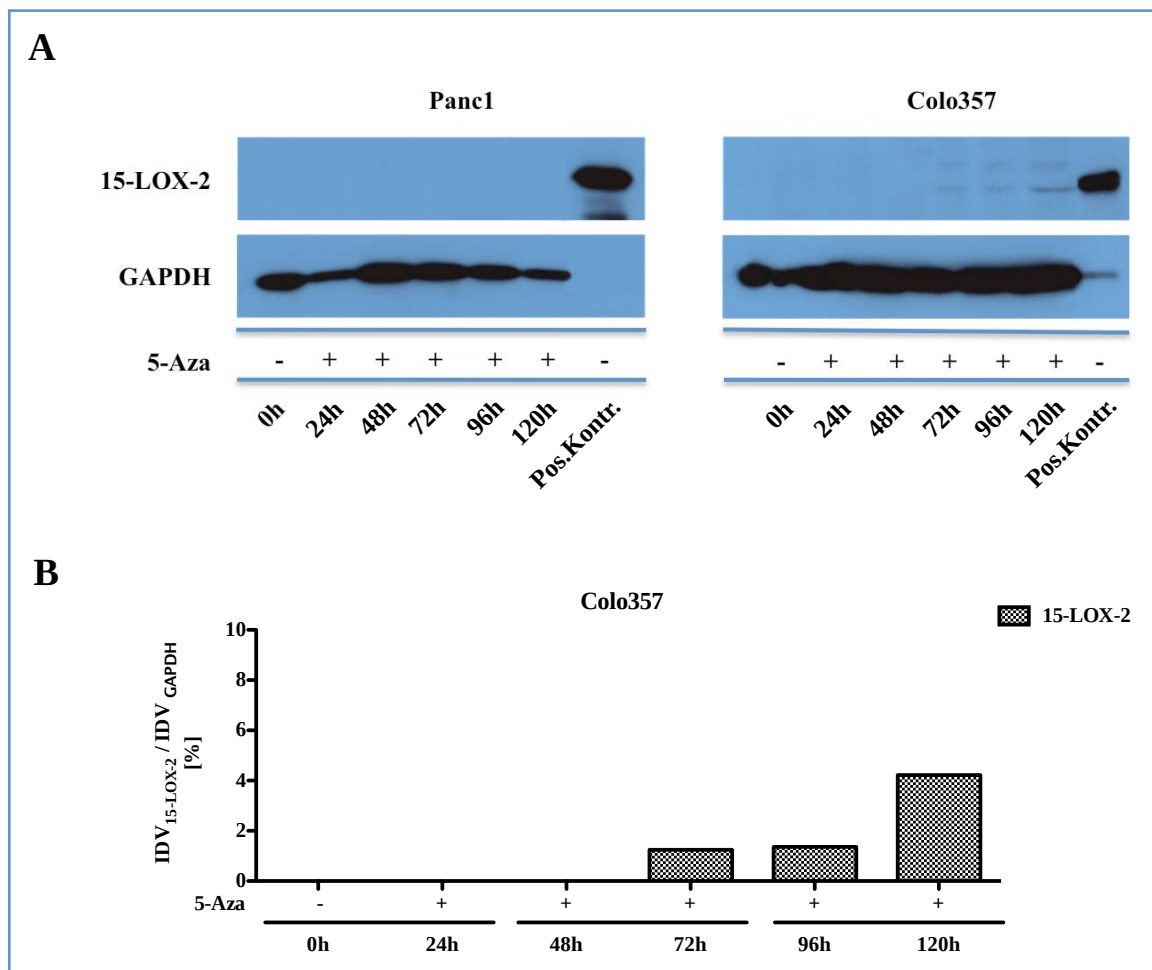


Abbildung 62: Induktion der 15-LOX-2-Proteinexpression durch Demethylierung. (A) Immunoblot-Analyse der 5-Aza-behandelten Tumorzelllinien Panc1 und Colo357. Durch Behandlung mit 5-Aza kam es in Colo357 zu einer schwachen Re-Expression von 15-LOX-2 nach 72-stündiger Behandlung, während in Panc1 Zellen keine Expression von 15-LOX-2 beobachtet werden konnte. (B) Semiquantitative Analyse normiert über GAPDH.

4.3.4. Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen

Die Modifikation von Histonen ist neben der Methylierung von CpG's ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der Genexpression in Zellen. Mit Hilfe von HDAC-Inhibitoren ist es möglich, die posttranslationalen Änderungen der Histone, wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung zu modulieren, um somit die Chromatinstruktur und Genexpression zu beeinflussen. NaBu, SAHA und Valproat sind drei verschiedene HDAC-Inhibitoren, welche zur Histonmodifikation in den Pankreaskarzinomzellen Panc1 und Colo357 verwendet wurden. Die Zellen der beiden Linien wurden mit den unterschiedlichen HDAC-Inhibitoren in Konzentrationen von 1-20 μ M über einen Zeitraum von 120 h behandelt. Diese Behandlungen konnten jedoch die Expression von 15-LOX-2 nicht induzieren. Exemplarisch ist in Abbildung 63 die Behandlung von Panc1 und Colo357 mit 10 μ M Valproat dargestellt. Über den gesamten Analysezeitraum konnte in keiner der beiden Zelllinien eine Expression von 15-LOX-2 detektiert werden.

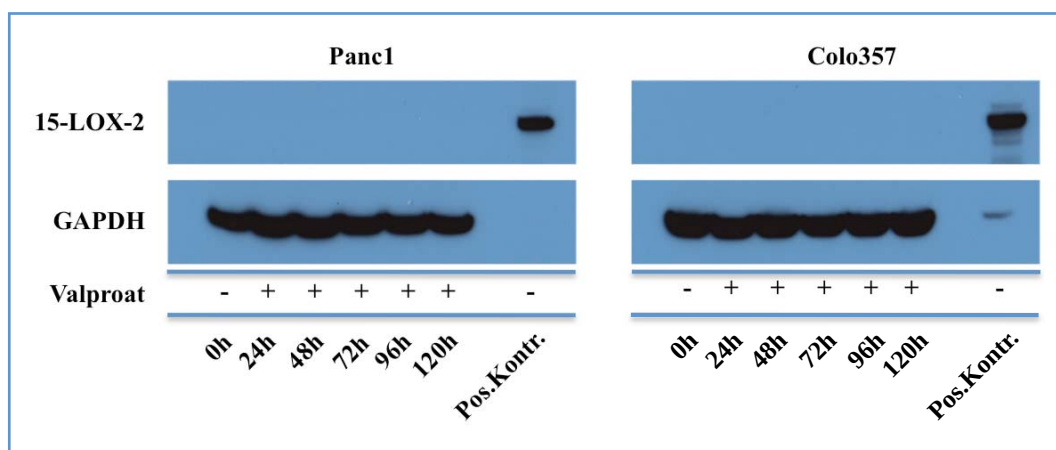


Abbildung 63: Immunoblot-Analyse der Valproat behandelten Tumorzelllinien Panc1 und Colo357. Die Zellen wurden mit bzw. ohne 10 μ M Valproat behandelt. Alle 24h wurden aus den Zellen Proteinlysate gewonnen und für die Western-Blot-Analyse verwendet. Die Behandlung mit Valproat bedingte in keiner der beiden Zelllinien eine Expression von 15-LOX-2.

4.3.5. Additiver Effekt von Valproat in Verbindung mit 5-Aza auf die Re-Expression von 15-LOX-2 in der Zelllinie Colo357

Mit Hilfe von 5-Aza konnte die Hypermethylierung lediglich in Colo357 Zellen revertiert werden, was zu einer schwachen Expression von 15-LOX-2 führte. Eine Behandlung mit HDAC Inhibitoren bedingte weder in Colo357 noch in Panc1 Zelllinien eine Expression von 15-LOX-2 (siehe Abbildung 63). Durch Koinkubation sowohl mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza sowie dem HDAC-Inhibitor Valproat sollte die kombinierte Wirkungsweise auf die epigenetischen Modifikationen untersucht werden. Die Zellen wurden mit 5-Aza (10 μ M) bzw. in Kombination mit 5-Aza (10 μ M) und Valproat (10 μ M) behandelt und nach 60-stündiger Inkubation die Proteinlysate für eine Immunoblot-Analyse verwendet. Aus Abbildung 64 ist ersichtlich, dass in der Zelllinie Panc1 weder durch 5-Aza noch in Kombination mit Valproat eine Expression von 15-LOX-2 detektiert werden konnte. In Colo357 Zellen dagegen war durch die kombinierte Behandlung mit beiden Inhibitoren eine deutliche verstärkte 15-LOX-2-Expression zu beobachten. Die semiquantitative Analyse, normiert über GAPDH, zeigte eine 3-fache Steigerung der 15-LOX-2-Expression durch die kombinierte Inhibitorbehandlung.

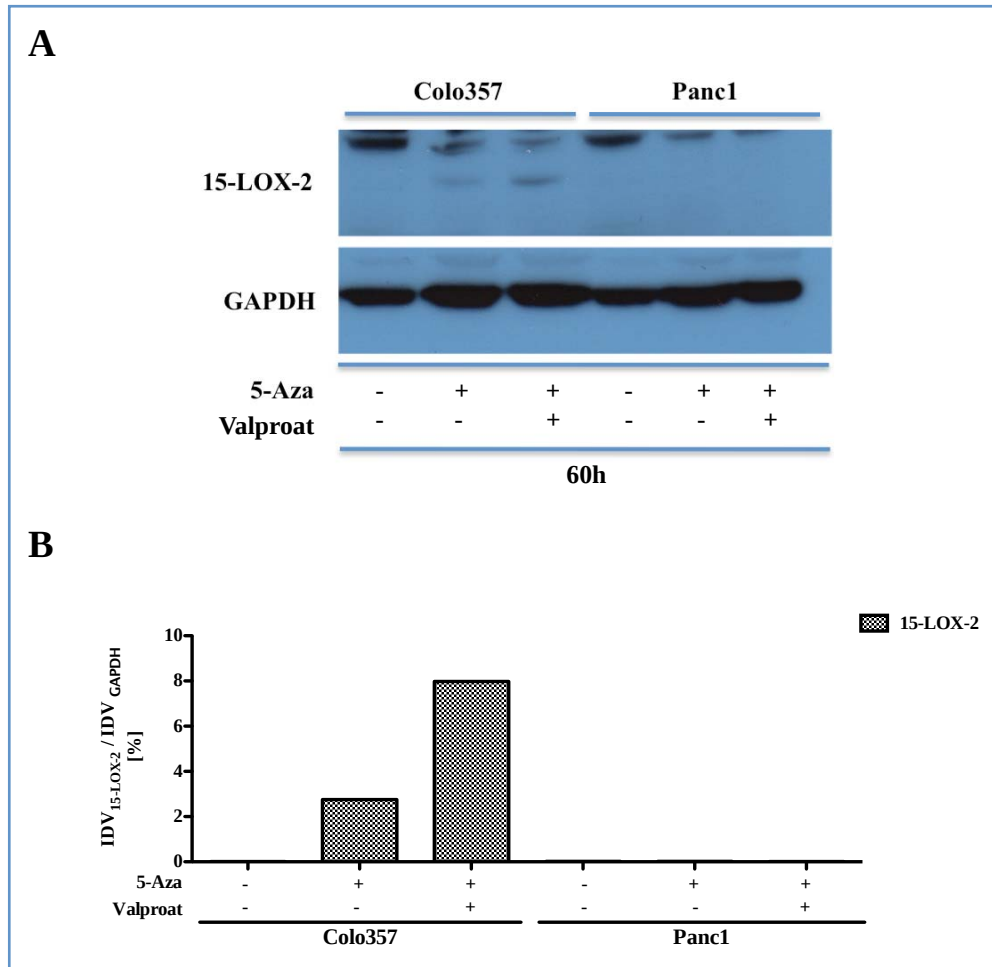


Abbildung 64: (A) Immunoblot-Analyse der 5-Aza und Valproat behandelten Tumorzelllinien Panc1 und Colo357. Die Zellen wurden mit bzw. ohne 10 μ M 5-Aza bzw. 5-Aza+Valproat behandelt. Nach 60h wurden die gewonnenen Proteinlysate für die Immunoblot-Analyse verwendet. Die Behandlung mit 5-Aza führte nur in den Colo357 zu einer schwachen Expression von 15-LOX-2. Die Kombination aus 5-Aza und Valproat führte in der Zelllinie Colo357 zu einer höheren Expression im Vergleich zur alleinigen 5-Aza Behandlung. In den Panc1 Zellen konnte dagegen keine Expression von 15-LOX-2 detektiert werden. (B) Semiquantitative Analyse normiert über GAPDH. Die Analyse des Immunoblots zeigt, dass durch Kombination beider Inhibitoren eine 3-fach höhere Expression von 15-LOX-2 detektiert werden konnte.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass es während der Tumorgenese im Pankreas zu einem Verlust der 15-LOX-2-Expression kommt. Die mit Hilfe eines induzierbaren TET-ON-Systems in Panc1-Tumorzellen erzwungene Expression von 15-LOX-2 führte zu einer Hemmung des Tumorzellwachstums. Diese Hemmung korrelierte mit der Expressionsstärke von 15-LOX-2 und war weitestgehend unabhängig von der katalytischen Aktivität. Die Expression von 15-LOX-2 führte zu einer Steigerung der Tumorzellapoptose, die über eine Hochregulation des Tumorsuppressors p53 vermittelt wurde.

Eine Re-Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen könnte ein Ansatz für eine neue molekulare Therapieoption darstellen. In ersten Versuchen zur Evaluierung dieses Konzeptes konnte gezeigt werden, dass der Expressionsverlust von 15-LOX-2 in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf epigenetischen Modifikationen beruhte. Durch Aufhebung einer Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens und posttranslationale Histonmodifikationen konnte in der Zelllinie Colo357 eine Re-Expression von 15-LOX-2 induziert werden. Die Behandlung der Panc1 Tumorzellen mit dem Cytostatikum Gemzar bei gleichzeitig erzwungener 15-LOX-2-Expression resultierte in einer erhöhten Apoptoserate, wobei durch die induzierte 15-LOX-2-Expression die Cytostatikum-Konzentration ohne Wirkungsverlust auf ein 1/10 gesenkt werden konnte.

Kapitel 5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Todesursache aller Malignome dar. Das fortgeschrittene Pankreaskarzinom hat eine infauste Prognose, bei der sich die Inzidenz und die Mortalität kaum unterscheiden [31]. Da das Pankreaskarzinom keine oder nur sehr wenig uncharakteristische Frühsymptome verursacht, sind ca. 80 - 90 % der Tumoren schon zum Zeitpunkt der Diagnose invasiv und metastasieren. Mit Ausnahme der chirurgischen Resektion sind alle bekannten Therapieoptionen im Anfangsstadium des Pankreaskarzinoms unwirksam, weshalb neue effektive Kombinations-Therapien benötigt werden, um den Patienten einen Ausblick auf Heilung zu ermöglichen. Dazu müssen zusätzlich Risikofaktoren genauer evaluiert und die Frühdiagnostik verbessert werden. So konnten u.a. Adipositas und ein hoher Konsum an ω -6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren als hohe Risikofaktoren identifiziert werden. Der oxidative Fettstoffwechsel und insbesondere der Eicosanoid-Metabolismus spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese. Lipoxygenasen (LOX) sind Schlüsselenzyme des Eicosanoid-Metabolismus und könnten wertvolle Ansatzpunkte für Früherkennung, Prävention und Therapie des Pankreaskarzinoms darstellen. Beim Menschen sind sechs verschiedene Lipoxygenase-Isoformen bekannt, die alle ein spezifisches Expressionsmuster aufweisen und unterschiedliche Funktionen ausüben. Zahlreiche klinische Untersuchungen von humanen Tumorbiopsien und Studien mit Tiermodellen können richtungweisend den verschiedenen Lipoxygenasen sowohl pro- als auch anti-tumorigene Eigenschaften zuweisen. Am besten untersucht sind die Funktionen der 5-LOX und der Blutplättchen-12-LOX (*p*12-LOX). Für beide LOXn konnte gezeigt werden, dass sie in einer Vielzahl von Tumoren des Kolon, Ösophagus, Lunge, Prostata, Haut und auch des Pankreas prokarzinogene Funktionen besitzen. Während sowohl 5-LOX als auch *p*12-LOX im gesunden Gewebe nicht exprimiert sind, kann deren Expression durch proinflammatorische Stimuli induziert werden. Im Tumorgewebe sind beide LOXn konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu gelten die 12-LOX, 15-LOX-1 und 15-LOX-2 als antikarzinogen, da sie im gesunden Normalgewebe exprimiert sind, ihre Expression während der Tumorgenese jedoch unterdrückt wird. Die 15-LOX-2 weist im Gegensatz zu allen anderen LOXn ein sehr eingeschränktes Expressionsmuster auf. Sie konnte bis jetzt nur in der Haut, der Lunge und Prostata sowie in der Kornea nachgewiesen werden [81]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals auch eine Expression im Pankreas nachgewiesen werden, wobei ein

umfassendes Expressionsprofil der 15-LOX-2 im Pankreas und seinen Malignomen erstellt wurde. Da bisher nur geringe Kenntnisse über die physiologische Bedeutung der 15-LOX-2 existieren, sollte diese Arbeit auch dazu beitragen, mit Hilfe von induzierbaren Expressionssystemen erste Einblicke in die Funktion der 15-LOX-2 im Pankreas und bei der Pankreaskarzinogenese zu gewinnen.

5.1. Verlust der 15-LOX-2-Expression während der Pankreaskarzinogenese

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Darstellung der Lokalisation von 15-LOX-2 auf Proteinebene mittels Immunhistochemie. Diese Analyse liefert lediglich die Möglichkeit einer qualitativen Beurteilung der 15-LOX-2-Expression, eine quantitative Bestimmung des Proteingehaltes ist hier nicht gegeben. Dennoch möglich ist eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse mittels eines histologischen Gradings der Färbung. Das angewandte Grading ist im Pathologischen Institut der Ruprecht-Karls Universität etabliert und wurde auf die hier untersuchten histologischen Präparate übertragen. In normalen gesunden Gängen des Pankreas konnte durchgehend eine zytoplasmatische Expression von 15-LOX-2 in den Gangzellen beobachtet werden. Nukleäre Färbungen waren in keinem der analysierten Gewebeschnitte evident. Das umliegende azinäre Gewebe wies eine durchgehend fokal heterogene Expression auf. In den Inselzellen dagegen konnte überwiegend eine positive Färbung und somit die Expression von 15-LOX-2 nachgewiesen werden.

Der Ursprung des duktaalen Adenokarzinoms ist bis jetzt noch ungeklärt. Einerseits gibt es Indizien für einen Ursprung aus Inselzellen, andererseits vermuten viele Forschungsgruppen den Ursprung des Karzinoms in duktaalen Zellen und weisen dabei auf die vielen Übereinstimmungen zwischen Karzinomzellen und duktaalen Zellen hin [51; 52; 53]. Ein Vergleich zwischen gesunden und malignen Geweben sollte daher bis zur endgültigen Klärung des Ursprungs beide Entitäten in Betracht ziehen. Der Vergleich zwischen duktaalen Zellen des gesunden Pankreasgewebes und Karzinomzellen zeigt, dass die oben beschriebene Expression von 15-LOX-2 signifikant reduziert ist und in vielen untersuchten Präparaten vollständig fehlte. Zudem konnte gegenüber den gesunden duktaalen Zellen auch eine starke nukleäre Kernfärbung in Karzinomzellen beobachtet werden, was im Hinblick

auf die zellulären Funktionen der 15-LOX-2 im Folgenden noch näher diskutiert wird. In den untersuchten PanIN-Stadien konnte ebenfalls ein kontinuierlicher Verlust der 15-LOX-2-Expression festgestellt werden. Die Expression von 15-LOX-2 verhält sich in den untersuchten Geweben reziprok zum Grad der einzelnen PanIN-Stadien. Mit zunehmendem Schweregrad der Läsionen kommt es zu einer kontinuierlichen Reduktion der 15-LOX-2-Expression. Auch in den Inselzellen war eine starke Reduktion von 15-LOX-2 während der Karzinogenese zu beobachten. Während in gesunden Geweben mehr als 64% aller untersuchten Inselzellen positiv für die Färbung des 15-LOX-2-spezifischen Antikörpers sind, sind es im malignen Gewebe gerade noch 9%.

Zusammenfassend konnte somit unabhängig von der Entität des duktales Pankreasadenokarzinoms gezeigt werden, dass die Expression von 15-LOX-2 im Pankreasgewebe während der Karzinogenese stark reduziert und teilweise gänzlich unterdrückt wird. Dies konnte auch *in vitro* für eine Vielzahl von Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt werden. Keine der 10 untersuchten Karzinomzelllinien wies auf transkriptioneller oder translationaler Ebene eine Expression von 15-LOX-2 auf. Bei verschiedenen Untersuchungen von Karzinomzelllinien aus anderen epithelialen Gewebe wie Lunge und Prostata wurde ebenfalls im Vergleich zum gesunden Gewebe eine Unterdrückung der 15-LOX-2-Expression nachgewiesen [8; 123]. Das Expressionsmuster von 15-LOX-2 in den verschiedenen Tumorzelllinien spiegelt somit die *in vivo* Situation wieder, wenn auch Gewebekulturartefakte als Grund für eine Unterdrückung der 15-LOX-2-Expression in solchen etablierten Zelllinien nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen 15-LOX-2 Expression und dem Differenzierungsstatus der Tumore beobachtet werden. Mit steigender Entdifferenzierung eines Tumors ging eine signifikant geringere Expression von 15-LOX-2 einher.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien von 15-LOX-2 im Pankreas stimmen sehr gut überein mit denen ähnlicher Studien in der Prostata. Die Arbeitsgruppe um Tang konnte in sogenannten „prostate-intraepithelial-neoplasia“ (PIN), den PanINs des Pankreas analoge Neoplasien in der Prostata (siehe 1.3.3), zeigen, dass die Expression von 15-LOX-2 in den sekretorischen Gangzellen sehr stark reduziert war und im Tumorgewebe in mehr als 50 % der untersuchten Fälle fehlte. Ebenso waren alle untersuchten Tumorzelllinien der Prostata frei von 15-LOX-2, während frühe Passagen primärer epithelialer Prostatazellen noch häufig 15-LOX-2 exprimierten

[8; 123]. Da primäre Zelllinien des Pankreas für unsere Untersuchungen nicht zur Verfügung standen, konnten analoge vergleichende Analysen in Pankreaszellkulturen nicht durchgeführt werden. Außer in Tumoren der Prostata, Lunge und Kornea wurde eine Supprimierung von 15-LOX-2 auch in Tumoren der Hautanhangsorgane (Schweiß- und Fettdrüsen) sowie im Ösophaguskarzinom beschrieben [137; 138]. In Lungengewebe konnte Gonzalez zeigen, dass in den großen Alveolarzellen (Pneumozyten Typ II) eine eindeutige Expression von 15-LOX-2 vorhanden war, während diese im Verlauf der Karzinogenese auf 50 % reduziert wurde. Auch hier korrelierte die Expression mit dem Differenzierungsstatus der Tumore: je undifferenzierter ein Tumor, desto geringer seine Expression [113].

Damit scheint für 15-LOX-2 exprimierende Epithelien allgemein zu gelten, dass der Prozess der Karzinogenese mit einem frühen Verlust der Expression dieser Lipoxygenase einhergeht, was auf eine antikarzinogene Funktion der 15-LOX-2 hinweist.

Des Weiteren war in den immunhistochemischen Analysen der unterschiedlichen Pankreasgewebe eine starke Expression von 15-LOX-2 in den Entzündungsarealen innerhalb des Tumorgewebes aber auch der chronischen Pankreatitis nachzuweisen. Makrophagen zeigten hier eindeutig eine positive Färbung für 15-LOX-2. Eine Expression von 15-LOX-2 in Makrophagen wurde erstmals 2004 durch Rydberg beschrieben [139]. Die Funktion der 15-LOX-2 in Entzündungscleistern ist bis jetzt wenig untersucht, doch konnten Danielsson und Rydberg 2008 zeigen, dass die Expression von 15-LOX-2 zu einer Sekretion der Chemokine CXCL10 und CCL2 führte, was wiederum in einer gesteigerten T-Zellmigration und Gewebsinfiltration mündet [139; 140]. Somit könnte der 15-LOX-2-Expression in Makrophagen eine immunstimulierende Wirkung zugeschrieben werden. Andererseits ist die desmoplastische Reaktion bei Pankreastumoren sehr ausgedehnt und häufig von Entzündungsinfiltraten begleitet [141; 142]. Im Hinblick auf die Wachstums- und die Proliferations-hemmende Wirkung von 15-LOX-2 (siehe 5.2) und dessen lokalem Mediator 15S-HETE könnte der Expression in Makrophagen zusätzlich zur Chemotaxis eine tumorhemmende Wirkung zukommen. Da die Inaktivierung des 15-LOX-2-Gens offensichtlich ein frühes Ereignis in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms darstellt, könnte 15-LOX-2 in Makrophagen einer raschen und invasiven Ausbildung des Tumors sowie der begleitenden desmoplastischen Reaktion entgegen wirken.

5.2. Antitumorigene Effekte und zelluläre Funktionen von 15-LOX-2

Der beobachtete Verlust der Expression in den Pankreastumoren lässt vermuten, dass 15-LOX-2 im Pankreas eine wachstumshemmende, antitumorigene Funktion besitzt. In Vorversuchen mit transienten Transfektionen konnte eine solche wachstumshemmende Wirkung von 15-LOX-2 in verschiedenen Pankreaskarzinomzellen bestätigt werden.

Um die Rolle von 15-LOX-2 bei der Pankreaskarzinogenese genauer untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *in vitro* 15-LOX-2-Expressionsmodelle etabliert. Für eine effiziente Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie für weiterführende mechanistische Studien unter konstanten und kontrollierbaren 15-LOX-2-Expressionsbedingungen wurde in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 induzierbare TET-ON-Expressionssysteme etabliert. Zu Beginn wurde das klassische 2-Vektor-System verwendet, welches jedoch durch seine basale Leckexpression und die Instabilität des CMV-Promotors große Nachteile aufwies. Der CMV-Promotor ist ein sehr starker Expressions-Promotor und wird daher in vielen eukaryontischen Expressionssystemen verwendet [143]. Dennoch kommt es abhängig von Umgebung und System *in vivo* als auch *in vitro* sehr häufig zur Inaktivierung der Promotoraktivität durch CpG-abhängige und CpG-unabhängige Methylierungen [144; 145]. So konnte beim klassischen System bereits zu Beginn der Versuche eine basale Leckexpression in beiden untersuchten Klonen festgestellt werden (siehe Abbildung 26). Darüber hinaus reduzierte sich die Induzierbarkeit des Systems kontinuierlich bis schließlich überhaupt keine Expression von 15-LOX-2 mehr detektiert werden konnte. Von entscheidendem Nachteil war jedoch, dass die basale Leckexpression von 15-LOX-2, unter dem Aspekt des Wachstums-hemmenden Einflusses von 15-LOX-2, von Anfang an zu einer negativen Selektion der kultivierten Zellen zugunsten Antibiotika resistenter Zellen führte, welche aufgrund der progressiven Promotorinaktivierung 15-LOX-2 nicht weiter exprimierten. Diese Zellen überwuchsen die ursprünglichen Klone, die sich durch den Wachstumsnachteil der 15-LOX-2-Leckexpression signifikant langsamer replizierten und abstarben. Das im weiteren Verlauf verwendete pRTS-TET-ON-System wies keine dieser Nachteile auf. Dank einfacher 1-Vektor-Strategie und modifizierter Promotoren sowie zusätzlichen Aktivatoren und Repressoren (siehe 3.2.6.11) konnte sowohl die Leckexpression minimiert, als auch die Stabilität und Reinheit der induzierbaren zellulären Klone optimiert werden. Langzeit-Untersuchungen zeigten, dass auch nach 50 Passagen in

Kultur die Expressionsstärke der Klone nahezu gleich blieb und somit das pRTS-TET-ON-System für dauerhaft qualitativ reproduzierbare Analysen besser geeignet war als das klassische TET-ON-System. Im Rahmen dieser Arbeit standen somit gezielt induzierbare LOX-exprimierende Pankreaskarzinomzellen zur Verfügung.

Zur genauen funktionellen Analyse von 15-LOX-2 wurden stabile induzierbare Klone sowohl mit der enzymatisch aktiven 15-LOX-2 als auch mit einer enzymatisch inaktiven Mutante etabliert. Die Induktion der aktiven und erstaunlicherweise auch der inaktiven Klone von Panc1 führte nach kürzester Zeit zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl sowie Hemmung der Proliferation (siehe Abbildung 39 - Abbildung 41). Das Ausmaß der Hemmung korrelierte mit der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expressionsstärke der einzelnen Klone. Die enzymatische Aktivität des Enzyms hatte demnach auf die Hemmung nur einen partiellen Einfluss. Interventionsstudien mit dem LOX-Inhibitor NDGA beim aktiven Klon 5 sowie die exogene Zugabe von 15S-HETE beim inaktiven Klon 4 bestätigten diese Beobachtungen und ließen den Schluss zu, dass die katalytische Aktivität nur einen ca. 10 %-igen additiven Einfluss auf die Wachstumshemmung hatte. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Untersuchungen in epithelialen Prostatazellen (NHP) und Prostatakarzinomzellen (PC3) gemacht werden [10]. Mittels verschiedener Splice-Varianten von 15-LOX-2, welche in NHP-Zellen erstmals beschrieben wurden, konnte gezeigt werden, dass die enzymatisch inaktiven Spliceformen, dieselben wachstumshemmenden Eigenschaften aufwiesen wie das aktive Enzym [10; 121; 122]. Vorangegangene Studien in unserem Labor zur Funktion von 15-LOX-2 und deren orthologe Mausform 8-LOX in der Haut zeigten im Gegensatz dazu, dass die LOX-vermittelte Wachstumshemmung in prämaligen Mauskeratinozyten ausschließlich von der enzymatischen Aktivität beider LOX-Formen abhing [130]. Diese Beobachtungen belegen, dass die wachstumshemmende Wirkung von 15-LOX-2 sowohl über sein enzymatisches Produkt 15S-HETE als auch durch das Protein selbst ausgelöst werden kann. Speziesunterschiede oder Gewebsunterschiede mögen dafür verantwortlich sein, welcher Signalweg zum Einsatz kommt.

Worauf war aber die verringerte Zellzahl bzw. die Wachstumshemmung zurückzuführen? Tang hat in seinen Arbeiten über die Rolle von 15-LOX-2 in der Prostata gezeigt, dass eine forcierte Expression von 15-LOX-2 in Prostataepithelzellen zur Induktion von zellulärer Seneszenz führt, und hat die Hypothese aufgestellt, dass 15-LOX-2 in diesen Zellen als negativer Zellzyklusregulator fungiert [122; 123]. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar

in den 15-LOX-2-exprimierenden Pankreaskarzinomzellen eine Seneszenz-ähnliche Morphologie beobachtet werden, jedoch verlief der Nachweis der Seneszenz-assoziierten SA- β -Galaktosidase negativ. Allerdings ist ein Nachweis der SA- β -Galaktosidase nicht ausreichend spezifisch, um als ubiquitärer Seneszenzmarker zu gelten [146]. Somit bleiben weitere Analysen zur Abklärung einer 15-LOX-2-induzierten Zell-Seneszenz durchzuführen. In Mauskeratinozyten konnte die LOX-vermittelte Wachstumshemmung auf einen Block der DNA-Synthese zurückgeführt werden [130]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen mittels FACS sowie Immunoblot-Analysen für die Cycline B, D und E ergaben keinen eindeutigen Aufschluss über einen möglichen 15-LOX-2-induzierten Zellzyklus-Arrest in den Pankreaskarzinomzellen. Auch hier sollten weitere Analysen zur endgültigen Abklärung durchgeführt werden.

Ein weiterer, im Rahmen dieser Arbeit, noch nicht untersuchter Signalweg, der bei Zellzahlreduktion und Induktion von Wachstumshemmung eine Rolle spielen könnte, verläuft über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Mauskeratinozyten haben gezeigt, dass die 15-LOX-2-vermittelte Produktion von 15S-HETE mit einer erhöhten ROS-Produktion einhergeht und eindeutig an der Wachstumshemmung beteiligt ist [130]. Des Weiteren konnte in myeloiden Leukämiezellen gezeigt werden, dass sowohl 15S-HETE als auch 13S-HODE an der Bildung von ROS beteiligt sind und dadurch die Apoptoserate gesteigert wird [147]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Geweben angestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion von ROS eine katalytische Aktivität des Enzyms voraussetzt. Da die hier in Pankreaskarzinomzellen beobachteten 15-LOX-2-vermittelten Effekte weitestgehend unabhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms waren, wurde ein ROS-vermittelter Mechanismus nicht weiter in Betracht gezogen.

Ein weiteres relevantes Netzwerk in der Vermittlung von Wachstumshemmung und hohem Zellzahlverlust stellt die Apoptose dar, welche anhand der positiven AnnexinV-Färbung als mögliche Ursache für die Reduktion der Zellzahl identifiziert werden konnte. Erste Analysen mit gebräuchlichen TUNEL-Tests lieferten dagegen keine eindeutigen Aussagen, da das simultan exprimierte GFP des Vektorkonstruktes die FACS-Analysen kompromittierte. In den AnnexinV-Apoptose-Analysen wies der aktive Klon pRTS-15-LOX-2 Klon 5 mit 36,6 % eine durchschnittlich 10-15 % größere frühapoptotische Zellpopulation auf als der inaktive Klon 4, was darauf hindeutet, dass ein Teil der pro-apoptotischen Effekte durch 15-LOX-2-Metabolite vermittelt sein könnte.

Wie in verschiedenen Arbeiten mit menschlichen Kolonkarzinomzellen, myeloiden Leukämiezellen und Epithelzellen der Kornea gezeigt, kann der Arachidonsäuremetabolit 15S-HETE in der Tat Apoptose auslösen [147; 148; 149]. Die Beteiligung von apoptotischen Prozessen bei der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung in den Pankreaskarzinomzellen muss allerdings durch weitere Analysen bestätigt und präzisiert werden.

Nach der Identifikation von Apoptose als mögliche Ursache der 15-LOX-2-induzierten Wachstumshemmung in Panc1 blieb jedoch die Frage offen, über welche Netzwerke die 15-LOX-2-induzierten Signale vermittelt werden. Für LOX-Metaboliten-vermittelte Effekte sind bisher mehrere Signalwege identifiziert worden, einer davon läuft über die Aktivierung von Kernrezeptoren der Familie der Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR). So konnten diverse Arbeitsgruppen 15S-HETE als endogenen Liganden von PPAR- γ identifizieren [8; 9; 112; 137; 150]. Dabei besteht allerdings zwischen 15-LOX-2-Expression und PPAR- γ eine inverse Korrelation. 15-LOX-2 supprimiert die Expression von PPAR- γ im Normalgewebe und unterdrückt die Proliferation, während der Verlust von 15-LOX-2 im Laufe der Karzinogenese vieler epithelialer Tumore mit einer verstärkten Expression von PPAR- γ , und folglich einer gesteigerten Proliferation einhergeht. Diese inverse Korrelation wurde inzwischen in vielen hämatopoetischen Malignomen [151; 152] sowie Tumoren des Pankreas [153] und anderen Entitäten (Kolon-, Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinom [154; 155; 156]) beobachtet. Die verstärkte Expression von PPAR- γ in den oben genannten Malignomen - auch des Pankreas - könnte für die Suppression der 15-LOX-2-Expression während der Karzinogenese im Pankreas und den anderen Epithelien assoziiert sein.

Weitere *in vitro* Studien konnten zeigen, dass neben 15S-HETE auch 13S-HODE als endogener Ligand von PPAR γ fungieren kann [112]. Für beide Metaboliten wurden in Prostata Tumoren entgegengesetzte Wirkungen in Bezug auf die Interaktion mit PPAR- γ beschrieben [157]. 13S-HODE erhöht die Phosphorylierung von PPAR γ , während 15S-HETE die Phosphorylierung supprimiert. Diese Beobachtungen entsprechen auch dem gegenwärtigen Konsens, dass PPAR- γ je nach Gewebe und den jeweiligen Wachstums- und Differenzierungsbedingungen entweder pro- oder anti-tumorigen wirken kann. Neben einer Interaktion mit PPAR- γ können die 15-LOX und deren Metabolite 15S-HETE und 13S-HODE auch die MAP-Kinase Signalwege unterschiedlich

beeinflussen. Von Yoshinaga wurde gezeigt, dass 13S-HODE die Phosphorylierung von ERK 1/2 induziert, was in Folge die Expression von p21^{Cip/WAF1} supprimiert und die Proliferation von Kolonkarzinomzellen stimuliert [114]. In Prostatatumoren supprimiert 15S-HETE den ERK 1/2- sowie den AKT-Signalweg und wirkt daher tumorhemmend, während 13S-HODE diese Signalwege stimuliert und somit tumorfördernd wirken kann [157].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben deutlich gezeigt, dass bei der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung in den Pankreaskarzinomzellen der enzymatischen Aktivität nur ein kleiner additiver Effekt zugeschrieben werden kann. Somit reduziert sich in diesem Fall die vorwiegende Signalweiterleitung auf direkte Protein-Protein Wechselwirkungen von 15-LOX-2 mit noch zu identifizierenden Interaktionspartnern. In diesem Kontext deutet die in Gewebsschnitten von Pankreaskarzinomen beobachtete Verlagerung der 15-LOX-2 vom Zytoplasma in den Kern und die nukleäre Lokalisation des DOX-induzierten 15-LOX-2-Proteins in den Pankreaskarzinomzellen auf eine nukleäre Funktion und impliziert eine mögliche Aktivität der 15-LOX-2 als Cofaktor bei transkriptionellen Prozessen.

In ersten Versuchen in unserem Labor zur Detektion potentieller 15-LOX-2-Interaktionspartner konnten mit der Yeast-Two-Hybrid-Methode unter anderem der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierte Faktor 5 (TRAF 5) identifiziert werden. Über TRAF 5 und seine Funktionen sind bisher nur wenige Untersuchungen angestellt worden. Bekannt ist, dass TRAF 5 strukturelle Elemente wie eine RING- und Zinkfinger-Domäne besitzt und ein weiterer Interaktionspartner im NF- κ B- sowie JNK-Signalweg darstellt [158]. TRAF-Proteine sind generell an Stress-induzierten Antworten und dem programmierten Zelltod beteiligt [159]. Zur genaueren Verifizierung einer Interaktion von 15-LOX-2 mit TRAF 5 müssen weitere *in vitro* Kollokalisationsstudien in Form von Immunpräzipitations- und Immunfluoreszenz-Analysen folgen. Eine weitere Möglichkeit um Protein-Protein-Interaktionspartner zu identifizieren, ist die funktionelle Isolierung von 15-LOX-2-Interaktionspartnern über 15S-HETE mittels spezieller, synthetisch hergestellter „small molecules“ [160].

Mittels eines sogenannten „TF-Chip-MAPK-Assays“ konnten in 15-LOX-2-exprimierenden Panc1 Zellen mehrere aberrant aktivierte Transkriptionsfaktoren detektiert werden (siehe Abbildung 47). Hervorstechend war dabei die Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Humanes p53, auf Chromosom 17p13.1, kodiert für ein nukleäres

Phosphoprotein von 53 kDa. Zusammen mit p63 und p73 bildet es eine hoch konservierte Genfamilie von multifunktionalen Transkriptionsfaktoren, welche bei der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Integrität und des Zellüberlebens bei DNA-Schäden, bei der Regulation der Apoptose, der Reduktion der Zellproliferation sowie Induktion von Senseenz eine wichtige Rolle spielen [134; 161; 162; 163]. Diese Kontrollfunktionen sind wesentlich für die genetische Stabilität sowie für die Verhinderung von zellulärer Transformation. Eine mögliche Signalweiterleitung über p53 ist abhängig von einer Proteinstabilisierung. Unter Normalbedingungen liegt in der Zelle p53 in sehr niedriger Konzentration vor. Durch die unterschiedlichsten Stresssignale oder Dysregulationen von Netzwerken kommt es durch Phosphorylierung von p53 am N-terminalen Ende zu einer Proteinstabilisierung durch Tetramerisierung. Mdm2 als negativer Regulator von p53 ist nun nicht mehr in der Lage p53 zu binden und mittels Ubiquitinierung den proteolytischen Abbau zu initiieren [164; 165]. In Abhängigkeit vom Zellzyklus liegt eine unterschiedliche Konformation und Phosphorylierung von p53 vor [166]. Die Proteinstabilisierung führt zu einem Anstieg der internen p53-Konzentration und der transkriptionellen Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden für den Zellzyklusarrest (p21^{CIP}, GADD45) oder die Apoptose (NOXA, Bax, Puma). Neuere Daten belegen aber auch eine Funktion von p53 bei der Auslösung von Apoptose durch direkte Protein-Protein Interaktion.

Neben der Detektion von aktiviertem p53 konnte durch Immunoblot-Analyse eine hohe Expression des p53-Proteins detektiert werden. Der hohe Proteinlevel war nicht bedingt durch eine post-translationale Proteinstabilisierung, sondern durch Hochregulation der p53-mRNA. Die transkriptionelle Kontrolle von p53 ist komplex und bisher noch relativ wenig verstanden. Studien haben unter anderem eine Aktivierung der p53-Transkription durch sein eigenes Genprodukt und durch p73 sowie durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gezeigt [167; 168]. An einer posttranskriptionellen Hochregulation von p53 ist häufig die DNA-PK, ATM, ATR und die SAP/JNK-Signalkaskade involviert. Über letzteren Signalweg kann auch die beobachtete Hochregulation von c-Jun vermittelt werden. Der JNK-Signalweg wird als negativer Regulator der Zellproliferation beschrieben und ist mit der Induktion von Apoptose assoziiert [169; 170]. Über MEKK1 vermittelt JNK die Phosphorylierung von p53, inhibiert dadurch eine Interaktion mit Mdm2 und verlängert somit die Halbwertszeit von p53 von 20 min auf bis zu zwei Stunden [171]. Erste Untersuchungen der SAP/JNK-Signalkaskade im Rahmen dieser Arbeit konnten keine eindeutige Bestätigung für eine Beteiligung dieses Signalweges bei der

p53-Aktivierung erbringen, weshalb gegenwärtig weitere Versuche mit spezifischen JNK-Antagonisten unternommen werden.

Die Aktivierung des p53-Signalweges spielt auch eine entscheidende Rolle bei der durch die 15-LOX-1-Isoform vermittelten Wachstumshemmung. So konnte die Arbeitsgruppe um Thomas Eling jüngst zeigen, dass in Kolonkarzinomzellen die Expression von 15-LOX-1 via Phosphorylierung von p53 durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), zu einer p53-abhängigen Wachstumshemmung führt [172]. Wie in der vorliegenden Arbeit für 15-LOX-2 gezeigt, war auch die 15-LOX-1 induzierte Wachstumshemmung unabhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms [173]. Im Gegensatz zu meinen Beobachtungen in Pankreaskarzinomzellen ging die Aktivierung des p53-Signalweges in den Kolonkarzinomzellen nicht mit einer Hochregulation von p53 auf transkriptioneller- oder auf translationaler Ebene einher. Stattdessen wurde eindeutig gezeigt, dass 15-LOX-1 eine erhöhte Phosphorylierung von p53 an Ser¹⁵ bedingte.

Meine Ergebnisse der TF-Chip-MAPK-Analyse bestätigen ebenfalls indirekt eine 15-LOX-2-bedingte Phosphorylierung von p53, da das Prinzip des Assays ausschließlich auf der Detektion aktivierter, phosphorylierter Transkriptionsfaktoren basiert (siehe Abschnitt 4.2.5). Somit kann davon ausgegangen werden, dass 15-LOX-2 eine Phosphorylierung von p53 induziert. Weitere Untersuchungen auf Immunoblot-Basis könnten mit Hilfe spezifischer Antikörper die genaue Phosphorylierungsposition von p53 identifizieren. Die von Thomas Elings Gruppe gemachten Untersuchungen in der Kolonkarzinomzelllinie HCT-166 beziehen sich auf das Wildtyp-p53-Protein, da diese Zellen keine Mutationen im p53-Gen aufweisen [132]. Die in dieser Arbeit verwendete Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 dagegen besitzt ein mutiertes p53 und durch LOH kein Wildtyp-Allel. Dennoch haben die Knockdownexperimente mit siRNA in dieser Arbeit eindeutig belegt, dass der p53-Signalweg auch bei der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung in den Panc1 Zellen eine funktionelle Rolle spielt. Wie in Abschnitt 4.2.8 beschrieben, handelt es sich bei der Mutation in den Panc1 Zellen um eine CpG-Transition in Codon 273, wodurch Arginin zu Histidin wird. Die Mehrzahl der Mutationen im p53-Gen verhindern die sequenzspezifische Bindung des Proteins an die DNA. Cho et al. klassifizierten drei Mutationstypen, welche in humanen Karzinomen die DNA-Bindungsstelle von p53 beeinflussen. Die hier vorliegende Transitionsmutation zählt zu dem Mutationstyp der Klasse I. Diese „hot spot“ Mutation in der Aminosäure Arg²⁷³ führt zu einem Verlust der Protein-DNA-Kontaktpunkte und somit zu einem Ausfall der

transkriptionellen Aktivität von p53 [174]. Die genauen weiteren Auswirkungen der Mutation auf die Funktionalität von p53 sind bis jetzt noch nicht beschrieben. Die Mutation hat aber vermutlich keine Auswirkungen auf Phosphorylierungsstellen am N-terminalen oder C-terminalen Ende von p53, die für Protein-Proteinwechselwirkungen von Bedeutung sind [133]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass p53 auch unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität über direkte Proteininteraktionen mit Apoptose-stimulierenden Proteinen wie z.B. Bcl-2 und Bcl-XL den intrinsischen Apoptoseweg induzieren kann, wobei auch für die R273H-Mutante eine Bindung an das „Apoptose-stimulierende Protein“ ASPP2 nachgewiesen werden konnte [175; 176; 177]. Es bleibt zu klären, welche durch die R273H-Mutation nicht beeinträchtigten Funktionen des p53-Proteins bei der 15-LOX-2-induzierten Wachstumshehmung in den Panc1 eine Rolle spielen.

5.3. Epigenetische Mechanismen reprimieren die Expression von 15-LOX-2 in Pankreaskarzinomzellen.

Epigenetische Prozesse ermöglichen die Modifikation des Zell-spezifischen Expressionsmusters. Auf diese Weise kann der identische genetische Code auf mehrere Arten interpretiert werden, ohne die eigentliche Genstruktur zu verändern. Zu den epigenetischen Modifikationsmechanismen zählen mehrere unabhängige Systeme. Neben Histonmodifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung sind nicht kodierende RNAs (X-Chromosom Inaktivierung) sowie Methylierungen der DNA wichtige Elemente der epigenetischen Mechanismen [178; 179; 180]. Vor mehr als 25 Jahren wurden DNA-Methylierungen bereits in Verbindung mit Krebsentstehung gebracht [181]. Inzwischen ist bekannt, dass Veränderungen in den Methylierungsmustern zu den frühen Ereignissen in der Karzinogenese gehören und genauso häufig zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens führen können, wie genetische Mutationen [182]. Die Methylierungs-bedingten Veränderungen im Genom sind entweder auf Hypomethylierungen oder Hypermethylierungen von CpG-Inseln zurückzuführen. DNA-Hypermethylierungen in Promotorbereichen sind in der Regel mit einer verminderten Transkription oder Inaktivierung von potentiellen Tumorsuppressorgenen assoziiert, während

Hypomethylierungen oft mit einer Aktivierung der Transkription einhergehen [183; 184]. Somit repräsentiert die Hypermethylierung einen ebenso wichtigen Mechanismus der Geninaktivierung bei der Pathogenese von Neoplasien wie Mutationen oder Deletionen. Untersuchungen der Hypermethylierungsprofile verschiedener Gene in unterschiedlichen Tumoren ergab, dass die Promotorbereiche unterschiedliche, tumorspezifische Hypermethylierungsprofile besitzen [185].

Die Stilllegung von 15-LOX-2 ist ein frühes Ereignis in der Pankreaskarzinogenese, das, wie immunhistochemische Analysen zeigen konnten, beim Übergang zu den malignen PanIN-Läsionen stattfindet. Ein ähnlicher Verlust der Expression im malignen Verlauf der Pankreaskarzinogenese konnte auch für die 15-LOX-1-Isoform beobachtet werden. Beide Gene besitzen anti-tumorigene Eigenschaften, weshalb nach M. Esteller ihre epigenetische Stilllegung ein konsequenter Schritt in der Pathogenese darstellen würde [183]. Während verschiedene Studien zur epigenetischen Regulation der 15-LOX-1 vorliegen, die gewebsspezifische und entgegengesetzte Methylierungsmuster beschreiben, konnten für eine epigenetische Regulation des 15-LOX-2-Promotors durch Methylierung bisher noch keine Beweise erbracht werden [186; 187; 188; 189]. Die Inaktivierung des 15-LOX-2-Gens während der Prostatakarzinogenese ist nach Meinung von Tang und Kollegen nicht auf epigenetische Modifikationen zurückführen. Ihre Analysen gründeten jedoch lediglich auf pharmakologischen Interventionsstudien mit 5-Aza-2'-desoxycytidin und dem HDAC-Inhibitor Trichostatin [123].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals durch pharmakologische Interventionsstudien sowie zusätzlicher CpG-Insel Sequenzierung die Methylierung des 15-LOX-2-Promotorbereiches in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und Colo357 eingehend analysiert werden. 5' aufwärts vom ATG-Startpunkt des 15-LOX-2-Gens wurde eine CpG-Insel identifiziert, in der fast alle CpG-Dinukleotide bei beiden Zelllinien methyliert waren. Dabei wies Colo357 ein weniger ausgeprägtes CpG-Methylierungsmuster auf als Panc1. Durch Behandlung mit 5-Aza konnte lediglich in Colo357, nicht aber in Panc1, die Methylierung der CpG-Dinukleotide aufgehoben werden. Dies korrelierte mit einer schwachen aber doch deutlich nachweisbaren Expression von 15-LOX-2, was einen kausalen Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus des Promotorbereiches und Expressionsverlust belegt. Die fehlgeschlagene Demethylierung der CpG-Dinukleotide in Panc1 führte im Umkehrschluss zu keiner Re-Expression von 15-LOX-2. Der Grund für das Ausbleiben der Demethylierung durch 5-Aza konnte nicht eruiert werden.

Da sämtliche Analysen mit 5-Aza parallel im gleichen Versuchsansatz mit Panc1 und Colo357 durchgeführt wurden, ist die generelle Wirksamkeit von 5-Aza für Pankreaskarzinomzelllinien außer Frage gestellt. Bis auf Decitabin existieren derzeit keine spezifischeren Inhibitoren von Methylierungsreaktionen. Somit werden zukünftige vergleichende Analysen zwischen 5-Aza und Decitabin zeigen, ob Decitabin ein stärkeres Potential zur Demethylierung der CpG-Insel in Panc1 aufweisen kann als 5-Aza. In weiteren Versuchen zur Wiederherstellung der 15-LOX-2-Expression konnte ein leicht additiver Effekt des HDAC-Inhibitors Valproat auf die 5-Aza-behandelte Colo357 Zelllinie detektiert werden, während die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren alleine (SAHA, NaBu und Valproat) keine Re-Expression von 15-LOX-2 induzierte. Die Histonmodifikation könnte eine Re-Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren bewirkt haben, wodurch die Expression von 15-LOX-2 noch zusätzlich positiv beeinflusst wurde. Weitere Analysen mit anderen HDAC-Inhibitoren müssen das Ausmaß des additiven Effektes und seine Ursache analysieren und charakterisieren. Wie neueste Arbeiten zeigen konnten, spielen Histonmodifikationen auch eine essentielle Rolle bei der Expressionsregulation der 15-LOX-1-Isoform in Kolonkarzinomzellen [190]. Zusammenfassend wurde somit erstmals gezeigt, dass die Inaktivierung des potentiellen Tumorsuppressorgens 15-LOX-2 auf eine sogenannte „reversible Epimutation“ zurückzuführen und damit primär mit der Methylierung der CpG-Insel im Promotorbereich assoziiert ist.

5.4. Forcierte Expression von 15-LOX-2 als Ansatz für eine neue molekulare Kombinationstherapie beim Pankreaskarzinom

Ein langfristiges Ziel des Forschungsprojektes unserer Gruppe und der hier vorliegenden Arbeit, ist die „kurative Behandlung“ des Pankreaskarzinoms. Die Entdeckung früher diagnostischer Marker und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sind vordringliche Ziele, um der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms entgegen zu wirken. In diesem Kontext ist der tumorsuppressive Effekt von 15-LOX-2 und dessen mögliche Re-Expression ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine molekulare Kombinationstherapie. Zur Überprüfung eines verbesserten Therapieerfolges durch forcierte 15-LOX-2-Expression wurden der aktive und inaktive 15-LOX-2-pRTS-Klon mit

den Chemotherapeutika Gemzar und Cisplatin behandelt. Klar dargelegt werden muss, dass diese Versuche nur den Anfang einer Evaluation darstellen und für eine endgültige Aussage noch weiterführende Analysen folgen müssen. Dennoch lies sich schon aus den vorläufigen Versuche erkennen, dass mittels forcierter 15-LOX-2-Expression nur 1/10 der ursprünglichen Chemotherapeutika-Konzentration notwendig ist, um einen vergleichbaren zytotoxischen Effekt auf das Tumorzellwachstum zu erreichen.

Dies ist ein wichtiger Aspekt in der Etablierung eines neuen therapeutischen Ansatzes. Die bisherige Applikationskonzentration von Gemzar birgt das Risiko erheblicher toxischer Nebeneffekte und dadurch bedingt eine Verschlechterung des palliativen Nutzens für Patienten. Die in den hier durchgeführten Analysen gewählte Konzentration von 0,1 μM ist beabsichtigt gering gewählt worden, um den forcierten 15-LOX-2-Einfluss auf die Behandlung mit Gemzar besser verfolgen und einschätzen zu können. Eine Kombination aus höheren Dosen und 15-LOX-2-Expression führte zu einem schnellen vollständigen Absterben aller Zellen. Auch bei diesen Experimenten stellte sich heraus, dass die katalytische Aktivität der 15-LOX-2 für die Wachstums-hemmenden Effekte nicht essentiell ist.

Die gezielte Inhibierung der Methyltransferasen in Colo357 Pankreaskarzinomzellen bedingte den Verlust der während der Karzinogenese initiierten Methylierungsmuster, welcher zu einer Re-Expression von 15-LOX-2 führte. Diese Datenlage ist der zentrale Ansatzpunkt für einen epigenetischen Therapieansatz [191; 192]. Dadurch könnten die 15-LOX-2-vermittelten Wachstums-hemmenden Effekte induziert und in Kombination mit einem Chemotherapeutikum oder Bestrahlung als Therapieoption angeboten werden. Ferner sind die biochemischen Eigenschaften und molekularen Effekte der DNA-Methyltransferasen auf die DNA schon detailliert untersucht worden, wodurch deren Inhibierung für die Pankreaskarzinomtherapie einen zusätzlichen attraktiven Ansatzpunkt bieten [193; 194].

5.5. Ausblick

Insgesamt bilden die Daten eine solide Grundlage für weitere Analysen, um das grundlegende Verständnis der Wirkungsweise von 15-LOX-2 tiefgreifender zu erforschen. Die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse in der Panc1 Zelllinie sollen zukünftig zusätzlich in anderen Pankreaskarzinomzelllinien verifiziert werden. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen wäre von Interesse das Expressionsmuster von 15-LOX-2 in den untersuchten Pankreasgewebsschnitten über die immunhistochemischen Analysen hinaus mittels Laser-Capture-Microdissection genauer zu analysieren. Von großem Interesse ist die Übertragung der Ergebnisse auf ein orthotopes *in vivo* Mausmodell. Durch die orthotope Tumorzellinjektion der Panc1-pRTS-Klone ist es möglich, die anti-proliferativen Effekte von 15-LOX-2 auf das Primärtumorstadium sowie auf die Lungen- und Lebermetastasierung zu untersuchen. Abgesehen von den funktionellen *in vitro* und *in vivo* Analysen sollten die angestrebten Therapiekombinationen mit 15-LOX-2 und die transkriptionelle Aktivierung weiter evaluiert werden um darauf aufbauend neue therapeutische Strategien für das Pankreaskarzinom zu entwickeln.

Kapitel 6 Referenzen

- 1: **Trede, M., A. Richter, et al. (2001).** "Personal observations, opinions, and approaches to cancer of the pancreas and the periampullary area." *Surg Clin North Am* 81(3): 595-610.
- 2: **Meyer, R. (2002).** "Kombination von Diagnoseverfahren verbessert das Staging." *Deutsches Ärzteblatt* 99(3): A-88/B-72/C-71.
- 3: **Ding, X. Z., P. Iversen, et al. (1999).** "Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 261(1): 218-23.
- 4: **Hennig, R., X. Z. Ding, et al. (2002).** "5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue." *Am J Pathol* 161(2): 421-8.
- 5: **Hennig, R., P. Grippo, et al. (2005).** "5-Lipoxygenase, a marker for early pancreatic intraepithelial neoplastic lesions." *Cancer Res* 65(14): 6011-6.
- 6: **Jack, G. S., A. R. Brash, et al. (2000).** "Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Hum Pathol* 31(9): 1146-54.
- 7: **Nie, D., M. Che, et al. (2001).** "Role of eicosanoids in prostate cancer progression." *Cancer Metastasis Rev* 20(3-4): 195-206.
- 8: **Shappell, S. B., W. E. Boeglin, et al. (1999).** "15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma." *Am J Pathol* 155(1): 235-45.
- 9: **Subbarayan, V., P. Krieg, et al. (2006).** "15-Lipoxygenase-2 gene regulation by its product 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through a negative feedback mechanism that involves peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Oncogene* 25(44): 6015-25.
- 10: **Tang, D. G., B. Bhatia, et al. (2007).** "15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size)." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4): 135-46.
- 11: **Furstenberger, G., P. Krieg, et al. (2006).** "What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?" *Int J Cancer* 119(10): 2247-54.
- 12: **Roffeis, J., D. Hornung, et al. (2007).** "15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary." *Eur J Cancer Prev* 16(6): 568-75.

- 13: **Wang, D., S. Chen, et al. (2006).** "Reduced expression of 15-lipoxygenase 2 in human head and neck carcinomas." *Tumour Biol* 27(5): 261-73.
- 14: **Yang, Q., Y. Feng, et al. (2008).** "Synergistic effect of 15-lipoxygenase 2 and radiation in killing head-and-neck cancer." *Cancer Gene Ther* 15(5): 323-30.
- 15: **Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000).** "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- 16: **Lengauer, C. and J. P. Issa (1998).** "The role of epigenetics in cancer. DNA Methylation, Imprinting and the Epigenetics of Cancer--an American Association for Cancer Research Special Conference. Las Croabas, Puerto Rico, 12-16 1997 December." *Mol Med Today* 4(3): 102-3.
- 17: **Weinberg, R. A. (2006).** "Cancer of biology." Garland Pub.
- 18: **Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993).** "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* 9(4): 138-41.
- 19: **Balkwill, F. and A. Mantovani (2001).** "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357(9255): 539-45.
- 20: **Schulte-Hermann, R. (1985).** "Tumor promotion in the liver." *Arch Toxicol* 57(3): 147-58.
- 21: **Pitot, H. C. (1989).** "Progression: the terminal stage in carcinogenesis." *Jpn J Cancer Res* 80(7): 599-607.
- 22: **Grafstrom, R. C., U. G. Noren, et al. (1997).** "Growth and transformation of human oral epithelium in vitro." *Recent Results Cancer Res* 143: 275-306.
- 23: **Schlingemann, J., J. Hess, et al. (2003).** "Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells." *Int J Cancer* 104(6): 699-708.
- 24: **Furstenberger, G. and A. Kopp-Schneider (1995).** "Malignant progression of papillomas induced by the initiation--promotion protocol in NMRI mouse skin." *Carcinogenesis* 16(1): 61-9.
- 25: **Marks, F. and G. Furstenberger (1983).** "Multistage tumor promotion in skin." *Princess Takamatsu Symp* 14: 273-87.
- 26: **Marks, F. and G. Furstenberger (1990).** "The conversion stage of skin carcinogenesis." *Carcinogenesis* 11(12): 2085-92.
- 27: **Hruban, R. H., N. V. Adsay, et al. (2001).** "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." *Am J Surg Pathol* 25(5): 579-86.

- 28: Hruban, R. H., C. Iacobuzio-Donahue, et al. (2001).** "Molecular pathology of pancreatic cancer." *Cancer J* 7(4): 251-8.
- 29: Vaupel (1995).** "Physiologie des Menschen: Funktionen des Magen Darm Kanals." Springer Verlag.
- 30: Bardeesy, N., N. E. Sharpless, et al. (2001).** "The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model." *Semin Cancer Biol* 11(3): 201-18.
- 31: Robert Koch Institut (2008).** "Krebsbroschüre."
- 32: Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992).** "Pancreatic carcinoma." *N Engl J Med* 326(7): 455-65.
- 33: Buchler MW, U. W., Malfertheimer P, Sarr MG (2004).** "Neoplasms of the pancreas." Karger 1.Auflage 126-166.
- 34: Kelly, D. M. and I. S. Benjamin (1995).** "Pancreatic carcinoma." *Ann Oncol* 6(1): 19-28.
- 35: WHO (2002).** "WHO Statistical Information System (WHOSIS), World Wide Cancer Statistics ".
- 36: A. b. K. i. Deutschland, (2002).** 3. Ausgabe.
- 37: Anderson, K. E., F. F. Kadlubar, et al. (2005).** "Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(9): 2261-5.
- 38: Anderson, K. E., R. Sinha, et al. (2002).** "Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer." *Mutat Res* 506-507: 225-31.
- 39: Coughlin, S. S., E. E. Calle, et al. (2000).** "Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults." *Cancer Causes Control* 11(10): 915-23.
- 40: Qiu, D., M. Kurosawa, et al. (2005).** "Overview of the epidemiology of pancreatic cancer focusing on the JACC Study." *J Epidemiol* 15 Suppl 2: S157-67.
- 41: Yun, Y. H., K. W. Jung, et al. (2005).** "Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men: National Health Insurance Corporation Study." *Cancer Detect Prev* 29(1): 15-24.
- 42: Yun, Y. H., M. K. Lim, et al. (2005).** "Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(9): 2125-30.
- 43: Löhr , H., Friess (2003).** "Pankreaskarzinom." UNI-MED Verlag 1.

- 44: **Bagnardi, V., M. Blangiardo, et al. (2001).** "Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis." *Alcohol Res Health* 25(4): 263-70.
- 45: **Bagnardi, V., M. Blangiardo, et al. (2001).** "A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk." *Br J Cancer* 85(11): 1700-5.
- 46: **La Vecchia, C., E. Negri, et al. (1992).** "Tea consumption and cancer risk." *Nutr Cancer* 17(1): 27-31.
- 47: **Michaud, D. S., E. Giovannucci, et al. (2001).** "Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(5): 429-37.
- 48: **Silverman, D. T. (2001).** "Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews." *Teratog Carcinog Mutagen* 21(1): 7-25.
- 49: **Michaud, D. S., E. Giovannucci, et al. (2003).** "Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study." *Am J Epidemiol* 157(12): 1115-25.
- 50: **Lynch, H. T., T. Smyrk, et al. (1996).** "Familial pancreatic cancer: a review." *Semin Oncol* 23(2): 251-75.
- 51: **Brugge, W. R., G. Y. Lauwers, et al. (2004).** "Cystic neoplasms of the pancreas." *N Engl J Med* 351(12): 1218-26.
- 52: **Hruban, R. H., R. E. Wilentz, et al. (2005).** "Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer." *Methods Mol Med* 103: 1-13.
- 53: **Maitra, A., N. Fukushima, et al. (2005).** "Precursors to invasive pancreatic cancer." *Adv Anat Pathol* 12(2): 81-91.
- 54: **Kloppel, G. and J. Luttges (2001).** "WHO-classification 2000: exocrine pancreatic tumors." *Verh Dtsch Ges Pathol* 85: 219-28.
- 55: **Wilentz, R. E., C. A. Iacobuzio-Donahue, et al. (2000).** "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." *Cancer Res* 60(7): 2002-6.
- 56: **Bardeesy, N. and R. A. DePinho (2002).** "Pancreatic cancer biology and genetics." *Nat Rev Cancer* 2(12): 897-909.
- 57: **Wilentz, R. E., J. Geradts, et al. (1998).** "Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression." *Cancer Res* 58(20): 4740-4.
- 58: **Caldas, C., S. A. Hahn, et al. (1994).** "Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia." *Cancer Res* 54(13): 3568-73.

- 59: **Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997).** "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature* 386(6627): 761, 763.
- 60: **Soussi, L. H. u. T. (2008).** "The UMD p53 database." http://p53.free.fr/Database/p53_cancer/p53_pancreatic.html.
- 61: **UICC, I. U. a. C. (2002).** "TNM. Classification of malignant tumours." Wiley-Liss 6.th Edition.
- 62: **Richter, A., M. Niedergethmann, et al. (2003).** "Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience." *World J Surg* 27(3): 324-9.
- 63: **Knaebel, H. P., A. Marten, et al. (2005).** "Phase III trial of postoperative cisplatin, interferon alpha-2b, and 5-FU combined with external radiation treatment versus 5-FU alone for patients with resected pancreatic adenocarcinoma -- CapRI: study protocol [ISRCTN62866759]." *BMC Cancer* 5: 37.
- 64: **Schmidt, J., D. Jager, et al. (2007).** "Impact of interferon-alpha in combined chemoradioimmunotherapy for pancreatic adenocarcinoma (CapRI): first data from the immunomonitoring." *J Immunother* 30(1): 108-15.
- 65: **Schmidt, J., E. M. Patrut, et al. (2006).** "Immunomodulatory impact of interferon-alpha in combination with chemoradiation of pancreatic adenocarcinoma (CapRI)." *Cancer Immunol Immunother* 55(11): 1396-405.
- 66: **Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, et al. (1997).** "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." *J Clin Oncol* 15(6): 2403-13.
- 67: **Voet, D. u. V., J. (1994).** "Biochemie." VCH New York 1.korrigierte Auflage.
- 68: **Kudo, I. and M. Murakami (2002).** "Phospholipase A2 enzymes." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 3-58.
- 69: **Simmons, D. L., R. M. Botting, et al. (2004).** "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." *Pharmacol Rev* 56(3): 387-437.
- 70: **Hasler, J. A. (1999).** "Pharmacogenetics of cytochromes P450." *Mol Aspects Med* 20(1-2): 12-24, 25-137.
- 71: **Takahashi, Y., T. Hada, et al. (1992).** "Reactivities of mammalian lipoxygenases with various polyunsaturated fatty acids." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) Spec No*: 134-7.
- 72: **Yamamoto, S. (1992).** "Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions." *Biochim Biophys Acta* 1128(2-3): 117-31.

- 73: **Oliw, E. H. (2002).** "Plant and fungal lipoxygenases." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 313-23.
- 74: **Shibata, D. and B. Axelrod (1995).** "Plant lipoxygenases." *J Lipid Mediat Cell Signal* 12(2-3): 213-28.
- 75: **Shibata, D. (1991).** "[Plant lipoxygenases--their structures and functions]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 36(10): 1727-30.
- 76: **Charlier, C., J. P. Henichart, et al. (2006).** "Structural insights into human 5-lipoxygenase inhibition: combined ligand-based and target-based approach." *J Med Chem* 49(1): 186-95.
- 77: **Vance, R. E., S. Hong, et al. (2004).** "The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2135-9.
- 78: **Brash, A. R. (1999).** "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." *J Biol Chem* 274(34): 23679-82.
- 79: **Kuhn, H. and B. J. Thiele (1999).** "The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance." *FEBS Lett* 449(1): 7-11.
- 80: **Kuhn, H., M. Walther, et al. (2002).** "Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 263-90.
- 81: **Brash, A. R., W. E. Boeglin, et al. (1997).** "Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6148-52.
- 82: **Funk, C. D. (1996).** "The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice." *Biochim Biophys Acta* 1304(1): 65-84.
- 83: **Funk, C. D., X. S. Chen, et al. (2002).** "Lipoxygenase genes and their targeted disruption." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 303-12.
- 84: **Minor, W., J. Steczko, et al. (1996).** "Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution." *Biochemistry* 35(33): 10687-701.
- 85: **Boyington, J. C., B. J. Gaffney, et al. (1993).** "Structure of soybean lipoxygenase-I." *Biochem Soc Trans* 21 (Pt 3)(3): 744-8.
- 86: **Boyington, J. C., B. J. Gaffney, et al. (1993).** "The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase." *Science* 260(5113): 1482-6.
- 87: **Krieg, P., Fürstenberger, G. (2005).** "The LOX Database"; www.dkfz.de.

- 88: Ivanov, I., J. Saam, et al. (2005).** "Dual role of oxygen during lipoxygenase reactions." *FEBS J* 272(10): 2523-35.
- 89: Kulkarni, A. P., A. Mitra, et al. (1990).** "Hydrogen peroxide: a potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase." *Biochem Biophys Res Commun* 166(1): 417-23.
- 90: Kuhn, H., T. Schewe, et al. (1986).** "The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58: 273-311.
- 91: Knapp, M. J. and J. P. Klinman (2002).** "Environmentally coupled hydrogen tunneling. Linking catalysis to dynamics." *Eur J Biochem* 269(13): 3113-21.
- 92: Schnurr, K., J. Belkner, et al. (1996).** "The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products." *J Biol Chem* 271(9): 4653-8.
- 93: Bryant, R. W., T. Schewe, et al. (1985).** "Leukotriene formation by a purified reticulocyte lipoxygenase enzyme. Conversion of arachidonic acid and 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to 14, 15-leukotriene A₄." *J Biol Chem* 260(6): 3548-55.
- 94: Crowther, S. D. and P. J. Rees (2000).** "Current treatment of asthma--focus on leukotrienes." *Expert Opin Pharmacother* 1(5): 1021-40.
- 95: Schewe, T., S. M. Rapoport, et al. (1986).** "Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58: 191-272.
- 96: Epp, N., G. Furstenberger, et al. (2007).** "12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function." *J Cell Biol* 177(1): 173-82.
- 97: Furstenberger, G., N. Epp, et al. (2007).** "Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4): 128-34.
- 98: Juanes, S. D., N. Epp, et al. (2009).** "Development of an Ichthyosiform Phenotype in Alox12b-Deficient Mouse Skin Transplants." *J Invest Dermatol*.
- 99: Brady, H. R. and C. N. Serhan (1996).** "Lipoxins: putative braking signals in host defense, inflammation and hypersensitivity." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5(1): 20-7.
- 100: Fierro, I. M. and C. N. Serhan (2001).** "Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins." *Braz J Med Biol Res* 34(5): 555-66.
- 101: Godson, C. and H. R. Brady (2000).** "Lipoxins: novel anti-inflammatory therapeutics?" *Curr Opin Investig Drugs* 1(3): 380-5.

- 102: Ding, X. Z., R. Hennig, et al. (2003).** "Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer." *Mol Cancer* 2: 10.
- 103: Kennedy, T. J., C. Y. Chan, et al. (2003).** "Lipoxygenase inhibitors for the treatment of pancreatic cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* 3(4): 525-36.
- 104: Ghosh, J. and C. E. Myers (1999).** "Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells." *Adv Exp Med Biol* 469: 577-82.
- 105: Ghosh, J. and C. E. Myers (1997).** "Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase." *Biochem Biophys Res Commun* 235(2): 418-23.
- 106: Avis, I., S. H. Hong, et al. (2001).** "Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions." *FASEB J* 15(11): 2007-9.
- 107: Hong, S. H., I. Avis, et al. (1999).** "Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors." *Cancer Res* 59(9): 2223-8.
- 108: Gao, X., D. J. Grignon, et al. (1995).** "Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer." *Urology* 46(2): 227-37.
- 109: Kandouz, M., D. Nie, et al. (2003).** "Platelet-type 12-lipoxygenase activates NF-kappaB in prostate cancer cells." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71(3-4): 189-204.
- 110: Ye, Y. N., E. S. Liu, et al. (2004).** "The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone." *J Pharmacol Exp Ther* 311(1): 123-30.
- 111: Shureiqi, I., K. J. Wojno, et al. (1999).** "Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers." *Carcinogenesis* 20(10): 1985-95.
- 112: Subbarayan, V., X. C. Xu, et al. (2005).** "Inverse relationship between 15-lipoxygenase-2 and PPAR-gamma gene expression in normal epithelia compared with tumor epithelia." *Neoplasia* 7(3): 280-93.
- 113: Gonzalez, A. L., R. L. Roberts, et al. (2004).** "15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic lung: an immunohistochemical study and correlation with tumor grade and proliferation." *Hum Pathol* 35(7): 840-9.

- 114: Yoshinaga, M., F. G. Buchanan, et al. (2004).** "15-LOX-1 inhibits p21 (Cip/WAF 1) expression by enhancing MEK-ERK 1/2 signaling in colon carcinoma cells." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 73(1-2): 111-22.
- 115: Shureiqi, I., Y. Wu, et al. (2005).** "The critical role of 15-lipoxygenase-1 in colorectal epithelial cell terminal differentiation and tumorigenesis." *Cancer Res* 65(24): 11486-92.
- 116: Shureiqi, I., D. Chen, et al. (2000).** "15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells." *Cancer Res* 60(24): 6846-50.
- 117: Kelavkar, U. P., J. B. Nixon, et al. (2001).** "Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis." *Carcinogenesis* 22(11): 1765-73.
- 118: Kelavkar, U. P., C. Cohen, et al. (2000).** "Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging." *Carcinogenesis* 21(10): 1777-87.
- 119: Nie, D. (2007).** "Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers." *Front Biosci* 12: 1574-85.
- 120: Hennig, R., T. Kehl, et al. (2007).** "15-lipoxygenase-1 production is lost in pancreatic cancer and overexpression of the gene inhibits tumor cell growth." *Neoplasia* 9(11): 917-26.
- 121: Bhatia, B., C. J. Maldonado, et al. (2003).** "Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants." *J Biol Chem* 278(27): 25091-100.
- 122: Bhatia, B., S. Tang, et al. (2005).** "Cell-autonomous induction of functional tumor suppressor 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) contributes to replicative senescence of human prostate progenitor cells." *Oncogene* 24(22): 3583-95.
- 123: Tang, S., B. Bhatia, et al. (2002).** "Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells." *J Biol Chem* 277(18): 16189-201.
- 124: Tang, S., B. Bhatia, et al. (2004).** "Evidence that Sp1 positively and Sp3 negatively regulate and androgen does not directly regulate functional tumor suppressor 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) gene expression in normal human prostate epithelial cells." *Oncogene* 23(41): 6942-53.
- 125: Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989).** "Molecular cloning. A laboratory manual." Cold Spring Harbor Press 2nd Edition.

- 126: **Gossen, M. and H. Bujard (1992).** "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-51.
- 127: **Clontech. (2006).** TET-ON-System manual; from www.clontech.com.
- 128: **Urlinger, S., U. Baron, et al. (2000).** "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7963-8.
- 129: **Sander, A., A. Guth, et al. (2000).** "Gene transfer into individual muscle fibers and conditional gene expression in living animals." *Cell Tissue Res* 301(3): 397-403.
- 130: **Schweiger, D., G. Furstenberger, et al. (2007).** "Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways." *J Lipid Res* 48(3): 553-64.
- 131: **Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995).** "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9363-7.
- 132: **Soussi, T. (2008).** "The p53 Web Site." http://p53.free.fr/Database/Cancer_cell_lines/Ref_cell_lines.html.
- 133: **Butz, J., E. Wickstrom, et al. (2003).** "Characterization of mutations and loss of heterozygosity of p53 and K-ras2 in pancreatic cancer cell lines by immobilized polymerase chain reaction." *BMC Biotechnol* 3: 11.
- 134: **Ko, L. J. and C. Prives (1996).** "p53: puzzle and paradigm." *Genes Dev* 10(9): 1054-72.
- 135: **Brueckner, B. and F. Lyko (2004).** "DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy." *Trends Pharmacol Sci* 25(11): 551-4.
- 136: **Li, L. C. and R. Dahiya (2002).** "MethPrimer: designing primers for methylation PCRs." *Bioinformatics* 18(11): 1427-31.
- 137: **Shappell, S. B., D. S. Keeney, et al. (2001).** "15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic sebaceous glands and other cutaneous adnexa." *J Invest Dermatol* 117(1): 36-43.
- 138: **Xu, X. C., S. B. Shappell, et al. (2003).** "Reduced 15S-lipoxygenase-2 expression in esophageal cancer specimens and cells and upregulation in vitro by the cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398." *Neoplasia* 5(2): 121-7.
- 139: **Rydberg, E. K., A. Krettek, et al. (2004).** "Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(11): 2040-5.

- 140: Danielsson, K. N., E. K. Rydberg, et al. (2008).** "15-Lipoxygenase-2 expression in human macrophages induces chemokine secretion and T cell migration." *Atherosclerosis* 199(1): 34-40.
- 141: Crnogorac-Jurcevic, T., E. Efthimiou, et al. (2001).** "Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia." *Oncogene* 20(50): 7437-46.
- 142: Mahadevan, D. and D. D. Von Hoff (2007).** "Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Mol Cancer Ther* 6(4): 1186-97.
- 143: Grassi, G., P. Maccaroni, et al. (2003).** "Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87." *Carcinogenesis* 24(10): 1625-35.
- 144: Brooks, A. R., R. N. Harkins, et al. (2004).** "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle." *J Gene Med* 6(4): 395-404.
- 145: Prosch, S., J. Stein, et al. (1996).** "Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro." *Biol Chem Hoppe Seyler* 377(3): 195-201.
- 146: Muller, M. (2009).** "Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations." *Antioxid Redox Signal* 11(1): 59-98.
- 147: Mahipal, S. V., J. Subhashini, et al. (2007).** "Effect of 15-lipoxygenase metabolites, 15-(S)-HPETE and 15-(S)-HETE on chronic myelogenous leukemia cell line K-562: reactive oxygen species (ROS) mediate caspase-dependent apoptosis." *Biochem Pharmacol* 74(2): 202-14.
- 148: Chang, M. S., C. Schneider, et al. (2005).** "Detection and subcellular localization of two 15S-lipoxygenases in human cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(3): 849-56.
- 149: Chen, G. G., H. Xu, et al. (2003).** "15-hydroxy-eicosatetraenoic acid arrests growth of colorectal cancer cells via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway." *Int J Cancer* 107(5): 837-43.
- 150: Hsi, L. C., L. Wilson, et al. (2001).** "15-lipoxygenase-1 metabolites down-regulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma via the MAPK signaling pathway." *J Biol Chem* 276(37): 34545-52.
- 151: Asou, H., W. Verbeek, et al. (1999).** "Growth inhibition of myeloid leukemia cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma, and retinoids." *Int J Oncol* 15(5): 1027-31.
- 152: Zang, C., H. Liu, et al. (2004).** "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia." *Leuk Res* 28(4): 387-97.

- 153: Kristiansen, G., J. Jacob, et al. (2006).** "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is highly expressed in pancreatic cancer and is associated with shorter overall survival times." *Clin Cancer Res* 12(21): 6444-51.
- 154: Segawa, Y., R. Yoshimura, et al. (2002).** "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer." *Prostate* 51(2): 108-16.
- 155: Zhang, G. Y., N. Ahmed, et al. (2005).** "Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma." *Br J Cancer* 92(1): 113-9.
- 156: Mueller, E., P. Sarraf, et al. (1998).** "Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma." *Mol Cell* 1(3): 465-70.
- 157: Hsi, L. C., L. C. Wilson, et al. (2002).** "Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 and -2 metabolites on MAPK signaling in prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *J Biol Chem* 277(43): 40549-56.
- 158: Chung, J. Y., Y. C. Park, et al. (2002).** "All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction." *J Cell Sci* 115(Pt 4): 679-88.
- 159: Bradley, J. R. and J. S. Pober (2001).** "Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)." *Oncogene* 20(44): 6482-91.
- 160: from www.caprotec.com.**
- 161: Abrahamson, J. L., J. M. Lee, et al. (1995).** "Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by Steel factor." *Mol Cell Biol* 15(12): 6953-60.
- 162: Baker, S. J., S. Markowitz, et al. (1990).** "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science* 249(4971): 912-5.
- 163: Chen, X., L. J. Ko, et al. (1996).** "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." *Genes Dev* 10(19): 2438-51.
- 164: Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, et al. (1993).** "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." *Nature* 362(6423): 857-60.
- 165: Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993).** "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." *Genes Dev* 7(7A): 1126-32.
- 166: Donehower, L. A. and A. Bradley (1993).** "The tumor suppressor p53." *Biochim Biophys Acta* 1155(2): 181-205.
- 167: Kirch, H. C., S. Flaswinkel, et al. (1999).** "Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF-kappaB and Myc/Max." *Oncogene* 18(17): 2728-38.

- 168: Wang, S. and W. S. El-Deiry (2006).** "p73 or p53 directly regulates human p53 transcription to maintain cell cycle checkpoints." *Cancer Res* 66(14): 6982-9.
- 169: Papa, S., C. Bubici, et al. (2006).** "The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease." *Cell Death Differ* 13(5): 712-29.
- 170: Bubici, C., S. Papa, et al. (2006).** "The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling." *Histol Histopathol* 21(1): 69-80.
- 171: Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998).** "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10541-6.
- 172: Kim, J. S., S. J. Baek, et al. (2005).** "Overexpression of 15-lipoxygenase-1 induces growth arrest through phosphorylation of p53 in human colorectal cancer cells." *Mol Cancer Res* 3(9): 511-7.
- 173: Zhu, H., W. Glasgow, et al. (2008).** "15-Lipoxygenase-1 activates tumor suppressor p53 independent of enzymatic activity." *Int J Cancer* 123(12): 2741-2749.
- 174: Cho, Y., S. Gorina, et al. (1994).** "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." *Science* 265(5170): 346-55.
- 175: Soussi, T. (2007).** "p53 alterations in human cancer: more questions than answers." *Oncogene* 26(15): 2145-56.
- 176: Bergamaschi, D., Y. Samuels, et al. (2004).** "ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members." *Mol Cell Biol* 24(3): 1341-50.
- 177: Kato, S., S. Y. Han, et al. (2003).** "Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8424-9.
- 178: Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001).** "Translating the histone code." *Science* 293(5532): 1074-80.
- 179: Jones, P. A. and D. Takai (2001).** "The role of DNA methylation in mammalian epigenetics." *Science* 293(5532): 1068-70.
- 180: Avner, P. and E. Heard (2001).** "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." *Nat Rev Genet* 2(1): 59-67.
- 181: Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983).** "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." *Nature* 301(5895): 89-92.
- 182: Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002).** "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* 3(6): 415-28.

- 183: Esteller, M. (2002).** "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future." *Oncogene* 21(35): 5427-40.
- 184: Gaudet, F., J. G. Hodgson, et al. (2003).** "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation." *Science* 300(5618): 489-92.
- 185: Esteller, M., P. G. Corn, et al. (2001).** "A gene hypermethylation profile of human cancer." *Cancer Res* 61(8): 3225-9.
- 186: Hsi, L. C., X. Xi, et al. (2005).** "The methyltransferase inhibitor 5-aza-2-deoxycytidine induces apoptosis via induction of 15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer cells." *Mol Cancer Ther* 4(11): 1740-6.
- 187: Liu, C., D. Xu, et al. (2004).** "Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by promoter methylation." *Exp Cell Res* 297(1): 61-7.
- 188: Kamitani, H., S. Taniura, et al. (2001).** "Expression of 15-lipoxygenase-1 is regulated by histone acetylation in human colorectal carcinoma." *Carcinogenesis* 22(1): 187-91.
- 189: Shankaranarayanan, P., P. Chaitidis, et al. (2001).** "Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene." *J Biol Chem* 276(46): 42753-60.
- 190: Zuo, X., J. S. Morris, et al. (2008).** "Chromatin modification requirements for 15-lipoxygenase-1 transcriptional reactivation in colon cancer cells." *J Biol Chem* 283(46): 31341-7.
- 191: Egger, G., G. Liang, et al. (2004).** "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* 429(6990): 457-63.
- 192: Abreu, P. A., G. Dellamora-Ortiz, et al. (2008).** "DNA methylation: a promising target for the twenty-first century." *Expert Opin Ther Targets* 12(8): 1035-47.
- 193: Gronbaek, K., M. Treppendahl, et al. (2008).** "Epigenetic changes in cancer as potential targets for prophylaxis and maintenance therapy." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(5): 389-96.
- 194: Prokhortchouk, E. and P. A. Defossez (2008).** "The cell biology of DNA methylation in mammals." *Biochim Biophys Acta* 1783(11): 2167-73.

Kapitel 7 Publikationen

Publikationen:

Hennig R, Kehl T, Noor S, Ding XZ, Rao SM, Bergmann F, Fürstenberger G, Büchler MW, Friess H, Krieg P, Adrian TE. (2007). 15-lipoxygenase-1 production is lost in pancreatic cancer and overexpression of the gene inhibits tumor cell growth.

Neoplasia. 2007 Nov;9(11):917-26 (1. and 2.author are contributed equally)

Manuskript eingereicht bei *Cancer Research*:

Kehl T, Hennig R, Bergmann F, Fürstenberger G, Friess H, Krieg P (2009).

15-Lipoxygenase-2, a novel tumor suppressor in pancreatic cancer ?

(1. and 2.author are contributed equally)

Posterpräsentationen:

Seema Noor, R. Hennig, Timo Kehl, SM. Rao, MW. Büchler, G. Fuerstenberger, H. Friess, TE. Adrian, P. Krieg. 15-Lipoxygenase-1 a tumor suppressor in pancreatic cancer ? Poster; *AEK Kongress Frankfurt 2007*

Timo Kehl, Seema Noor, R Hennig, SM. Rao, MW. Büchler, G. Fuerstenberger, H. Friess, TE. Adrian, P. Krieg. 15-Lipoxygenase-1 a tumor suppressor in pancreatic cancer ? Poster; *PhD DKFZ-Posterpräsentation Heidelberg 2007*

Timo Kehl, Seema Noor, R Hennig, G Fuerstenberger, and P Krieg.
Growth suppressive effects of 15-Lipoxygenase Isoforms
in pancreatic cancer. Poster; *PhD Meeting Weil der Stadt 2008*

Timo Kehl, Seema Noor, R Hennig, G Fuerstenberger, and P Krieg.
Growth suppressive effects of 15-Lipoxygenase Isoforms
in pancreatic cancer. Poster; *Leopoldina Symposium Frankfurt 2008*

Vorträge:

Timo Kehl, R Hennig, F Bergmann, G Fürstenberger, H Friess, P Krieg.

Die Wiederherstellung des 15-Lipoxygenasestoffwechsels hemmt das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen und induziert die Expression des Tumorsuppressors p53. Vortrag; *Deutscher Pankreasclub 2008, ausgezeichnet mit einem Reisestipendium, gestiftet vom Deutschen Pankreasclub e.V.*

Kapitel 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Karzinogenese von menschlichen Epithelgeweben und Zellen	4
Abbildung 2: Lage und Aufbau des menschlichen Pankreas	6
Abbildung 3: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen.....	7
Abbildung 4: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen	8
Abbildung 5: Tumorprogressionsmodell des duktaalen Adenokarzinoms	12
Abbildung 6: Enzymatische Reaktion der PLA ₂ zur Freisetzung von Arachidonsäure aus der Membran.....	17
Abbildung 7: Möglichkeiten der Umsetzung von freigesetzter Arachidonsäure	18
Abbildung 8: Der Lipoxygenase-Stoffwechsel.....	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums	22
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lipoxygenasereaktion.....	24
Abbildung 11: Die Tumorentwicklung wird durch verschiedene LOX-Formen.....	27
Abbildung 12: Schematische Darstellung der auf- und absteigenden Alkoholreihe	63
Abbildung 13: Graphische Darstellung der immunhistochemischen Analyse	64
Abbildung 14: Schematische Darstellung des TET-ON-Systems	70
Abbildung 15: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in gesundem Gewebe des Pankreas	72
Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in PanIN-Läsionen des Pankreas.....	74
Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben der chronischen Pankreatitis	75
Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben des duktaalen Adenokarzinom	77
Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse von 15-LOX-2 in Geweben.....	78
Abbildung 20: RT-PCR Analyse der Expression von 15-LOX-2	79
Abbildung 21: Immunoblot-Analyse der 15-LOX-2-Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien	80
Abbildung 22: Verwendete Vektoren des klassischen TET-ON-Systems.....	82
Abbildung 23: Ausgangsvektor pRTS-1 und modifizierte 15-LOX-2-Varianten von pRTS-1	83
Abbildung 24: Bestimmung der optimalen Antibiotika-Selektionsbedingungen	84
Abbildung 25: Bestimmung der optimalen Antibiotika-Selektionsbedingungen	85
Abbildung 26: DOX-induzierte 15-LOX-2-Expression in verschiedenen Doppeltransfektanten	87
Abbildung 27: Bestimmung der DOX-induzierten Expressionsstärke	89
Abbildung 28: Bestimmung der DOX-induzierten Expressionsstärke	90
Abbildung 29: Bestimmung der Dosisabhängigkeit der 15-LOX-2-Expression	91
Abbildung 30: Bestimmung der Dosisabhängigkeit der 15-LOX-2-Expression	92
Abbildung 31: Immunoblot-Analyse der DOX-induzierten pTR6-inakt.15-LOX-2 Klone 4 und 5	93
Abbildung 32: Zeitkinetik der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression im pRTS-System	94
Abbildung 33: Zeitkinetik der DOX-induzierten 15-LOX-2-Expression im pRTS-System	95
Abbildung 34: HPLC-Analyse der Produkte der DOX-induzierbaren 15-LOX-TET-ON-Expressionsklone	96
Abbildung 35: Immunosorb-Assay für die Bestimmung von 15S-HETE im Kulturüberstand	97
Abbildung 36: Immunolokalisation von 15-LOX-2 in den Zellen des pRTS-15-LOX-2 Klon 5.....	99
Abbildung 37: Immunoblot von 15-LOX-2 mit aufgereinigten nukleären und zytosolischen Proteinfractionen..	100
Abbildung 38: Einfluss von DOX auf das Wachstum von Panc1 Kontrollzelllinien.....	102
Abbildung 39: Wachstumsanalyse der DOX-behandelten pRTS-Klone	103
Abbildung 40: Wachstumshemmung der Klone beider TET-ON-Systeme nach Induktion von 15-LOX-2.....	105
Abbildung 41: Proliferationsanalyse mit WST-1 Assay für den aktiven pRTS-15-LOX-2 Klon 5.....	106

Abbildung 42: Additiver wachstumshemmender Effekt von 15S-HETE in 15-LOX-2-exprimierenden Panc1	107
Abbildung 43: Immunoblot-Analyse des aktiven pRTS-15-LOX-2 Klons 5	108
Abbildung 44: Reduktion der 15-LOX-2-vermittelten Wachstumshemmung durch den	109
Abbildung 45: AnnexinV Assay des pRTS-15-LOX-2 Klons 5.....	111
Abbildung 46: AnnexinV Assay des pRTS-inakt.15-LOX-2 Klons 4.....	112
Abbildung 47: Vergleichende TF-Chip-MAPK-Analyse	115
Abbildung 48: Vergleichende TF-Chip-MAPK-Analyse für den Transkriptionsfaktor p53	116
Abbildung 49: Immunoblot für p53 von den Klonen pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4 und.....	117
Abbildung 50: 15-LOX-2-vermittelte Änderung der p53-Expression auf transkriptioneller Ebene.....	118
Abbildung 51: Real-Time-PCR-Analyse der 15-LOX-2-vermittelten Änderung	119
Abbildung 52: Evaluation der spezifischen p53-siRNAs für die Transfektion der pRTS-Klone.....	121
Abbildung 53: Immunoblot der 120 h Stunden Behandlung des pRTS-15-LOX-2 Klons 5 mit DOX	123
Abbildung 54: Wachstumshemmung der DOX-induzierten sowie p53-siRNA transfizierten Klone	124
Abbildung 55: Nachweis einer CpG-Transitionsmutation im Codon 273 des <i>p53</i> -Gens in Panc1	125
Abbildung 56: Strukturelle Charakteristika des p53-Protein	126
Abbildung 57: Wirkung einer Gemzar-Kombinationstherapie auf das Wachstum von Panc-1-Zellen.....	128
Abbildung 58: Wirkung einer Cisplatin-Kombinationstherapie auf das Wachstum von Panc-1-Zellen.....	130
Abbildung 59: Identifizierung einer CpG-Insel im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens.....	133
Abbildung 60: Methylierungsmuster der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens	134
Abbildung 61: Methylierungsmuster der CpG's im Promotorbereich des 15-LOX-2-Gens.....	136
Abbildung 62: Induktion der 15-LOX-2-Proteinexpression durch Demethylierung	137
Abbildung 63: Immunoblot-Analyse der Valproat behandelten Tumorzelllinien Panc1 und Colo357	138
Abbildung 64: Immunoblot-Analyse der 5-Aza und Valproat behandelten Tumorzelllinien	140

Kapitel 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetische Syndrome mit einer Assoziation mit Pankreaskarzinomen	10
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms (TNM, 6 th Edition) [61].....	14
Tabelle 3: Eingesetzte Oligonukleotide.....	42
Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper.....	43
Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper.....	44
Tabelle 6: Verwendete Organismen.....	44
Tabelle 7: Für die Dissertation verwendete Software.....	45
Tabelle 8: Reaktionsansatz für den DNase Verdau	48
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die RT-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl.....	48
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die SAP-Reaktion mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl.....	51
Tabelle 11: Temperaturprogramm des Standard-PCR.....	53
Tabelle 12: Reaktionsansatz für die PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl.....	53
Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.....	57
Tabelle 14: allgemeines Protokoll für die Immunodetektion.....	59
Tabelle 15: Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe.....	61
Tabelle 16: Verwendete Medien für die einzelnen Zelllinien.....	65
Tabelle 17: Verwendete Antibiotika für die Zelllinie Panc1.....	66
Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Antibiotika.....	85
Tabelle 19: Prozentuale Auswertung des AnnexinV-Assays für den pRTS-15-LOX-2 Klon 5.....	111
Tabelle 20: Prozentuale Auswertung des AnnexinV-Assays für den pRTS-inakt.15-LOX-2 Klon 4.....	112

Kapitel 10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Eicosanoide und Tumorentwicklung von Dr. Gerhardt Fürstenberger in der Zeit vom 19.9.2005 bis 31.3.2009 unter Anleitung von Dr. Peter Krieg und Dr. René Hennig angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Oma bedanken, die mich nun jahrelang auf meinem akademischen Weg tatkräftig unterstützt haben. Vielen Dank für die schönen Stunden nach einem stressigen Laboralltag, die aufmunternden Worte und den starken Rückhalt. Ein besonderer Dank gebührt meiner Freundin Nicola für die Geduld und liebevolle Unterstützung mit der sie die Höhen und Tiefen während der Durchführung der Arbeit mitgetragen hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerhardt Fürstenberger für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas bedanken und für die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Anne Régnier-Vigouroux für die Übernahme des Erstgutachtens. Herrn Prof. Dr. Rainer Zawatzky danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu verfassen.

Mein größter Dank gilt meinen Betreuern und Doktorvätern Dr. Peter Krieg und Dr. René Hennig. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Arbeitsvorschläge haben mir während der Durchführung der Arbeit stets wertvolle Hilfe geleistet. Herzlich möchte ich ihnen vor allem auch für die Unterstützung in der Phase des Zusammenschreibens danken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich gerne bei Markus Stauch, Ina Kutschera, Susanne Latzko, Mareen Neumann sowie meinen beiden Azubis Claudia Felbinger und Markus Sohn bedanken. Insbesondere wünsche ich meinen beiden Azubis weiterhin viel Erfolg für ihre berufliche Zukunft. Bei allen Mitarbeitern und Kollegen: Seema Noor, Erik Dülsner, Silvia de Juanes, Nico Epp, Brigitte Steinbauer, Andrea Pohl-Arnold, Dirk Ramacher und Dagmar Kucher möchte ich mich für das angenehme freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bei den unzähligen

Analysen bedanken. Mein besonderer Dank gilt Erik Dülsner und Seema Noor, die mich beide stets tatkräftig unterstützt haben. Vielen Dank für die schöne Zeit und die unzähligen wissenschaftlichen Gespräche, die technische Hilfe sowie Ferndiagnose bei Problemen und Sackgassen.

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei folgenden fleißigen Kollegen für Ihre Unterstützung bedanken:

- Frank Bergmann für die Überprüfung sowie für die fachgerechte Auswertung der immunhistologischen Färbungen
- Rodrio Mora für die kontinuierliche Unterstützung mit den FACS-Analysen, welche stets unzählige Stunden in Anspruch genommen haben
- Bodo Brückner für die hervorragende Einführung in die Epigenetik und die Unterstützung bei sämtlichen Analysen
- Matthias Schick für die kompetente Hilfe bei den durchgeführten Real-Time-Versuchen
- Felix Bestvater für die Hilfe bei der Anfertigung der Laser-Mikroskop Aufnahmen

Auf diesem Wege ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung an all diejenigen, die ich hier namentlich nicht erwähnen konnte.