

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung,
Comprehensive Cancer Center Nord,
Sektion für Molekulare Onkologie
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**TNF-REZEPTOR-ASSOZIIERTER FAKTOR 2
SCHÜTZT PANKREASKARZINOMZELLEN VOR
CD95-VERMITTELTER APOPTOSE UND STEIGERT
DEREN INVASIVITÄT**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JIANG, PING

aus Jiangsu, V.R. China

Kiel (2010)

1. Berichtstatter:
2. Berichtstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt:

Priv.- Doz. Dr. rer. nat. Trauzold
Prof. Dr. rer. nat. Schäfer
16.09.2010
Kiel, den 03.08.2010

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Pankreaskarzinom	3
2.2	Apoptose - der programmierte Zelltod	4
2.3	CD95/Fas - der Todesrezeptor	6
2.4	Malignität und Invasivität	7
2.5	Die TRAF(TNF- Rezeptor-assoziiertes Faktor) Familie	9
2.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Bezugsquelle der Chemikalien	13
3.2	Zellkulturmedien und Zusätze	14
3.3	Antikörper und rekombinante Proteine	15
3.3.1	Primäre Antikörper	15
3.3.2	Sekundäre Antikörper	15
3.4	Labormaterialien	16
3.5	Gewebegewinnung und Immunhistochemische Detektion	16
3.6	Zelllinien – Übersicht	17
3.7	Zellkultur	18
3.7.1	Langzeitlagerung der Zellen	18
3.7.2	Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen	18
3.7.3	Zählen von Zellen	19
3.7.4	Einfrieren von Zellen	19
3.8	Molekularbiologische Routinemethoden	19
3.8.1	Transfektion	19
3.8.2	Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA- Lysate	20
3.8.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	20
3.8.4	Protein-Gelelektrophorese	21
3.9	Western-Blot und Immundetektion	21
3.9.1	Western-Blot	21
3.9.2	Immundetektion	22
3.10	Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS-Analysen)	22
3.11	DNA-Fragmentationsassay (Jam-Assay)	24
3.12	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	25
3.13	Invasions-Assay	27
3.14	Gelatinezymographie	27
4	Ergebnisse	29
4.1	Die TRAF2-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien korreliert mit der Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose	29
4.2	Die Überexpression von TRAF2 im Pankreaskarzinom	31

4.3	Stabile Transfektion von Colo357-Zellen mit TRAF2-pEGFP-C1 DNA	33
4.4	Überexpression von TRAF2 schützt Colo357-Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose	34
4.5	Analyse von CD95-Rezeptoren an der Zelloberfläche	35
4.6	Colo357/TRAF2-Zellen zeigen eine verminderte Bid- und PARP-Spaltung nach CH11-Stimulation	37
4.7	TRAF2-Überexpression geht mit einer Steigerung der Invasivität von Pankreaskarzinomzellen einher	39
4.8	Überexpression von TRAF2 erhöht die Sezernierung invasionsfördernder Proteine MMP2 und MMP9	42
4.9	Colo357/TRAF2-Zellen zeigen eine Steigerung der Aktivität von NF- κ B und AP-1	43
5	<i>Diskussion</i>	45
5.1	Die Identifizierung von TRAF2 als Resistenzfaktor bei Pankreaskarzinomzellen	45
5.2	TRAF2 vermittelte Mechanismen, die zu einem resistenten Phänotyp bei Pankreaskarzinomzellen führen	46
5.3	Ausblick und Fazit	49
6	<i>Literatur</i>	51

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper	JAM	just another method
AP-1	activator protein 1	JNK	c-jun N-terminal kinase
CD	cluster of differentiation	kDa	kilo Dalton
cFlip	FLICE -inhibitory protein	MMP	matrix metalloproteinase
cIAP	the inhibitor of apoptosis protein	NF- κ B	nuclear factor κ B
DD	death-domäne	PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
DISC	death inducing signaling complex	PARP	poly ADP-ribosyl polymerase
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBGD	Porphobilinogendesaminase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS(T)	phosphate buffered saline (+Tween)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	PH	pleckstrin-homology
EGFP	enhanced green fluorescent protein	PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
EMSA	electrophoretic mobility shift assay	PVDF	polyvinylidene difluoride
FACS	fluorescence activated cell scanning	SDS	sodium dodecyl sulfate
FADD	Fas-associated death domain	TEMED	N,N,N',N' Tetramethyldiamin
FCS	fötales Kälberserum	TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
FLIP	FLICE-inhibitory protein	TNF	Tumornekrosefaktor
IAP	inhibitor of apoptosis protein	TRAF	TNF- Rezeptor -assoziierter Faktor
IL	Interleukin	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

1 Zusammenfassung

Ein hohes Maß an Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli sowie der Kontrollverlust über das Wachstum von Zellen und die Fähigkeit Metastasen zu bilden, sind Hauptmerkmale von malignen Tumoren, speziell des Pankreaskarzinoms. Eine detaillierte Abklärung des molekularen Mechanismus ist notwendig, um weitere therapeutische Angriffspunkte zu ermöglichen.

TRAF2 gehört zu den zytoplasmatischen Adapterproteinen, die mit Todesrezeptoren interagieren. TRAF2 stellte sich überexprimiert in den Pankreaskarzinomen dar, im Vergleich mit normalen Pankreasgeweben und Geweben einer chronischen Pankreatitis. Die TRAF2-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien korrelierte mit der Resistenz gegenüber einer durch CD95 vermittelten Apoptose.

Eine durch stabile Transfektion erzielte Überexpression von TRAF2 in ursprünglich apoptosefähigen Colo357-Zellen schützte diese vor einer CD95 vermittelten Apoptose.

Bei der Suche nach möglichen Mechanismen, die die antiapoptotische Wirkung von TRAF2 erzeugen, konnte eine Aktivierung von NF- κ B in den TRAF2-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Diesem Transkriptionsfaktor sind apoptosehemmende Funktionen zugeschrieben.

Die TRAF2-Überexpression führte *in vitro* außerdem zu einer gesteigerten Invasivität der Pankreaskarzinomzelllinie colo 357. Die hohe Aktivität von AP-1 ist möglicherweise für die Sekretion invasivitätsfördernder Zytokine verantwortlich. Die Schlussprodukte dieser Transkriptionsfaktoren, die Proteine MMP2 und MMP9, wurden in den TRAF2-überexprimierenden Zellen deutlich hochreguliert. Die beiden Proteine sind als proteolytische Enzyme bekannt.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren die Beteiligung von TRAF2 an der Regulation von sowohl invasivitätsfördernden nicht-apoptischen als auch apoptischen Signaltransduktionswegen. TRAF2 kann somit eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des malignen Phänotyps des Pankreaskarzinoms zugeschrieben werden.

2 Einleitung

2.1 Das Pankreaskarzinom

Auf Grund der in den letzten 20 Jahren stetig steigenden Inzidenzrate des Pankreaskarzinoms und der Aggressivität des Tumors mit seiner äußerst schlechten Prognose nimmt die Bedeutung des Pankreaskarzinoms zu. Das duktale Adenokarzinom des Pankreas, das mit 75 % bis 92 % der häufigste histologische Typ des Pankreaskarzinoms darstellt (Sternheim *et al.*, 2000), wird aufgrund seines invasiven Wachstums, seiner rapiden Progression und therapeutischen Resistenz immer als eine sehr aggressive und destruktive Krankheit bezeichnet. Erst spät auftretende Symptome der Erkrankung sowie erschwerte diagnostische und therapeutische Möglichkeiten, die auf Grund der anatomischen Lage des Pankreas mit enger Beziehung zu großen Gefäßen, Nerven- und Lymphbahnen gegeben sind, verlangen neue Diagnose- und Therapiekonzepte. In der Statistik der tumorassoziierten Todesfälle in der westlichen Welt nimmt das Pankreaskarzinom den fünften Platz bei Männern und den vierten Platz bei Frauen ein, trotz einer relativ kleinen Inzidenz von 10 Fällen/100 000 Einwohner (Krebs in Deutschland 2003 – 2004). Die bisher einzige Möglichkeit der Heilung bietet in die Chirurgie die von Whipple und Kausch 1935 erstmals beschriebenen Duodeno-pankreatektomie. Aber nur 10 bis 20 % der Pankreaskarzinompatienten kommen für diese potentiell kurative Operation in Frage. Ihre 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 20 % (Henne-Bruns *et al.*, 2000). Eine weitgehende Resistenz gegenüber adjuvanten Therapieformen wie Radio-, Chemo- oder Immuntherapie trägt maßgeblich zu geringen Überlebensraten bei (von Bernstorff *et al.*, 1999; Andren-Sandberg *et al.*, 1997; von Bernstorff *et al.*, 2001). Diesem Phänomen liegt hauptsächlich eine Unempfindlichkeit der Karzinomzellen gegenüber apoptotischen Stimuli zugrunde. Zur Aufklärung dieses Umstandes soll die vorliegende Arbeit beitragen.

2.2 Apoptose - der programmierte Zelltod

Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst. Im Jahre 1972 wurde die physiologische Zellelimination erstmals als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt (Kerr *et al.*, 1972).

Apoptose ist ein genetisch fixiertes Programm, zu dessen Ausführung potentiell jede kernhaltige Zelle im Organismus fähig ist. Sie unterliegt jedoch strengen Kontrollmechanismen durch eine Vielzahl zellulärer pro- und antiapoptotischer Proteine mit verschiedenen Angriffspunkten (Igney *et al.*, 2002), deren Gleichgewicht über das Schicksal der Zelle entscheidet.

Nicht mehr funktionsfähige, nicht mehr benötigte und kranke Zellen werden physiologisch das ganze Leben lang durch apoptotische Mechanismen entfernt, z. B. die B-Lymphozyten, nachdem die Infektion bekämpft ist oder die T-Lymphozyten, die sich gegen körpereigenes Gewebe richten würden. Damit ist Apoptose von entscheidender Bedeutung für das Gleichgewicht des Immunsystems, für das Abschalten einer Immunantwort, die Selbsttoleranz und Immunsuppression. Verminderte Apoptose kann auf diesem Weg zum Auftreten von Autoimmun- und Tumorerkrankungen führen.

Gleichzeitig spielt Apoptose auch eine große Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung der Gewebemöostase vom mehrzelligen Organismus. Die Zellen, die durch virale Infektion oder durch Mutation geschädigt sind, werden durch Apoptose entfernt (Thompson *et al.*, 1995). Ein „zuviel“ an Apoptose spielt eine große Rolle bei vielen Krankheiten, z. B. bei Hepatitiden oder einer HIV-Infektion (Ameisen *et al.*, 1991). Anhaltend verminderter Zelltod und ungehemmtes Wachstum verursachen im Gewebe Veränderungen, die in letzter Konsequenz zu malignen Neoplasien führen können.

Gebräuchliche Strategien zur Bekämpfung von Krebserkrankungen wie Radio-, Chemo- oder Immunotherapie zielen primär darauf ab, Apoptose auszulösen. Dies ist jedoch nur begrenzt möglich, wenn Tumorzellen während ihrer Progression eine

Apoptoseresistenz entwickeln (Bardeesy *et al.*, 2002). Die gesteigerte Expression antiapoptotischer Proteine sowie die Herabregulation oder Mutation proapoptotischer Proteine sind häufig nachgewiesene molekulare Korrelate hierfür.

Prinzipiell gibt es zwei Hauptsignalwege um die Apoptose zu initiieren. Der intrinsische Signalweg wird durch die Mitochondrien vermittelt. Radio- und Chemotherapie entfalten auf diese Weise, bei der dem Tumorsuppressorgenprodukt p53 eine Schlüsselrolle zukommt, ihre Wirkung. Der extrinsische Weg ist „Todesrezeptor“-vermittelt. Es kommt zu einer Bindung von Todesliganden an spezifische Rezeptoren der Tumor- Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie an der Zelloberfläche. Deren Trimerisierung und die Transduktion des Signals über rezeptoreigene Todesdomänen in das Innere der Zelle sind Beginn dieses Apoptoseweges (Banner *et al.*, 1993; Peitsch *et al.*, 1995). Mitochondrien sind am „Todesrezeptor“-vermittelten Weg fakultativ beteiligt. Dieser Unterschied lässt eine Einteilung in Typ I-Zellen ohne und Typ II-Zellen mit Beteiligung eines mitochondrialen Verstärkersystems zu (Scaffidi *et al.*, 1998).

Sowohl externe als auch interne Signale führen dazu, dass Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird und so genannte Caspasen aktiviert werden. Diese sind spezifische Proteasen, die eine normalerweise inaktive DNase aktivieren, welche die DNA der sterbenden Zelle in kurze Stücke zerschneidet. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleine membranumschlossene apoptotische Körperchen ab (blebbing) (Krammer *et al.*, 2000), die wiederum durch spezialisierte Phagozyten aufgenommen werden (Savill *et al.*, 2000).

2.3 CD95/Fas - der Todesrezeptor

Gegenwärtig sind 6 Todes-Rezeptoren bekannt: Der 55 kDa große TNF-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, die TRAIL-Rezeptoren DR3, 4, und 5, sowie DR6 für den noch kein Ligand identifiziert wurde. Als erster Rezeptor dieser Art wurde CD95 (Apo1/ Fas) 1989 beschrieben und bis heute intensiv untersucht (Itoh et al., 1991). Diese in der Plasmamembran lokalisierten Transmembran-Rezeptoren sind durch ihre Primärstruktur repetitiver, cysteinreicher extrazellulärer Domänen charakterisiert, welche die Trimerisierung dieser Rezeptoren vermitteln und die Bindung der ebenfalls trimeren Liganden ermöglichen. Zusätzlich enthalten sie im intrazellulären Teil eine als Death-Domäne (DD) bezeichnete Aminosäuresequenz, welche die Bindung von signaltransduzierenden Adapterproteinen und die Bildung des DISC (death inducing signaling complex) vermittelt (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Bei einigen Tumoren wurde die Abwesenheit des CD95 auf der Zellmembran beobachtet (Butler et al., 1998).

Einige wissenschaftliche Untersuchungen zeigen, dass CD95 die Aktivität des NF- κ B stimuliert (Wajant et al., 2000; Ponton et al., 1996; Trauzold et al., 2001), und zwar über die Überexpression der antiapoptotischen Proteine wie cIAP1, cIAP2, TRAF1, Bcl-xL, Bcl-2, Bfl-1 und Flip (Wajant et al., 2003) bei den apoptoseresistenten Tumorzellen.

CD95 induziert nicht nur Apoptose, sondern beeinflusst auch andere Zellprozesse, z. B. die Regeneration von Leberzellen und die Zellproliferation (Wajant et al., 2003). Abhängig vom Liganden, kann über CD95 nicht nur die Caspasecascade, sondern auch der JNK (c-jun N-terminal kinase)-Pathomechanismus aktiviert werden. (Wajant, 2002). Das verschiedene Resultat wurde vermutet mit Zelltype relevant.

2.4 Malignität und Invasivität

Bei Neoplasien unterscheidet man nach ihrer Dignität, also entsprechend ihrer Fähigkeit, Metastasen auszubilden, zwischen benignen und malignen Neoplasien. Die Folgen bösartigen Tumorwachstums für den Organismus sind sehr vielfältig. Tumorwachstum kann zum einen unmittelbar zu lokalen Wirkungen im Nachbargewebe führen und zum anderen auch systemische (den gesamten Organismus betreffende) Wirkungen verursachen. Entscheidend für den Krankheitsverlauf ist häufig das Metastasieren, die Ausbildung von Tochtergeschwulsten, die ihrerseits in den betroffenen Organen zu einer Reihe von Funktionsstörungen führen können (Riede et al., 2004). Die unkontrollierte Vermehrung, vor allem der Metastasen, schädigt lebenswichtige Organe, bis diese ihre Funktion nicht mehr erfüllen können. Die meisten Patienten sterben nicht am Primärtumor, sondern an dessen Metastasen (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2007).

Verschiedene Forschungsergebnisse der letzten Jahre demonstrierten, dass die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM), Bestandteil der Basalmembran, die Tumorinvasion fördert (Liotta et al., 1980). Die ECM, die umfangreiche Typen von Kollagenen, Fibronektinen, Elastinen und Proteoglyken umfasst, wird von Proteinasen z. B. Metalloproteinasen (MMPs) degradiert (Liotta et al., 1990; Stetler et al., 1993). MMPs werden von Tumorzellen und/oder Stromazellen als latente Formen freigesetzt, und gelegentlich aktiviert (Poulsom et al., 1992; Zucker et al., 1992). Die Aktivität der MMPs in den Tumorgeweben oder in den inflammatorischen Geweben kann von TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) herunterreguliert werden. Ein erhöhtes Auftreten an MMPs oder TIMPs bestimmt das invasive Potential der Tumorzellen (Sato et al., 1992).

Zu der MMP-Familie gehören vier Typen von Kollagenasen (MMP1, 8, 13, und 18), drei Typen von Stromelysin (MMP1, 10, and 11) und die 72- und 92-kDa-Form von Typ-IV- Gelatinasen oder Kollagenasen (MMP2 and MMP9) (Itoh et al., 1998). Das

Typ-IV Kollagen ist ein integrierter Bestandteil der Basalmembran. Die Überexpression von Kollagenasen, MMP2 und MMP9 spielt eine große Rolle beim Durchbrechen der Basalmembran von den Tumorzellen (Liotta et al., 1986). Dass eine Überexpression von MMP2 und MMP9 mit der Metastasierungsfähigkeit assoziiert ist, wurde in umfangreichen Tumormodellsystemen und Tumorgewebe beobachtet (Bernhard et al., 1994; Hua et al., 1996; Sehgal et al., 1998; Sugiura et al., 1998).

Eine der wichtigsten Ursachen für die schlechte Prognose beim Pankreaskarzinom ist dessen außergewöhnlich invasiver Wachstumscharakter und das Metastasierungspotential. Es wurde beobachtet, dass die mRNAs für MMP2 und MMP9 in Pankreaskarzinomgewebe überexprimiert werden (Bernhard et al., 1994).

2.5 Die TRAF(TNF- Rezeptor-assoziiierter Faktor) Familie

Die zytoplasmatischen Domänen innerhalb der Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie unterscheiden sich sehr stark hinsichtlich ihrer Länge, Funktion und Art der assoziierten Proteine. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über zwei Klassen zytoplasmatischer Adapterproteine: über TRAFs und „death domain“ (DD)-Moleküle (Wajant et al., 1999; Fesik, 2000; und Inoue et al., 2000).

Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factors (TRAFs) sind die Adapterproteine, die an die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie binden und die intrazelluläre Signaltransduktion induzieren. Sechs verschiedene TRAF-Proteine wurden bislang isoliert. Sie haben alle eine ähnliche C-terminal-Domäne, die so genannte TRAF-Domäne. Die TRAF-Domäne vermittelt Homo- bzw. Heterotrimerisation sowie die Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. mit der zytoplasmatischen Domäne der TNF-Rezeptoren. Mit Ausnahme von TRAF-1 haben die TRAF-Proteine noch eine Ring-Domäne und fünf bis sieben Zink-Domänen. Die Ring-Domäne ist an der Regulation der Gentranskription beteiligt und die Zink-Domäne kann Protein-, DNA- sowie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Arch et al., 1998). Da TRAF-Proteine keine intrinsische Aktivität haben, werden sie als Adapter-Proteine bezeichnet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die TRAF-Rezeptor-Interaktionen.

TRAF1 und TRAF2 waren ursprünglich als Komponenten des TNF-R1 Signal-Komplexes identifiziert worden, und werden als prototypische Mitglieder dieser phylogenetisch konservierten TRAF-Familie angesehen. TRAF2, wie auch andere TRAFs, können direkt an verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie binden und außerdem noch mit verschiedenen interzellulären Proteinen interagieren, wie z. B. mit MAP3K (kinase of the mitogen-aktiviert protein kinase)-Familie und mit anti-apoptotischen Proteinen wie cIAP (inhibitor of apoptosis protein)-1 und -2 oder mit dem cFlip-Protein (FLICE -inhibitory protein) (Wajant et al., 2001). Tabelle 2 gibt ein paar Beispiele der Proteine, die mit TRAF2 interagieren.

Tabelle 1: Interaktionen zwischen TRAF-Proteinen und Rezeptoren (modifiziert nach Arch *et al.*, 1998).

		TRAFs					
		TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF4	TRAF5	TRAF6
Rezeptoren der TNF- Rezeptorfamilie	TNF-R1						
	TNF-R2		+				
	CD27		+	+		+	
	CD30	+	+	+		+	
	CD40		+	+		+	+
	4-1BB	+	+	+			
	OX40	+	+	+		+	
	LT-βR		+	+		+	
	FAS						
	DR3						
	DR4(TRAIL-R1)						
	DR5(TRAIL-R2)						
	HVEM	+	+	+		+	
	NGFR	+	+	+	+	+	+
	RANK	+	+	+		+	+
	BCMA	+	+	+			
	TACI			+		+	+
	XEDAR	+		+			+
	Troy		+			+	+
	LMP-1	+	+	+		+	
IL-R1							

Tabelle 2: einige Beispiele von Proteinen, die mit TRAF2 interagieren

Name	Interaktion	Funktion
TNF-R2	ZH*, Co-IP**(ektopisch ex.)	Proliferation der Thymozyten wird reguliert von der Signalwirkung des TNF-R1
CD30	ZH, GST Fusion-Protein	Entwicklung der TH2-Zellen
CD40	ZH, Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Schalter der B-Zellen-Aktivierung.
OX40	ZH, Co-IP(ektopisch ex) GST Fusion-Protein,	Differenzierung der TH2-Zellen
CD27	Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Entwicklung und Antwort der T-Zellen
TRANCE-R/RANK	Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Entwicklung der Lymphknoten
HVEM	GST Fusion-Protein	Proliferation der T-Zellen
ATAR	Co-IP(ektopisch ex)	
p75NTR	Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Entwicklung des sensorischen Neuron
4-1BB	ZH, GST Fusion-Protein, Co-IP(endo. ex)	co-Stimulation der T-Zellen
TAJ	Co-IP(ektopisch ex)	Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie
IL-15R α	Co-IP(endo. ex)	Anti-apoptotisches Cytokin
TRADD	ZH, Co-IP(ektopisch ex), Co-IP(endo. ex)	TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung und TNF-induzierte Apoptose
RIP	Co-IP(ektopisch ex), Co-IP(endo. ex)	TNF-induzierte JNK-Aktivierung
clAP1	ZH, GST Fusion-Protein, Co-IP(ektopisch ex)	Inhibitor von Caspase 3 und 7
clAP2	ZH, GST Fusion-Protein, Co-IP(ektopisch ex)	Inhibitor von Caspase 3 und 7
TANK/I-TRAF	ZH, GST Fusion-Protein, Co-IP(endo. ex)	Regulator der TRAF Funktion
TRIP	ZH, GST Fusion-Protein	Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung
A20	ZH	Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung und der JNK-Aktivierung
TTRAP	Co-IP(ektopisch ex)	Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung
Peg	ZH, Co-IP(ektopisch ex)	-
TRAF1	ZH, Co-IP(ektopisch ex)	Regulator der TRAF Funktion
Bcl10	ZH	Regulator der TRAF Funktion
Cflip/Casper	Co-IP(ektopisch ex)	Hemmung des Signaltransfer des Todes-Rezeptors
Filamin	Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Aktin-bindendes Protein
ASK1	Co-IP(ektopisch ex), Co-IP(endo. ex)	Differenzierung des Neurons, Induktion der Apoptose
GCK	Co-IP(ektopisch ex)	MAP4K
MEKK1	Co-IP(ektopisch ex)	MAP3K beteiligt bei TNF- und IL induzierter JNK-Aktivierung
NIK	ZH, Co-IP(ektopisch ex)	LT β -R Signalübermittlung
IRE1	ZH, Co-IP(endo. ex)	Stress Signalübermittlung ER- resident Kinase
CDK9	ZH, Co-IP(ektopisch ex), GST Fusion-Protein	Regulation des Zellzyklus
TNIK	Co-IP(ektopisch ex)	Regulation der Zytoskeleton

*, ZH, Zwei- Hybrid System; ** Co-IP, Co-Immunopräzipitation

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Präliminäre Daten aus der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Anna Trauzold (Sektion Molekulare Onkologie, Uniklinik Kiel) zeigten, dass das Adapter-Protein TRAF2 in einigen Pankreastumorzelllinien hoch expremiert wird. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Besteht eine Korrelation zwischen TRAF2-Expression und der Sensitivität von Pankreastumorzellen gegenüber der Behandlung mit agonistischen anti-CD95 Antikörpern?
2. Wird TRAF2 in Pankreastumorgeweben vermehrt expremiert?
3. Welche phänotypische Konsequenz hat die Überexpression von TRAF2 in Pankreastumorzellen?

Diese Überlegungen dienten als Leitlinie und prägten den Verlauf der Arbeit. Ziel der Arbeit ist es also, die Rolle von TRAF2 im Pankreaskarzinom eingehender zu untersuchen, um potentielle Angriffspunkte für eine gezielte Therapie dieser Krankheit aufzuzeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquelle der Chemikalien

Aceton	Hedinger, Stuttgart
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biochrom KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
ECL™/ECL™plus (enhanced chemiluminescence)	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methyl-H3-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Mycoplasma Test Kit	Boehringer, Ingelheim
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco's	Life Technologies, Eggenstein
Proteinase Inhibitor Cocktail	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rainbow Marker, RPN 756	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Tween	Merck-Schuchardt, Eggenstein

3.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Fötiales Kälberserum (FCS)	Hyclone, Logan, UT, USA
Geneticin (G418)	Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute)	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin 0,05%-EDTA 0,02%	Life Technologies, Eggenstein
anti-CD95 Clone CH11	Coulter Immunotechnology, Hamburg
anti-CD95 ligand	Apotech/Alexis, Grünberg

3.3 Antikörper und rekombinante Proteine

3.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Einsatz	Hersteller
anti- β -Aktin	mouse (monoclonal)	Western Blot	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
anti-Bid (C-20)	goat (polyclonal)	Western Blot	R&D Systems, Wiesbaden
anti-PARP (Ab-2)	rabbit (polyclonal)	Western Blot	Calbiochem
anti-TRAF2	mouse (monoclonal)	Immunhisto- chemie	Biocarta, Hamburg
anti-TRAF2	rabbit (polyclonal)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

3.3.2 Sekundäre Antikörper

anti-rabbit-HRP- conjugated	donkey (polyclonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
anti-mouse-HRP- conjugated	sheep (polyclonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
anti-goat-HRP- conjugated	donkey (polyclonal)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

3.4 Labormaterialien

4-20% Tris-Glycine SDS Gel	Life Technologies, Eggenstein
10% Zymogram (Gelatine) Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Eastman, New York, USA
Curix 60 Entwickler	Agfa, Dübendorf
Hyperfilm MP Röntgenfilm	Amersham, Braunschweig
PVDF Membran, Immobilon-P	Milipore, Eschborn
Wet Blot Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, München
Zellharvester	Skatron, Lier, Norwegen

3.5 Gewebegewinnung und Immunhistochemische Detektion

Um die TRAF2-Expression in Pankreastumoren und normalen Pankreasgeweben zu beurteilen, wurden von der Klinischen Probenbank der Uniklinik Kiel 36 duktales Pankreaskarzinomgewebeprobe und 5 normale Pankreasgewebeprobe (kryokonserviert) zur Verfügung gestellt, und mittels Immunhistochemie analysiert. Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Uniklinik Kiel unter der Genehmigungsnummer AZ 110/99 genehmigt.

Zunächst wurden 5 µm dicke Schnitte am Kryotom hergestellt. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und danach 10 Minuten in Aceton fixiert. Zur Blockierung der interstitialen Peroxidase wurden die Aceton-fixierten Schnitte zweimal mit 0,03% Wasserstoffperoxid (DAKO, Hamburg) für jeweils 10 Minuten behandelt. Interstinale Avidin und Biotin wurden vor der Detektion mit Avidin-Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) blockiert. Zur Detektion wurde ein Peroxidase-basierter Rabbit Vectastain Kit verwendet. Der polyclonale Antikörper Rabbit-anti-TRAF2 (Biocarta, Hamburg), als Primär-Antikörper, wurde in einer 1: 500-Verdünnung verwendet. Für die negative Kontrolle wurde der primäre Antikörper weggelassen.

Die TRAF2-Expression im Tumor wurde mit schwach = 1 (<10 % gefärbte Tumorzellen), mittelstark = 2 (10 %-50 %) und stark = 3 (>50 %) beurteilt.

Die Immunhistochemischen Färbungen der Kryoschnitte erfolgte unter Anleitung und in Kooperation mit Prof. Dr. med. Bence Sipos. Die pathologische Begutachtung sowie Auswertung wurde von Prof. Dr. med. Bence Sipos durchgeführt.

3.6 Zelllinien – Übersicht

Alle untersuchten Zelllinien sind menschlichen Ursprungs. Die Spalte „Referenz“ gibt die Erstveröffentlichungen an. Die angegebene Charakterisierung ist einer vergleichenden Veröffentlichung von Sipos B. *et al.*, 2003 entnommen.

Abkürzungen: Pa.: Pankreas, Ca: Karzinom

Zelllinie	Ursprung	Malignität und Differenzierung	Erstbeschreiber
Colo357	Pa. Adeno-Ca/ Lymphknotenmetastase	Gut differenziert Grad I-II	R. Morgan, Denver, USA
Panc89	Pa.-Kopf-Ca/ Lymphknotenmetastase	Grad II	T. Okabe, Tokyo, Japan
PancTul	Pankreaskarzinom	Grad II-III	M. v. Bülow, Mainz
Panc1	Pankreaskarzinom	Grad III	M. Lieber, New York, USA

3.7 Zellkultur

3.7.1 Langzeitlagerung der Zellen

Die Zellen wurden in FCS mit 10 % DMSO in flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

3.7.2 Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen

Von den zu kultivierenden Zellen wurde jeweils ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff bei 37 °C aufgetaut und mit Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden drei Minuten bei $1\ 400\text{ rpm}$ abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden nun erneut abzentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert und auf eine T25-Zellkulturflasche ausgesät. Das für die Zellkultur verwendete Medium besteht aus RPMI 1640 Medium, dem 10 % FCS, 1 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat zugesetzt wurde.

Nach der Transfektion mit einem Geneticin-Resistenz-Gen wurde dem Medium für Colo357-TRAF2-Zellen $600\text{ }\mu\text{g/ml}$ G418 (Geneticin) zur Selektion zugesetzt.

Zum Kultivieren wurden die Zellen in einem Begasungs-Brutschrank in $5,0\%$ CO_2 -haltiger Luft und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37 °C gelagert. Alle für die Experimente verwendeten Zellen wuchsen adhärent und einschichtig in T25-, T75- oder T175- Zellkulturflaschen.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen mikroskopisch auf Kontaminationen und zur Beurteilung der Konfluenz begutachtet. Ab einer Zelldichte von 70 bis 90 % wurden die Kulturen passagiert. Dazu wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-Lösung je nach Ablöseverhalten der Zelllinien für 5 bis 15 min im Brutschrank inkubiert. Die nun abgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit Medium versehen und drei Minuten bei $1\ 400\text{ rpm}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen im Verhältnis 1: 4 (Panc 1) bis zu 1: 5 (Colo357, PancTul, Panc89) neu ausgesät oder bei Bedarf zu diesem Zeitpunkt für eine gezielte Aussaat gezählt (s. 2.7.3).

Vierteljährlich und vor jedem Einfrieren neuer Aliquots wurden die Zellen auf Kontamination mit Mycoplasmen mittels PCR (kommerzieller Mycoplasmen Testkit) getestet.

3.7.3 Zählen von Zellen

Ein Teil der von der Kulturflasche abgelösten und in Suspension befindlichen Zellen wurde im Verhältnis 1: 10 sorgfältig mit Typanblau gemischt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit mehrfacher Wiederholung in einem Volumen von 0,1 µl gezählt, gemittelt, mit 10 (Verdünnungsfaktor) multipliziert und die Zellzahl pro ml ausgerechnet.

3.7.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden jeweils 1×10^6 Zellen in sterile 1,8 ml Nunc Röhrchen mit je 1,5 ml FCS mit 10 % DMSO pipettiert. Vor dem Einfrieren wurden die Nunc Röhrchen in einem auf 4 °C vorgekühlten Nalgene Einfrierbehälter äquibriert und hierin in einem –80 °C-Gefrierschrank eingefroren. Innerhalb der folgenden Woche wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

3.8 Molekularbiologische Routinemethoden

3.8.1 Transfektion

Die Plasmide für die Transfektion wurden von Dr. Frank Henkler, (Molekulare Innere Medizin, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Das TRAF2-pEGFP-C1 beinhaltet die vollständige cDNA-Sequenz des TRAF2-Proteins gekoppelt an die cDNA-Sequenz des EGFP-Proteins.

Die stabile Transfektion von Colo357-Zellen mit TRAF2-pEGFP-C1 DNA beziehungsweise pEGFP-C1 DNA wurde mittels eines AMAXA Nucleofection Kit (AMAXA Biosystems, Köln) durchgeführt.

Dazu wurden Colo357-Zellen, die zu 70 bis 85 % konfluent waren, mit Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l Nucleofector™ Solution V resuspendiert. Die Transfektion, die mit einem Elektroporation-Verfahren erfolgte, wurde mit 5 μ g Plasmid-DNA (TRAF2-pEGFP-C1-DNA bzw. pEGFP-C1-DNA) in 5 μ l ddH₂O nach Angaben des Herstellers (Programm T-20, AMAXA Biosystems, Köln) durchgeführt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Ausgehend von der Annahme, dass nur erfolgreich transfizierte Zellen eine Resistenz gegenüber Geneticin erworben haben können (plasmidgekoppeltes Resistenzgen), wurde dem Medium 600 μ g/ml Geneticin (G418) zugesetzt. Diese Konzentration wurde im Verlauf der weiteren Zellkultur beibehalten um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Somit erhielt man nach mehreren Passagen Klonpools aus Zellen, die alle TRAF2 stabil exprimieren.

3.8.2 Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA- Lysate

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und der Überstand abgesaugt. Zur eigentlichen Lyse wurden die Zellen mit eiskaltem RIPA-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Lysis-Effizienz wurden die Lysate dann für mindestens eine Stunde bei -20 °C eingefroren, auf Eis wieder aufgetaut, in Eppendorf-Röhrchen überführt und durch 10-malige Aspiration durch eine 26 Gauge Kanüle homogenisiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (14 000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20 °C.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 % NP40; 1 % Na-Desoxycholat, 0,1 % SDS, eine Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete, Boehringer) pro 50 ml Puffer.

3.8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerzieller Proteinassay der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.8.4 Protein-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte wurden 4-20% Tris-Glycine-Gele (Novex) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Lämmli-Puffer (4x, pH 6,8): 1,25 ml Tris/HCl (2M), 8 ml SDS (10 %), 308,5 mg Dithiotreitol (DTT), 2,02 ml Glycerin, 2 mg Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,3): 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS.

3.9 Western-Blot und Immundetektion

Die Kombination dieser Methoden wurde benutzt, um die elektrophoretisch aufgetrennten zellulären Proteine qualitativ und semiquantitativ indirekt darzustellen.

3.9.1 Western-Blot

Für den Transfer der Proteine wurde das Wet-Verfahren unter Benutzung einer Blotting-Kammer (Bio Rad) angewendet. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde die Membran wie folgt vorbereitet: jeweils fünfminütige Inkubation in Methanol, Aqua dest. und Blotting-Puffer. Vom Gel wurde das Sammelgel abgeschnitten und verworfen. Der Aufbau auf der Anodenseite des aufklappbaren Blotting-Kammer-Einsatzes wurde wie folgt durchgeführt:

zwei Lagen eines auf Gelmaße zugeschnittenen und mit Blotting-Puffer durchtränkten Whatmann 3MM-Papieres, die PVDF-Membran, das Gel und schließlich zwei weitere Lagen des Whatmann-Papieres. Anschließend wurde die Kathodenseite darauf geklappt und mit dem Riegel verschlossen. Dieser Einsatz wurde in die mit Blotting-Puffer gefüllte Blotting-Kammer (Mini Trans Blot Cell, Bio Rad) gesetzt. Dabei war darauf zu achten, dass der Einsatz vollständig mit Puffer bedeckt war. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bei 400 mA.

Ein Liter Blotting-Puffer auf Wasserbasis enthält 12,11 g Tris-Base, 14,26 g Glycin und 200 ml Methanol.

3.9.2 Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 5 % Magermilch/PBST blockiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörperpuffer inkubiert. Dieser Puffer enthielt den jeweiligen primären Antikörper in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung. Danach wurde die Membran 5 min, 15 min und 30 min mit PBST auf einem Schüttler gewaschen und anschließend mit dem in Antikörperpuffer gelösten sekundären HRP-konjugierten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung des beschriebenen Waschvorganges wurde die Membran für 5 min mit einem Chemilumineszenz-Substrat (ECL™ bzw. ECLplus™) inkubiert. Die Membran wurde schließlich mit Klarsichtfolie ummantelt und ein Röntgenfilm in einer Dunkelkammer damit exponiert.

Ein Liter PBS-Lösung (10 x) enthält: 80 g NaCl, 14,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl.

PBST (1 x) enthält PBS (1 x) und 0,1 % Tween20.

Antikörperpuffer enthält PBST (1 x) und 0,5 % Magermilchpulver.

3.10 Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS-Analysen)

Bei den Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)-Analysen handelt es sich um eine Form der Durchflusszytometrie, bei der vorbehandelte Proben (Zellen) mit einer Fluoreszenz „beladen“ wurden und diese Proben anschließend als einzelne Partikel (Counts) hinsichtlich ihrer absorptiven (photometrischen) und fluoreszierenden Eigenschaft (Qualität) und Stärke (Quantität) untersucht wurden. Die fluoreszenzzytometrischen Messungen erfolgten am „FACScan“ der Firma Becton Dickinson. Die Auswertung erfolgte am angeschlossenen PowerPC mit der „CellQuest“-Software

(Becton Dickinson).

Oberflächenrezeptoren-Analyse

Zur semiquantitativen Analyse von CD95-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden 2 -5 x 10⁵ am Vortag ausgesäte Zellen pro Probe in Suspension genommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Ablösung der adhärennten Zellen erfolgte mit Accutase™. Die nun in Suspension befindlichen Zellen wurden mit einer 0,05 % NaN₃/PBS Lösung gewaschen und abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit dem primären anti-CD95-Antikörper in entsprechender Verdünnung (s. Tab.) in 100 µl 1 % BSA/PBS 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der 0,05 % NaN₃/PBS-Lösung hinzugegeben, der Überstand abzentrifugiert und das Pellet erneut zweimal mit der 0,05 % NaN₃/PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre FITC-gekoppelte Antikörper (in 100 µl 1 % BSA/PBS) auf das Pellet gegeben und für 60 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden wieder wie nach der Primärantikörperinkubation gewaschen. Das Zellpellet wurde nun in 300 µl einer 1 % Paraformaldehyd/PBS-Lösung aufgenommen. Bis zur fluoreszenz-zytometrischen Messung wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die verwendeten Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Primärer Antikörper	anti-Fas-Ak Apo-1-3	1 : 50
Sekundärer Antikörper	anti-mouse-Ak FITC-gekoppelt	1 : 100

Bei der fluoreszenz-zytometrischen Messung wurden pro Probe 10000 Counts (differenziert messbare Partikel, hier Zellen) in ihrer fluoreszierenden Signalstärke im FL 1-Kanal (FITC) gemessen. Es wurden pro Zelllinie folgende Proben bestimmt:

1. Nur Zellen (Behandlung wie in 3., nur gänzlich ohne Antikörper)
2. Zellen nur mit sekundärem Antikörper behandelt
3. Isotypkontrolle (Behandlung wie in 4., nur mit unspezifischem primärem Antikörper gleichen Isotypes: hier IgG3)

4. Rezeptoren-Nachweis (Zellen behandelt mit spezifischem primärem Antikörper und sekundärem Antikörper)

Die Expression, beziehungsweise Anzahl der Rezeptoren konnte semiquantitativ aus dem Fluoreszenzzuwachs der „Rezeptoren Nachweis“ Probe gegenüber der „Isotypkontrolle“ ermittelt werden.

3.11 DNA-Fragmentationsassay (Jam-Assay)

Der JAM-Assay wurde zur Quantifizierung der Apoptose-Rate verwendet. Hierzu wurden auf einer 96well-Platte $1,5 \times 10^4$ Zellen von Colo357, $2,0 \times 10^4$ Zellen von Panc89, PancTul und Panc 1 ausgesät, um am folgenden Tag eine Konfluenz von 70 % zu erreichen.

24h nach Aussaat wurden die nun angewachsenen Zellen mit dem radioaktiv markierten Nukleotid ^3H -Thymidin markiert („gelabelt“). Dazu wurde auf jedes Well 10 μl einer Lösung aus 9,5 μl Medium und 0,5 μl ^3H -Thymidin zupipettiert. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide in das Genom der Zellen erfolgte über eine Dauer von 3 Stunden. Danach wurde der Überstand von den Wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen den in Medium gelösten apoptoseinduzierenden Substanzen (anti-CD95-Antikörper CH11) ausgesetzt und im Brutschrank für 24h inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die parallel ausschließlich mit 100 μl Medium pro Well inkubiert wurden. Zur Apoptoseinduktion wurden zu den vorhandenen 50 μl Präinkubationslösung im Well 50 μl CH11-Lösung gegeben. CD95 und TRAIL wurden stets in der Konzentration 100 ng/ml Medium eingesetzt. Die Inkubation wurde nach 24 Stunden mit einer Lyse der Zellen beendet. Hierzu wurden 100 μl einer 0,1 %igen SDS-Lösung zu jedem Well dazupipettiert und für 30 min im Brutschrank belassen. Die Inhalte der Wells mit den nun vollständig lysierten Zellen wurden in einem Zell-Harvester (Skatron, Lier, Norwegen) in eine Filtermatte eingesogen, wobei fragmentierte apoptotische DNA-Moleküle den Filter passieren konnten und unfragmentierte intakte DNA-Moleküle in der Filtermatte verblieben. Die

eingebaute Radioaktivität dieser unfragmentierten DNA wurde mittels eines „Liquid Scintillation Counters“ (Wallace Oy, Turku, Finnland) von der in einer Plastikfolie mit Scintillationsflüssigkeit eingeschweißten Filtermatte gemessen. Die Apoptose-Rate berechnet sich wie folgt: Apoptose in Prozent = $100 - (E/S) \times 100$, wobei E (experimentell) für den DNA-Gehalt (gemessen als cpm: counts per million) Apoptose induzierter Proben steht und S (spontan) den DNA-Gehalt natürlicher, zellspezifischer Apoptose darstellt.

3.12 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit dem electrophoretic mobility shift assay (EMSA) kann die Aktivierung von NF- κ B oder AP1 durch dessen Bindung an Promotersequenzen untersucht werden. Die Proteinlysate aus Zellkernen werden zusammen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid (DNA-Sonde) aus einer konservierten, für NF- κ B oder AP-1 spezifischen Promotersequenz inkubiert. Befindet sich aktives NF- κ B oder AP-1 im Proteinextrakt, so bilden sich DNA-Proteinkomplexe mit dem Oligonukleotid. Bei der anschließenden Auftrennung mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) unter nativen, nicht denaturierenden Bedingungen haben die DNA-Protein-Komplexe ein höheres Molekulargewicht als die freie Sonden-DNA und laufen deshalb langsamer im Gel. Sie binden eine retardierte Bande, welche autoradiographisch visualisiert wird.

Die EMSA – Analyse nach Erwerb der Kernproteinextrakte wurde von PD Dr. med. Alexander Arlt durchgeführt.

Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Es wurden folgende doppelsträngige Oligonukleotide einer für NF- κ B spezifischen Konsensussequenz aus dem Enhancer des κ -Leichtketten-Gens verwendet (Promega, Mannheim):

Sense 5´-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3´

Antisense 5'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-3'

Für AP1:

Sense 5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'

Antisense5'-GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT-3'

Der Transfer des Betastrahlers ^{32}P vom γ -Phosphat des dATP-Moleküls auf den 5'OH-Terminus des verwendeten Oligonukleotids erfolgte mittels der Polynukleotidkinase T_4

Der Makierungsansatz enthält:

Oligonukleotid (1,75 pmol/ μl)	2 μl
T4 Polynucleotid Kinase 10X Buffer	1 μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml)	1 μl
ddH ₂ O	5 μl
T4 Polynucleotid Kinase (5–10u/ μl)	1 μl

Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Zupipettieren von 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt. Es folgte die Aufreinigung der markierten Oligonukleotide mittels einer Gelfiltrationssäule, um freies γ -(^{32}P)-dATP abzutrennen.

Zur Bildung der DNA-Protein-Komplexe wurden 2 μl des Kernproteinextraktes mit 8 μl EMSA-Mix zusammengesetzt.

EMSA-Mix besteht aus folgenden Komponenten:

5 μl ddH₂O

2 μl Gel Shift Binding 5 x Buffer

Dieser Reaktionsansatz wurde in die Geltaschen von einem 6%igen Novex® Gel pipettiert. Anschließend wurde das Reservoir mit 0,5 xTBE-Puffer aufgefüllt und die Proteine bei 100 V, 4 °C aufgetrennt.

Danach wurde das Gel auf 3MM Whatman-Papier für 60 min bei 80 °C vakuumgetrocknet (Bio-Rad, München) und in einer Kassette mit einem Röntgenfilm bei -70 °C für über Nacht exponiert.

3.13 Invasions-Assay

Um die Invasivität von Pankreaskarzinomzellen zu quantifizieren, wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Fähigkeit der Tumorzellen die Fibroblastenschicht zu verdauen. In 24-Well-Platten wurden $1,5 \times 10^5$ /Well KiF-5 Fibroblasten ausgesät und in 2 ml Komplettmedium (RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat) für 4 Tage bis zu 100%iger Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit sterilem PBS gespült und für 1h in 500µl DMSO bei Raumtemperatur permeabilisiert und danach 2 x mit sterilem PBS gewaschen. Auf diese Fibroblastenschicht wurden 2×10^4 Tumor-Zellen ausgesät. Nun wuchsen die Tumor-Zellen für 72 bzw. 96 Stunden, wobei das Medium täglich erneuert wurde. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500 µl einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung für 15 min inkubiert. Nach der Entfernung der Färbelösung und dem Spülen mit PBS wurden die Zellen sofort fotografiert. Die permeabilisierten Fibroblastenzellen waren blau gefärbt, während die lebenden Tumorzellen ungefärbt waren. Die Invasionsareale waren als weiße Areale dargestellt.

3.14 Gelatinezymographie

Zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen wurde eine Zymographie mit Gelatine als Substrat im SDS-Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Die Zymographie entspricht einer Elektrophorese. Nach der Auftrennung der Proteine werden die Gelatinasen mit Ca^{2+} aktiviert und durch anschließende Anfärbung des Gels mit Coomassieblau die verbliebene Gelatine dargestellt. Ungefärbte Areale entsprechen

der Gelatinase-Aktivität der jeweiligen Proben. Da MMPs von Zellen in das Kulturmedium sezerniert werden, verwendet man zur Analyse den Zellüberstand.

In 6-Well-Platten wurden $2,7 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Komplettmedium (RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat) ausgesät und über 24 h bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Die Zellen werden zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen und für 24 h in 1 ml serumfreiem Medium gehalten. Nach 18 h wird der Zellüberstand abgenommen und abzentrifugiert. Die Zellen werden gezählt und die Proben bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Auftrennung der Proben wird ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel mit 1 mg/ml Gelatine verwendet (Intvitrogen, Karlsruhe). Die Proben werden mit 4 x konzentriertem, nicht reduzierendem Lämmli-Puffer 5 Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Heizblock denaturiert und mit einem Tris-Glycine-SDS-Laufpuffer (Novex®) in einem Zymogramm gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese der Proben dauert ca. 90 Minuten, wenn sie bei 125 V durchgeführt wird. Anschließend wird das Gel zur Renaturierung in einem Novex® Zymogram Renaturing-Puffer für 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 300 ml destilliertem Wasser erfolgt die Inkubation bei 37°C im Wasserschüttelbad mit einem kalziumhaltigen Novex® Zymogram-Entwicklungs-Puffer für mindestens 4 Stunden. Durch Einbinden des Kalziums in das katalytische Zentrum werden die MMPs aktiviert, und die Gelatine wird aufgespaltet. Anschließend wird das Gel nach Angaben des Herstellers gefärbt.

4 Ergebnisse

4.1 Die TRAF2-Expression verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien korreliert mit der Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

Die Malignität und die Invasivität verschiedener Pankreaskarzinome sind sehr unterschiedlich. Zusammen mit dem Grad der Sensitivität gegen Apoptose entscheiden sie letztendlich über die Therapieoptionen, den Krankheitsverlauf und die Prognose. Obwohl bei allen von uns verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien eine CD95-Expression auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte (Ungefroren *et al.* 1998), sind dennoch die meisten weitgehend resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Trauzold hat gezeigt, dass die resistenten Pankreastumorzellen eine Reihe anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-xL, IAPs, FLIP und PKC μ überexprimieren und sich somit vor CD95-vermittelter Apoptose schützen (Trauzold *et al.*, 2003; Trauzold *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigten unveröffentlichte Daten, dass auch das Adapterprotein TRAF2 in einigen Pankreastumorzelllinien hoch exprimiert ist. Um zu überprüfen, ob die Expression von TRAF2 mit der Sensitivität der Zellen gegenüber CH11 korreliert, wurde die Expression von TRAF2 in verschiedenen Zelllinien untersucht. Gleichzeitig wurde die Sensitivität dieser Zellen gegenüber dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 untersucht. Wie die Abbildung 1 zeigt, exprimieren PancTul-, Panc89 und Panc1-Zellen hohe, Colo357-Zellen dagegen deutlich geringere Mengen des TRAF2-Proteins.

Stellt man diesem Expressionsmuster eine Tabelle mit der CD95-vermittelten Apoptosesensitivität der Zelllinien gegenüber, so wird deutlich, dass die TRAF2-Expression mit der Sensitivität der Zellen korreliert. Colo357 exprimiert geringe TRAF2-Mengen bei vergleichsweise geringer Apoptoseresistenz. PancTul, Panc 89 und Panc1 sind charakterisiert durch eine hohe TRAF2-Expression und nahezu komplette Resistenz nach anti-CD95 Behandlung.

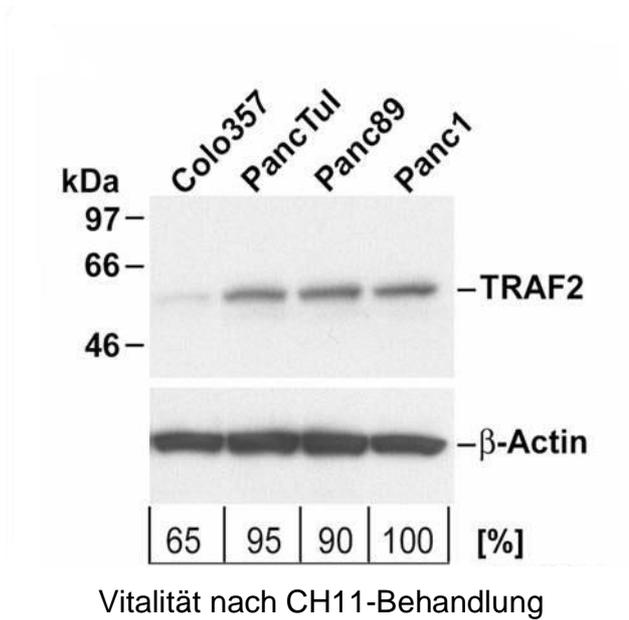


Abbildung 1: Expression von TRAF2 in Pankreaskarzinomzellen

Jeweils 15 µg Zellysate von Colo357, PancTu1, Panc89 und Panc1 wurden zur Elektrophorese auf ein 4-12%-Gradienten-Gel aufgetragen. Western Blot Analyse wurde mit Hilfe von Isoform-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β -Aktin Bestimmung sichergestellt. Zell Vitalität (Prozent der unbehandelten Kontrolle) gegenüber der zytotoxischen Wirkung von anti-CD95-Antikörper (CH11, 100ng/ml, nach 24h).

4.2 Die Überexpression von TRAF2 im Pankreaskarzinom

Um zu überprüfen, ob TRAF2 auch in Pankreastumoren überexprimiert wird, wurden Pankreastumorschnitte und Schnitte aus dem gesunden Pankreasgewebe sowie aus dem Gewebe einer chronischen obstruktiven Pankreatitis angefertigt und mittels Immunohistochemie auf die Expression von TRAF2 hin untersucht. Wie Abbildung 2 zeigt, wird das TRAF2-Protein in Pankreaskarzinomgewebe überexprimiert (Abb. 2C). In dem Gewebe einer chronischen obstruktiven Pankreatitis (Abb. 2B) wird TRAF2 weniger stark exprimiert, während in normal duktalem Pankreasgewebe (Abb. 2A) wenig oder gar keine TRAF2-Expression zu finden ist. Die Analyse von 36 Pankreastumorschnitten und 5 Schnitten aus dem gesunden Gewebe ergab, dass TRAF2 in 30 Pankreastumoren stark, in 4 mittelstark und in nur 2 schwach exprimiert wurde, wohingegen die Expression von TRAF2 in normalem Gewebe übereinstimmend als schwach gefunden wurde (siehe Tabelle 3).

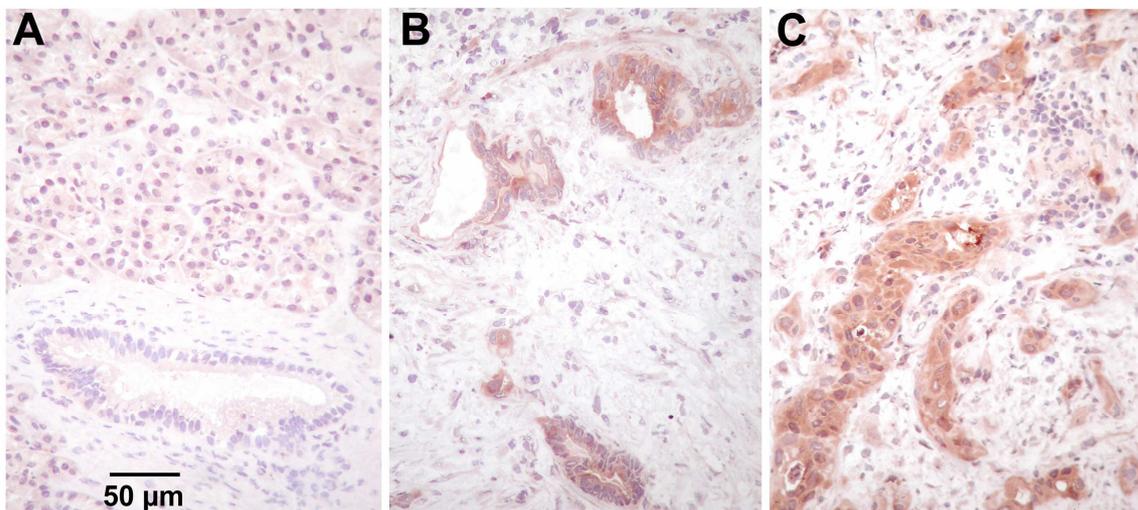


Abbildung 2: Expression von TRAF2 in normalem Pankreasgewebe (A), in den Geweben mit chronischer obstruktiver Pankreatitis (B) und im Pankreaskarzinomgewebe (C) Die TRAF2-Expression im Tumor wurde als „schwach“=1 (<10% Tumorzellen gefärbt), „Mittel stark“=2 (10%-50%) oder „Stark“ =3 (>50%) beurteilt. Klinische Parametern von der Patienten und Tumor sind Geschlecht (M= männlich; W= weiblich), Alter (Jahre), TNM- Stadium, und Histopathologische Grading.

Tabelle 3

Immunhistochemische Detektion von TRAF2 in Gewebeproben von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas

Gewebeprobe	Geschlecht	Alter	T	N	M	Grading	TRAF2 Expression
1	M	54	3	1	0	II	3
2	W	64	4	0	0	I	3
3	M	55	3	1	0	II	3
4	W	69	3	0	0	II	3
5	W	71	4	1	0	II	3
6	W	71	3	1	0	III	3
7	M	72	4	1	0	II	3
8	W	63	4	1	0	III	3
9	M	74	3	1	1	II	3
10	M	47	3	1	0	II	3
11	M	72	3	1	0	I	3
12	M	58	3	0	0	I	3
13	W	58	3	1	0	2	3
14	M	65	3	1	0	II	3
15	W	70	4	1	0	II	3
16	W	56	3	1	0	II	3
17	W	53	3	1	0	III	3
18	W	69	3	1	0	II	3
19	W	61	4	1	0	II	3
20	M	65	3	1	0	III	3
21	W	64	2	0	0	I	3
22	M	71	3	1	0	III	3
23	W	62	3	1	0	III	3
24	M	65	4	1	1	II	2
25	W	75	3	1	0	I	1
26	M	65	3	1	0	II	3
27	W	49	3	0	0	II	3
28	W	75	3	1	0	I	3
29	M	70	4	1	0	II	3
30	W	70	3	1	0	II	3
31	W	61	3	1	0	III	3
32	M	67	3	1	1	I	3
33	M	62	3	1	0	III	3
34	W	76	3	1	0	II	2
35	M	63	3	1	0	III	2
36	M	54	3	1	0	I	2

4.3 Stabile Transfektion von Colo357-Zellen mit TRAF2-pEGFP-C1 DNA

Um die Funktion von TRAF2 im Netzwerk der Apoptose-assoziierten Signalwege besser beurteilen zu können, wurden die CD95-sensitiven Colo357-Zellen mit einem Expressionsvektor für TRAF2 stabil transfiziert. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (Abb. 3) zeigen eine starke Expression des TRAF2-EGFP-Fusionsproteins in den Klon-„pools“-2 und -5 (Colo357/TRAF2-2 und Colo357/TRAF2-5) im Vergleich zu den im Experiment parallel mitgeführten, mit leerem Vektor transfizierten Zellen (Colo357/VK1 oder Colo357/VK2) und den ursprünglichen Colo357-Wildtypzellen (Colo357/WT).

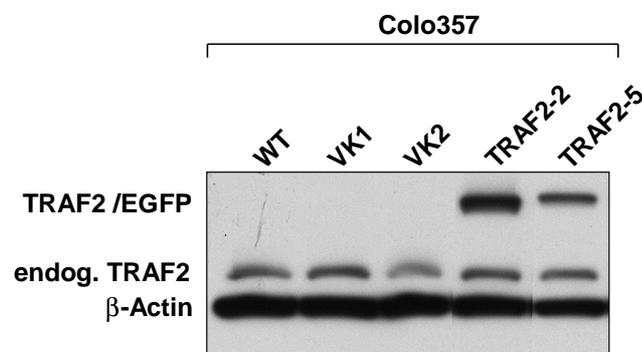


Abbildung 3: Überexpression von TRAF2 nach stabiler Transfektion von Colo357

Colo357-Zellen wurden mit einem für TRAF2 kodierenden Expressionsvektor oder einem leeren Vektor stabil transfiziert. Klon-„pools“ wurden jeweils auf ihre TRAF2-Expression hin im Western Blot untersucht. Dargestellt sind Colo357/Wildtyp, (Colo357/WT), Colo357/Vektorkontrolle 1(Colo357/VK1), Colo357/Vektorkontrolle 2(Colo357/VK2), Colo357/TRAF2-klon2(TRAF2-2) und Colo357/TRAF2 –klon5(TRAF2-5)

4.4 Überexpression von TRAF2 schützt Colo357-Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose

Die TRAF2-überexprimierenden Colo357-Zellen wurden auf ihre CD95-vermittelte Apoptosesensitivität hin untersucht. Hierzu wurden die TRAF2-Klone sowie die Kontrollzellen für 24 h mit CH11 behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend mit dem JAM-Assay untersucht. Abbildung 4 zeigt, dass es mit der Zunahme der TRAF2-Expression in Colo357-Zellen zu einem Anstieg des Überlebens nach 24-stündiger CH11-Inkubation um etwa 30 % kommt.

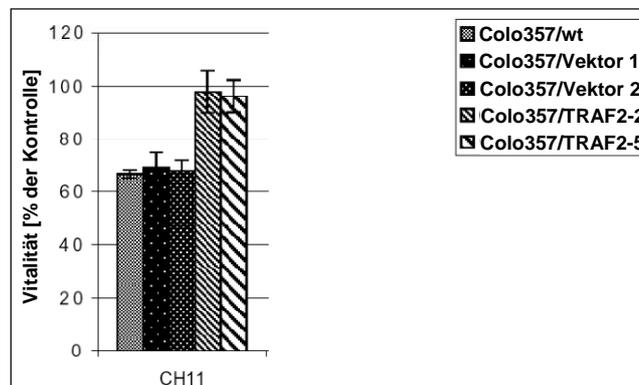


Abbildung 4: Überexpression von TRAF2 schützt Colo357-Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose

Colo357/Vektorkontrolle und Colo357/TRAF2 Zellen wurden 24 h mit dem anti-CD95 Antikörper CH11 behandelt (100 ng/ml). Das Ausmaß überlebender Zellen wurde im JAM-Assay ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Wiederholungen

4.5 Analyse von CD95-Rezeptoren an der Zelloberfläche

Voraussetzung für eine apoptotische Reaktion der Zellen auf eine Inkubation mit dem anti-CD95-Antikörper CH11 ist die Anwesenheit von CD95 auf der Zelloberfläche. Die Expression dieser Rezeptoren auf der Oberfläche von Colo357/TRAF2-Klon2, Colo357/TRAF2-Klon5, Colo357/Vektor1, Colo357/Vektor2, und Colo357/WT wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Wie die Abbildung 5 zeigt, exprimierten alle Zellen ähnliche Mengen von CD95 an der Zelloberfläche. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die höhere Apoptoseresistenz der TRAF2-überexprimierenden Zellen nicht mit der Abnahme der CD95-Expression zu erklären ist.

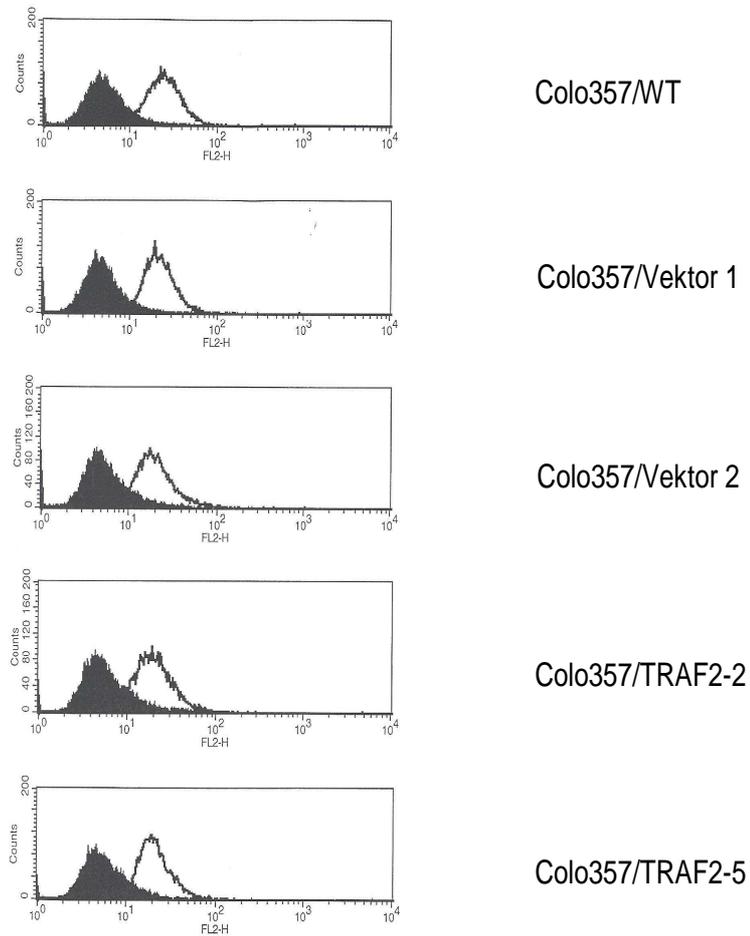


Abbildung 5: Analyse von CD95-Rezeptoren an der Zelloberfläche

Bei Colo357/Wildtyp(Colo357/WT), Colo357/Vektorkontrolle1(Colo357/VK1), Colo357/Vektorkontrolle2 (Colo357/VK2) und Colo357/TRAF2-Klon2 (TRAF2-2), Colo357/TRAF2-Klon5 (TRAF2-5), wurde vergleichend die Dichte der oberflächlichen CD95-Rezeptoren unter Einsatz des anti-CD95 Antikörpers Apo-1-3 mit dem FACS gemessen. Schwarz ausgefüllte Kurve: Isotypkontrolle; weiß ausgefüllte Kurve: CD95-Rezeptoren; Counts: gezählte Partikel; FL1-H: Fluoreszenzintensität auf dem FITC-Kanal

4.6 Colo357/TRAF2-Zellen zeigen eine verminderte Bid- und PARP-Spaltung nach CH11-Stimulation

Da Colo357-Zellen bezüglich CD95-vermittelter Apoptose als Typ II-Zellen einzustufen sind (Hinz *et al.*, 2000), können die Bid- und PARP-Spaltung nach CD95-Stimulation als Kontrollpunkte auf dem apoptotischen Signalweg untersucht werden, um einen potentiellen Angriffspunkt von TRAF2 einzugrenzen. Abbildung 6 zeigt bei beiden Colo357/TRAF2 eine deutlich abgeschwächte Bid-Spaltung im Vergleich zu Vektorkontrollen und dem Wildtyp (Abbildung 6B). Auch die CH11-induzierte Spaltung des PARP-Proteins ist bei den TRAF2-überexprimierenden Zellen deutlich gehemmt (Abbildung 6A).

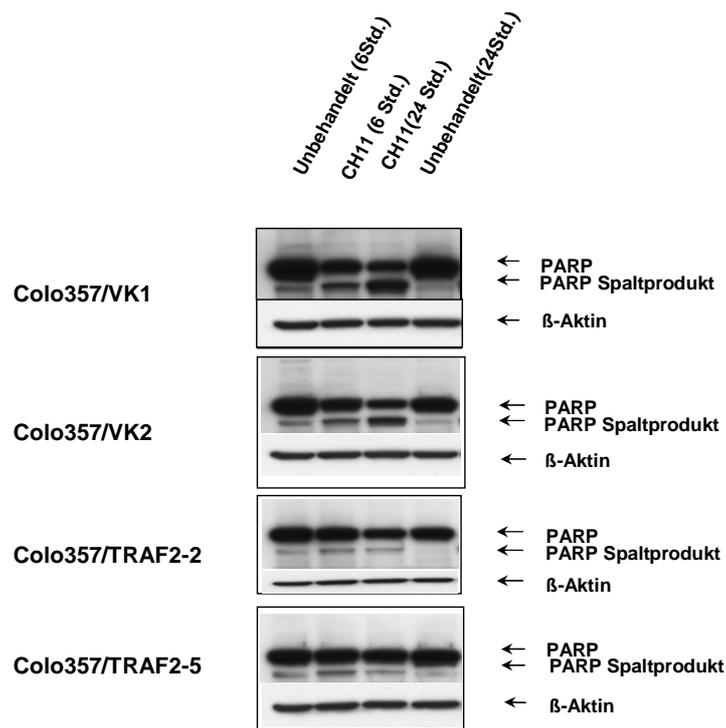


Bild A

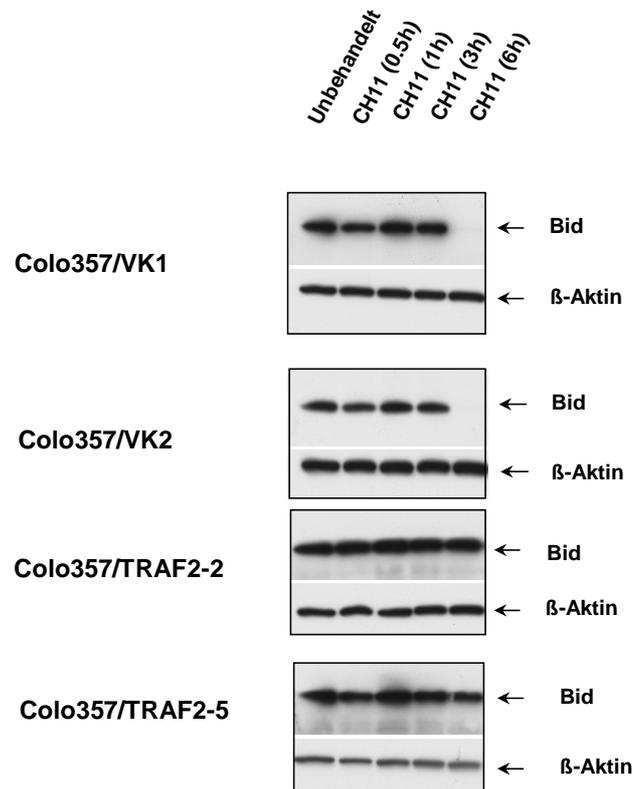


Bild B

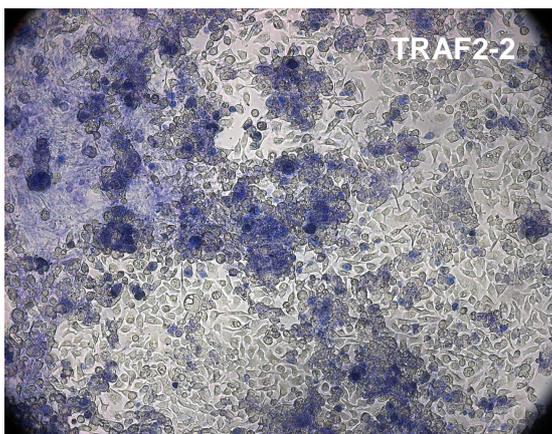
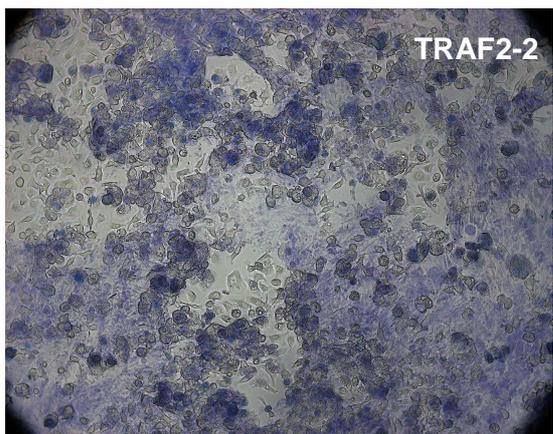
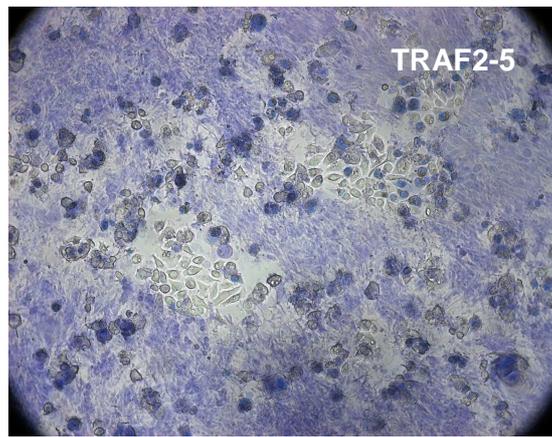
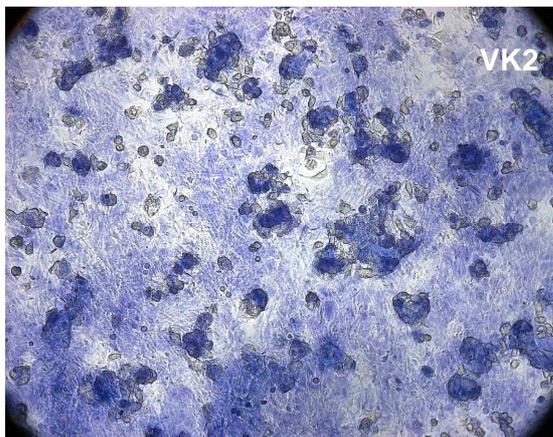
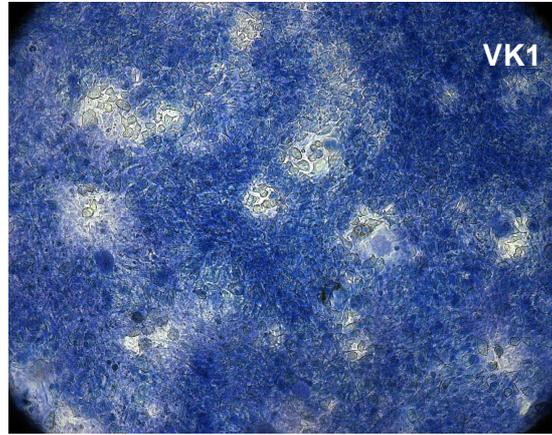
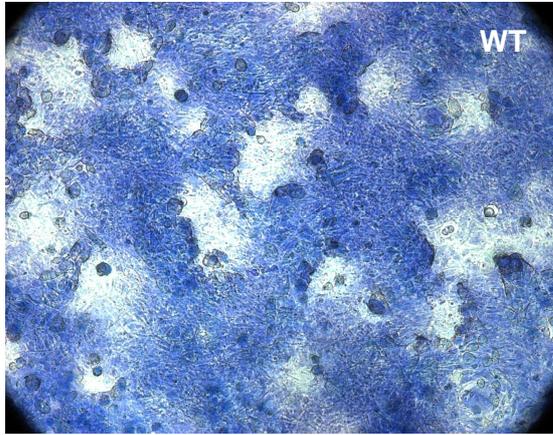
Abbildung 6: PARP- und Bid- Spaltung bei Colo357/Vektorkontrolle und Colo357/TRAF2 nach CH11-Behandlung

Die Zellen wurden für 24 h mit CH11 (100 ng/ml) behandelt und danach lysiert. Nachweis der Bid-(B) und PARP- Spaltung (A) erfolgte im Western Blot. Es wurden anti-Bid- und anti-PARP -Antikörper zur Detektion eingesetzt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β-Aktin Bestimmung sichergestellt.

4.7 TRAF2-Überexpression geht mit einer Steigerung der Invasivität von Pankreaskarzinomzellen einher

Neben der Apoptoseresistenz ist die hohe Invasivität ein charakteristisches Merkmal des Pankreaskarzinoms (Bardeesy *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob die Überexpression von TRAF2 die Invasivität der Pankreastumorzellen beeinflusst, wurden *in vitro*- Invasionsassays durchgeführt. Hierzu wurde ein in der Arbeitsgruppe etablierter Invasionsassay verwendet, der die Fähigkeit der Tumorzellen durch die Fibroblastenschicht durchzuwandern misst. Dazu wurden die Fibroblasten vor der Aussaat der Tumorzellen mit DMSO abgetötet, und anschließend mit Trypanblau angefärbt. Von Tumorzellen verdaute Fibroblasten stellten sich als weiße Löcher im Zellrasen der Fibroblastenschicht dar. Wie die Abbildung 7 zeigt, wachsen Colo357/Wildtyp-Zellen sowie die Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, wenig invasiv. Im Gegensatz dazu zeigen die TRAF2-überexprimierenden Zellen starkes invasives Potential.

Invasion 72h



Invasion 96h

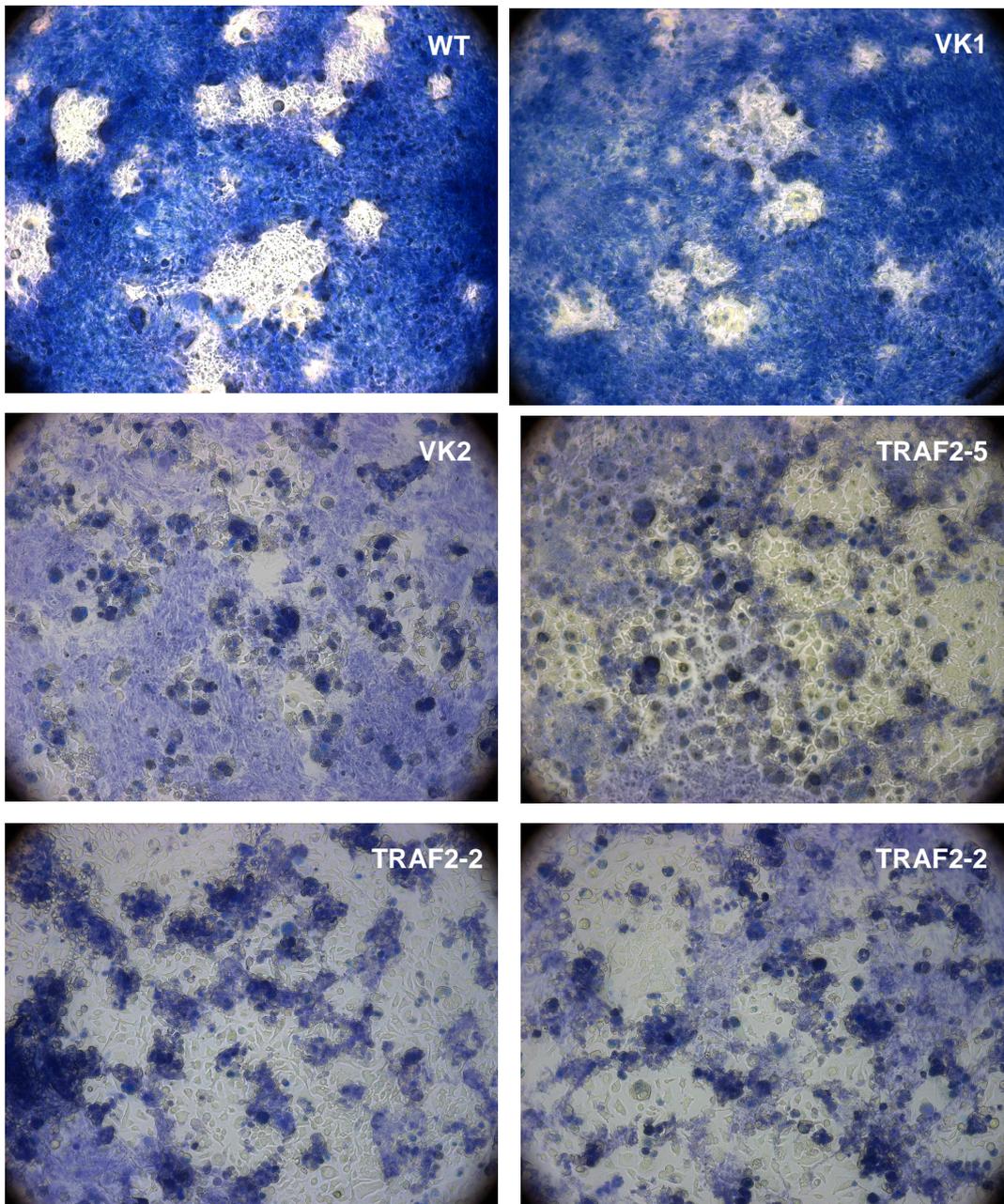


Abbildung 7: Die Überexpression von TRAF2 in Colo357-Zellen steigert deren Invasivität.

Colo357WT- und Colo357/VK (Klon-Pools 1 und 2) sowie Colo357/TRAF2- Zellen (Klon-Pools 2 und 5) wurden auf die permeabilisierten Fibroblasten ausgesät, und für 72h und 96 h weiter kultiviert. Anschließend wurde das Zellgemisch mit Trypanblau gefärbt (s. Kap. 2.13). Die dargestellten Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment mit fünf unabhängig durchgeführten Wiederholungen.

4.8 Überexpression von TRAF2 erhöht die Sezernierung invasionsfördernder Proteine MMP2 und MMP9

Die Invasivität der Tumorzellen wird durch die Aktivierung der proteolytischen Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), z.B. MMP-2 und MMP-9 gesteuert. Diese Enzyme wurden auch als hoch exprimiert im Pankreaskarzinom gefunden (Harvey *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 1998). Da die Expression von TRAF2 zu erhöhter Invasivität führte, wurde nachfolgend die Expression von MMP-2 und MMP-9 in Colo357/VK und Colo357/Klon-2P mittels Zymographie untersucht. Wie in der Abbildung 8 dargestellt, stieg die Expression der MMP-2 und MMP-9 stark in den TRAF2-überexprimierenden Zellen an.

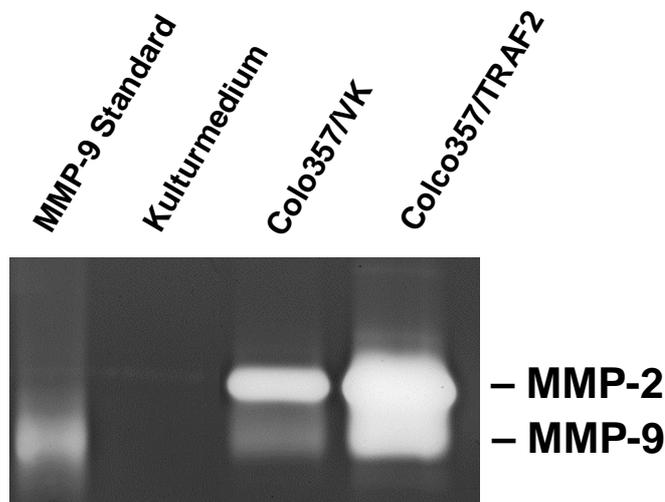


Abbildung 8: die Expression von MMP-2 und MMP-9 steigt in TRAF2-überexprimierenden Zellen.

Der Nachweis von MMP-2 und MMP-9 erfolgte in der Gelatine-Zymographie. Die Überstände von jeweils 2.7×10^5 Zellen wurden analysiert.

4.9 Colo357/TRAF2-Zellen zeigen eine Steigerung der Aktivität von NF- κ B und AP-1

Die Expression von MMP-9 wird durch NF- κ B und AP-1 reguliert (Takeshita *et al.*, 1999). Der MMP-2-Promotor wird zwar nicht direkt über NF- κ B reguliert, aber durch die Aktivierung von NF- κ B wurde die MMP-2-Expression indirekt erhöht (Huhtala *et al.*, 1990; Han *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NF- κ B und AP-1 die Pankreastumorzellen vor der CD95 induzierten Apoptose schützen (Trauzold *et al.*, 2001). Um herauszufinden, ob TRAF2-Überexpression Auswirkungen auf die Aktivität von NF- κ B und AP-1 haben könnte, wurde die Analyse der Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren mittels EMSA durchgeführt. Wie die Abbildung 9 zeigt, ist die Aktivität sowohl von NF- κ B als auch von AP-1 in den Colo357/TRAF2-Zellen im Vergleich zu den Colo357/VK-Zellen erhöht. Interessanterweise korrelierte die Aktivität von NF- κ B und AP-1 auch mit dem Apoptose-Resistenzstatus der Pankreastumorzelllinien. So war die Aktivität von beiden Transkriptionsfaktoren in sensitiven Colo357-Zellen sehr gering, in resistenten Zelllinien dagegen (siehe Abbildung 1 und 10) stark erhöht.

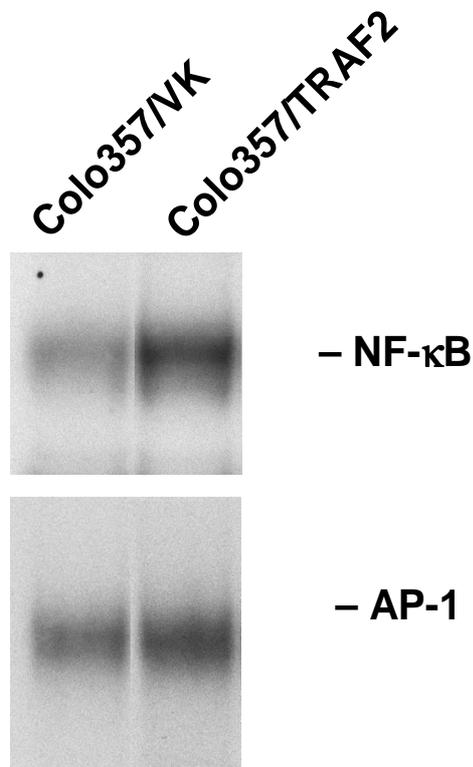


Abbildung 9: NF-κB und AP-1-Aktivität in TRAF2-überexprimierenden Zellen

Es wurden aus den unbehandelten Pankreastumorzellen Colo357/VK- sowie Colo357/TRAF2- Zellen Kernextrakte gewonnen. Jeweils 5 µg Kernextrakt wurde mit der radioaktiv-markierten NF-κB und AP-1 spezifischen Konsensussequenz inkubiert. Die Bindungsaktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wurde mit EMSA- Analyse untersucht.

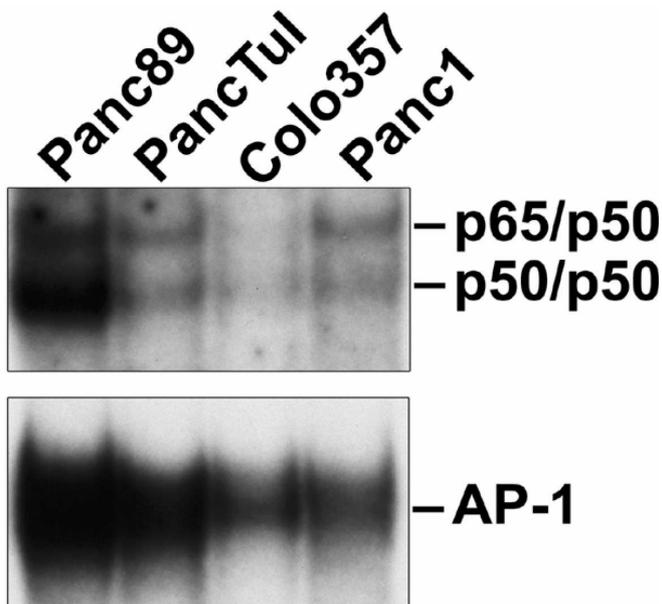


Abbildung 10: NF-κB und AP-1-Aktivität in Pankreastumorzellen und TRAF2-überexprimierenden Zellen.

Es wurden aus den unbehandelten Pankreastumorzellen Colo357, Panc89, PancTu1, Panc1 Kernextrakte gewonnen. Jeweils 5 µg Kernextrakt wurde mit der radioaktiv-markierten NF-κB (hier zwei häufigste Dimere p65/p50 und p50/p50) und AP-1 spezifischen Konsensussequenz inkubiert. Die Bindungsaktivität der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wurde mit EMSA- Analyse untersucht

5 Diskussion

5.1 Die Identifizierung von TRAF2 als Resistenzfaktor bei Pankreaskarzinomzellen

Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen zu eruieren, die zu dem hochmalignen Phänotyp des Pankreaskarzinoms mit seiner weitgehenden Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie beitragen. In diesem Kontext stand speziell die Rolle von TRAF2 im Mittelpunkt des Interesses. TRAF2, ein Adapter-Protein, gehört zu der TRAF-Familie, deren Mitglieder für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in die Zelle mitverantwortlich sind und somit über ihr Überleben oder über die Auslösung von Apoptose entscheiden (Chung *et al.*, 2002).

Eine Vielfalt veröffentlichter Daten beschreibt die Struktur und Funktion der Proteine der TRAF-Familie. Ergebnisse zu der Beteiligung von TRAF2 an der Signaltransduktion im Rahmen von Apoptose bei verschiedenen Zelltypen gaben Anhalt dafür, dass der Einfluss von TRAF2 auch beim Pankreaskarzinom nicht unerheblich ist. Über die Expression und Funktion der TRAF2 in normalem Pankreasgewebe sowie im Pankreaskarzinom war jedoch bisher nur wenig bekannt. Die hier präsentierten Versuchsergebnisse zeigen, dass die in gesundem Pankreasgewebe fast nicht nachweisbare TRAF2-Expression im Adenokarzinom des Pankreas signifikant erhöht ist. In der Übergangsform, dem hyperplastischen Pankreasgewebe, ist die Expression mäßig erhöht. Dabei korrelierte die Expression von TRAF2 mit der Sensitivität von Pankreastumorzellen *in vitro*. Colo357-Zellen exprimierten geringe TRAF2-Mengen bei vergleichsweise hoher Apoptosesensitivität. PancTul-, Panc89- und Panc1-Zellen sind charakterisiert durch eine hohe TRAF2-Expression und nahezu komplette Resistenz gegenüber anti-CD95-Behandlung.

5.2 TRAF2 vermittelte Mechanismen, die zu einem resistenten Phänotyp bei Pankreaskarzinomzellen führen

Die durch Gentransfer ausgelöste Überexpression von TRAF2 in CD95-sensitiven Colo357-Zellen diente hier als Methode, um erstens die bereits erhobenen Daten abzusichern, und zweitens die Rolle dieses Proteins in der Signaltransduktion besser beurteilen zu können. Die TRAF2-überexprimierenden Zellen wurden hierbei mit Zellen eines identischen Ursprungsgenoms verglichen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden unter der Annahme, dass in diesem Fall sämtliche festzustellenden Unterschiede allein auf der höheren TRAF2-Expression beruhen.

Nachdem der Erfolg der stabilen Transfektion in der Western-Blot-Analyse sichergestellt war, wurde der Unterschied in der Apoptosefähigkeit untersucht. Die TRAF2-Überexpression führte zu einer deutlichen Steigerung der CD95-Resistenz.

Den Beweis für die anti-apoptotische Funktion von TRAF2 lieferten zusätzliche Versuche unserer Arbeitsgruppe. So wurde gezeigt, dass eine Hemmung der TRAF2-Expression mit Hilfe von siRNA zur deutlichen Sensibilisierung der Panc89-Zellen gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose führte (Trauzold *et al.*, 2005).

Um den Mechanismus der TRAF2 ermittelten Apoptose näher zu untersuchen, wurde die Expression von CD95 an der Zelloberfläche sowie die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen nach CD95-Stimulierung untersucht. Da eine Abnahme der CD95-Rezeptordichte an der Zelloberfläche eine Zunahme an Resistenz gegenüber agonistischen CD95-Antikörpern zur Folge haben kann, wurde diese Dichte vergleichend gemessen, jedoch kein Unterschied zwischen den Zellenlinien festgestellt. Folglich kann ein derartiger Mechanismus als Ursache für eine Apoptoseunempfindlichkeit ausgeschlossen werden.

Für die CD95-induzierte Apoptose wurde ein Modell mit zwei verschiedenen Signalwegen (Typ I- und Typ II-Signalweg) vorgeschlagen (Scaffidi *et al.*, 1998). Für den

sogenannten Typ II Signalweg wurde gezeigt, dass es nach der Aktivierung von CD95 zur Aktivierung von nur sehr geringen Mengen von Caspase 8 am DISC kommt, die nicht ausreichen, um nachfolgende Effektorcaspasen potent zu aktivieren. Diese Zellen benötigen einen Verstärkungsmechanismus durch die Mitochondrien. So spaltet die aktivierte Caspase 8 das Bid-Protein. Das Bid-Spaltprodukt tBid transloziert zu den Mitochondrien und induziert die Freisetzung von Cytochrom C, wodurch die Bildung des Apoptosoms mit nachfolgender Caspase 3-Aktivierung eingeleitet wird.

Pankreaskarzinomzellen sind sogenannte Typ II-Zellen (Hinz *et al.*, 2000). Daher wurde auch in dieser Arbeit die Bid-Spaltung als „read-out“ für die Caspase-8-Aktivität analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TRAF2 zur deutlichen Hemmung der Bid-Spaltung führt. Diese Beobachtung, zusammen mit den anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Caspase 8-Aktivierung nach der Stimulation mit CH11 in TRAF2-Klonen gehemmt ist (Trauzold *et al.*, 2005).

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die CD95-induzierte PARP-Spaltung in den TRAF2-überexprimierenden Zellen deutlich gehemmt ist. Dies kann als Nachweis reduzierter Caspase 3-Aktivität gewertet werden, da PARP das direkte Substrat der Caspase 3 ist.

Im Hinblick auf Apoptoseresistenz nach der Stimulation von Todesrezeptoren oder Chemotherapie in Pankreaskarzinomzelllinien (Trauzold *et al.*, 2001; Arlt *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1997) konnte gezeigt werden, dass die Nuclear Faktor κ B (NF- κ B)-Aktivierung eine große Rolle spielt. NF- κ B steht für eine Gruppe von dimerischen Faktoren, die in praktisch allen Zelltypen und Geweben vorkommen. Die Bedeutung von NF- κ B für die zelluläre Signaltransduktion nach der Stimulation der Zelle durch z. B. Stress, Zytokine, freie Radikale, Ultraviolettstrahlung, Oxidanzien, LDL oder bakterielle oder virale Antigene ist bekannt (Pahl *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2002). NF- κ B liegt meist als p65/050 Heterodimer vor, andere Formen sind vergleichsweise selten (Verma *et al.*, 1995). Abgesehen von einigen Ausnahmen ist NF- κ B im Zellplasma inaktiv an seinen Repressor I κ B gebunden. Bei der Reaktion auf oben

genannte Stimuli wird I κ B phosphoryliert und degradiert, und das freigesetzte NF- κ B wandert in den Zellkern (Baeuerle et al., 1994; Siebenlist et al., 1994). Über die Bindung an bestimmte regulatorische Abschnitte der DNA kann jetzt NF- κ B die Transkription abhängiger Gene beeinflussen. NF- κ B hat zahlreiche Zielgene und vermittelt unterschiedlichste Wirkungen. Kontinuierlich erhöhte NF- κ B-Spiegel wurden in vielen Karzinomen beobachtet, z. B. beim Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinom (Deng et al., 2002; Romieu-Mourez et al., 2002). Viele Produkte von NF- κ B-regulierten Zielgenen haben eine bekannte antiapoptische Wirkung. Hierzu gehören z. B. IAPs (You et al., 1997; Deveraux et al., 1998), die Proteine der Bcl-2-Familie (Tamatani et al., 1999; Grossmann et al., 2000; Chung et al., 2000) und c-Flip (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001). Auch über die Beteiligung von TRAF2 als Zielgen von NF- κ B an seiner antiapoptischen Wirkung wurde bereits diskutiert (Wang et al., 1998). Basierend auf diesen Kenntnissen wurde in dieser Arbeit die Aktivität der Pankreastumorzellen mit und ohne hohe TRAF2-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, mit hoher TRAF2-Expression auch eine hohe NF- κ B-Aktivität aufweisen. Die stabile Überexpression von TRAF2 in Colo357-Zellen, die niedrige NF- κ B-Aktivität zeigten, führte darüber hinaus zur Erhöhung der NF- κ B-Aktivität. Somit wurde das TRAF2-Protein als Induktor der NF- κ B-Aktivität identifiziert.

Die Relevanz von TRAF2 in der Rolle des Faktors, der die Malignität beeinflusst, konnte auch durch die angefertigten immunhistochemischen Färbungen unterstrichen werden. Schnitte von 36 humanen Pankreas-Adenokarzinomen und 10 normalen Pankreasgeweben wurden auf ihre TRAF2-Expression hin untersucht. Die semiquantitative Auswertung ergab eine deutlich höhere TRAF2-Expression in den Ausführungsgängen der Adenokarzinome im Gegensatz zu den Normalgeweben. Die hauptsächliche subzelluläre Lokalisation war im Zytoplasma zu finden.

Die Invasivität des Karzinoms beeinflusst die lokale und systemische Ausbreitung des Tumors, und somit bestimmt sie den gesamten Krankheitsverlauf. Dem Pankreaskarzinom ist neben der Apoptoseresistenz ein hohes Metastasierungspotential eigen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass TRAF2-Überexpression

zur dramatisch verstärkten Invasivität mit erhöhter Expression von MMP 9 und MMP 2 führt. Vermehrte MMP 2 und MMP 9 wurden auch im Pankreastumorgewebe und Tumorzelllinien nachgewiesen und führen zu einer gesteigerten Malignität (Harvey *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 1998; Kuwada *et al.*, 2003). Um den Effekt der Überexpression von TRAF2 für die Invasivität der Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Invasionstest durchgeführt. Colo357/TRAF2-Klone zeigten ein deutlich gesteigertes Potential durch den Fibroblastenmonolayer zu wachsen, verglichen mit den Colo357/Vektor-Zellen. Interessanterweise zeigten auch Colo357/Vektor-Zellen das erhöhte Invasivitätspotential, wenn sie mit dem Kulturmedium von den TRAF2-Klonen inkubiert wurden (Daten nicht dargestellt). Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Hochregulation von urokinase type plasminogen activator (uPA) und Interleukin 8 in Zellkulturüberständen von TRAF2-überexprimierten Zellen (Trauzold *et al.*, 2005). Die beiden Proteine spielen aufgrund ihrer invasivitätsfördernden Wirkung in Pankreastumorzellen (Kuwada *et al.*, 2003) eine wichtige Rolle.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass TRAF2 die Pankreastumorzellen vor CD95 vermittelten Apoptose schützt und die Malignität und Invasivität dieser Zellen fördert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TRAF2 in über 90 % aller untersuchten Pankreastumoren stark überexprimiert wird. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle von TRAF2 in der Malignität des Pankreaskarzinoms hin.

5.3 Ausblick und Fazit

Basierend auf den Ergebnissen, dass TRAF2 zum malignen Phänotyp des Pankreaskarzinoms beiträgt, sind therapeutische Ansätze denkbar, bei denen TRAF2 möglichst spezifisch gehemmt wird.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Pankreaskarzinomzelllinien stellt den Schlüsselfaktor für den Resistenzmechanismus gegen CD95-vermittelte Apoptose

dar. Die Hemmung von NF- κ B erhöhte die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber der von CD95 und TRAIL vermittelten Apoptose (Trauzold *et al.*, 2001). Diese Arbeit bietet eine Erklärung für die Beeinflussung der Regulation von NF- κ B durch TRAF2. Allerdings sind weitere Untersuchungen zur detaillierten Abklärung des Mechanismus nach der Aktivierung von NF- κ B notwendig, um weitere therapeutische Angriffspunkte zu erarbeiten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das überexprimierte TRAF2 wahrscheinlich durch die hohe Aktivität von AP-1 die Sekretion der Proteine MMP2, MMP9, und IL 8 erhöht, die wiederum die *in vitro*-Invasivität von Pankreastumorzellen fördern. Eine therapeutische Blockierung der Sekretion der MMPs und könnte die Metastasenbildung verhindern. Todesrezeptoren vermitteln hier nicht nur eine apoptotische Antwort, sondern auch eine nicht-apoptotische. Diese nicht-apoptotische Antwort eröffnet einen neuen Weg zur Erforschung der Todesrezeptoren in ihrer Funktion als Mediatoren einer erhöhten Invasivität.

6 Literatur

Ameisen JC and Capron A (1991) **Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis.** Immunol. Today, **12**, 102-105

Andren-Sandberg A, Bäckman PL and Andersson R (1997) **Results of adjuvant therapy in resected pancreatic cancer.** Int. J. Pancreatol., **21**, 31-38

Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB (1998) **Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulate life and death.** Genes, **12**, 2821-2830

Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE and Schäfer H (2001) **Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin.** Oncogene, **20**, 859-68.

Baeuerle PA and Henkel T (1994) **Function and activation of NF-kappa B in the immune system.** Ann. Rev. Immunol., **12**, 141-79.

Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H and Lesslauer W (1993) **Crystal structure of the soluble human 55kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.** Cell, **73**, 431-445

Bardeesy N and DePinho RA (2002) **Pancreatic cancer biology and genetics.** Nature rev. Cancer, **2**, 897-908

Bernhard EJ, Gruber ST and Muschel RJ (1994) **Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells.** Proc. Natl. Acad. Sci., **91**, 4293-4297

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH and Wallach D (1995) **A**

novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J. Biol. Chem., **270**, 7795-8.

Butler LM, Hewett PJ, Butler WJ and Cowled PA (1998) **Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement.** Br. J. Cancer, **77**, 1454-9.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M and Dixit VM (1995) **FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.** Cell, **81**, 505-12.

Chung JY, Park YC, Ye H and Wu H (2002) **All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction.** J. Cell. Sci., **115**, 679-88.

Chung KC, Park JH, Kim CH, Lee HW, Sato N, Uchiyama Y and Ahn YS (2000) **Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels, NF-kappaB, and MAP kinases.** J. Neurosci Res., **59**, 117-25.

Dadgostar H and Cheng G (2000) **Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation.** J. Biol. Chem., **275**, 2539-44.

Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin SY and Hung MC (2002) **beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer.** Cancer Cell, **2**, 323-34.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS and Reed JC (1998) **IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.** EMBO J., **17**, 2215-23.

Fesik SW (2000) **Insights into programmed cell death through structural biology.** Cell, **103**, 273-82.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs, abgerufen am 12. Oktober 2007

Grossmann M, O'Reilly LA, Gugasyan R, Strasser A, Adams JM, Gerondakis S (2000) **The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression.** EMBO J., **19**, 6351-60.

Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M and Garner WL (2001) **TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP.** J. Cell Sci., **114**, 131-139.

Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, Venkataraman P, DeSouza N, Sait SN, Driscoll DL and Gibbs JF (2003) **Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer.** Clin. Cancer Res., **9**, 4935-43.

Henne-Bruns D, Vogel I, Lüttges J, Klöppel G and Kremer B (2000) **Surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: staging, complications and survival after regional versus extended lymphadenectomy.** World J. Surg., **24**, 595-602

Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer S, Walczak H, Kalthoff H and Ungefroren H (2000) **Bcl-xL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-mediated apoptosis.** Oncogene, **19**, 5477-5486

Hua J and Muschel RJ (1996) **Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system.** Cancer Res., **56**, 5279-5284

Huhtala P, Chow LT and Tryggvason K (1990) **Structure of the human type IV collagenase gene.** J. Biol. Chem., **265**, 11077-82.

Igney FH and Krammer PH (2002) **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** Nature rev. Cancer, **2**, 277-288

Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, Kobayashi N, Naito A, Azuma S and Yamamoto T

(2000) **Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling.** Exp. Cell Res., **254**, 14-24.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara N, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y and Nagata S (1991) **The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.** Cell, **66**, 233-243

Itoh Y (1998) **Degradation of extracellular matrix in cancer; activation of MMPs promotes cancer cell invasion and metastasis.** Cell Technol., **17**, 523-533.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Brit. J. Cancer, **26**, 239-257

Koshihara T, Hosotani R, Wada M, Miyamoto Y, Fujimoto K, Lee JU, Doi R, Arii S and Imamura M (1998) **Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma.** Cancer, **82**, 642-50.

Krammer PH (2000) Apoptose. Deutsches Ärzteblatt, **25**, 1752-1759

Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends 2008 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.6. überarbeitete Auflage,

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P and Wajant H (2001) **NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling.** Mol. Cell Biol., **21**, 3964-73.

Kuwada Y, Sasaki T, Morinaka K, Kitadai Y, Mukaida N and Chayama K (2003) **Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells.** Int. J. Oncol., **22**, 765-71.

Liotta LA (1986) **Tumor invasion and metastasesrole of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture.** Cancer Res., **46**, 1-7

Liotta LA (1980) **Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen** Nature, **284**, 67-8.

Liotta LA and Stetler SW (1990) **Metalloproteinases and cancer invasion**. Semin. Cancer Biol., **1**, 99-106.

Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K and Tschopp J (2001) **NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP**. Mol. Cell Biol., **21**, 5299-305.

O'Neill LA (2002) **Wanted: a molecular basis for specificity in toll-like receptor signal transduction**. Mol. Cell, **10**, 969-71.

Pahl HL (1999) **Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors**. Oncogene, **18**, 6853-66.

Peitsch MC and Tschopp J (1995) **Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family**. Mol. Immunol., **32**, 761-772

Ponton A (1996) **The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function**. J. Biol. Chem., **271**, 8991-5.

Poulsom R, Pignatelli M, Stetler SW, Liotta LA, Wright PA and Jeffery RE (1992) **Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia**. Am J Pathol., **141**, 389-96.

Riede UN, Werner M and Schäfer HE (Hrsg.) (2004) **Allgemeine und spezielle Pathologie**. Thieme, Stuttgart 382–384.

Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC and Sonenshein GE (2002) **Protein kinase CK2 promotes aberrant activation of nuclear factor-kappaB, transformed phenotype, and survival of breast cancer cells**. Cancer Res., **62**, 6770-8.

Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T and Tanaka J (1992) **Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors**

of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, **7**, 77-83.

Savill J and Fadok V (2000) **Corpse clearance defines the meaning of cell death.** *Nature*, **407**, 784-788

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME (1998) **Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.** *EMBO J.*, **17**, 1675-1687

Sehgal G, Hua J, Bernhard EJ, Sehgal I., Thompson TC and Muschel RJ (1998) **Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma.** *Am. J. Pathol.*, **152**, 591-596

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) **Structure, regulation and function of NF-kappa B.** *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 405-55.

Sipos B, Moser S, Kalthoff H, Torok V, Lohr M, and Klöppel G (2003) **A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform.** *Virchows Arch.*, **442**, 401-405

Sternheim ET, Voigt J, Kaspar W and Dippold WG (2000) **Das Pankreaskarzinom.** *Der Internist*, **41**, 848-859

Stetler SW, Liotta LA, Kleiner DJ (1993) **Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** *Faseb. J.*, **7**, 1434-41

Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC, Laug WE and DeClerck YA. (1998) **Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis.** *Cancer Res.*, **58**, 2209-16.

Takehita H, Yoshizaki T, Miller WE, Sato H, Furukawa M, Pagano JS and Raab-Traub N (1999) **Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2.** *J.*

Viol., **73**, 5548-55.

Tamatani M (1999) **Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons.** J. Biol. Chem., **274**, 8531-8.

Thompson CB (1995) **Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.** Science, **267**, 1456-1462

Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schütze S, Schäfer H, Oestern S, Röder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H and Kalthoff H (2001) **CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells.** Oncogene, **20**, 4258-69.

Trauzold A, Schmiedel S, Röder C, Tams C, Christgen M, Oestern S, Arlt A, Westphal S, Kapischke M, Ungefroren H and Kalthoff H (2003) **Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells.** Br. J. Cancer, **89**, 1714-21.

Ungefroren H, Voss M, Jansen M, Röder C, Henne-Bruns D, Kremer B and Kalthoff H (1998) **Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas Ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis.** Cancer Res., **58**, 1741-1749

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D and Miyamoto S (1995) **Rel/NF-kappa B/ I kappa B family: intimate tales of association and dissociation.** Genes Dev., **9**, 2723-35.

Von Bernstorff W, Spanjaard RA, Chan AK, Lockhart DC, Sadanaga N, Wood I, Peiper M, Goedegebuure PS and Eberlein TJ (1999) **Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via non-functional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand.** Surgery, **125**, 73-84

Von Bernstorff W, Voss M, Jansen M, Roeder C, Henne-Bruns D, Kremer B and

Kalthoff H (2001) **Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients.** Clin. Cancer Res., **7**, 925-932

Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P (2003) **Non-apoptotic Fas signaling.** Cytokine Growth Factor Rev., **14**, 53-66.

Wajant H, Haas E, Schwenzer R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C and Scheurich P (2000) **Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD).** J Biol. Chem., **275**, 24357-66.

Wajant H, Grell M and Scheurich P (1999) **TNF receptor associated factors in cytokine signaling.** Cytokine Growth Factor Rev., **10**, 15-26.

Wajant H and Scheurich P (2001) **Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling.** Int. J. Biochem. Cell Biol., **33**, 19-32.

Wajant H (2002) **The Fas signaling pathway: more than a paradigm.** Science Review, **296**, 1635-6.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV and Baldwin AS (1998) **NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.** Science, **281**, 1680-3.

Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR and Chiao PJ (1999) **The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells.** Clin. Cancer Res., **5**, 119-27.

Warshaw AL and Fernandez-del Castillo C (1992) **Pancreatic Carcinoma.** N. Engl. J. Med., **326**, 455-465

Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW (1997) **Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to**

TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*, **7**, 715-25.

You M, Ku PT, Hrdlicková R and Bose HR (1997) **ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein.** *Mol Cell Biol.*, **17**, 7328-41.

Zucker S, Lysik RM, Malik M, Bauer BA, Caamano J and Klein SA (1992) **Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung cancer cell lines and revertant cell lines: not an invariant correlation with metastasis.** *Int. J. Cancer*, **52**, 366-71.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Durchführung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt PD. Dr. rer. nat. Anna Trauzold, die mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift betreut und mir in allen fachlichen Fragen stets hilfreich zur Seite stand.

Prof. Dr. med. Bence Sipos und Priv. Doz. Dr. med. Alexander Arlt danke ich ganz herzlich für die unverzichtbare Zusammenarbeit sowie die freundliche Unterstützung.

Bei Angelika Duttman bedanke ich mich für die Unterstützung bei zahlreichen Methoden.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei Frau Dr. med. Jenny Friedmann für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ohne die vielseitige Unterstützung meiner Eltern wäre die Umsetzung meiner Promotion kaum möglich gewesen. Besonders ihnen möchte ich von ganzem Herzen danken.

Lebenslauf

Name: JIANG, Ping
Geburtsdatum: 05.05.1976
Geburtsort: Jiangsu, China
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Eltern: LI, Qinghua
JIANG, Wenqing

Bildungsweg:

09/1988 – 06/1994 Besuch des 6. Städtischen Gymnasiums in Wuxi mit Abschluss der Allg. Hochschulreife

09/1994 – 07/1999 Medizinstudium an der Tongji Medizinischen Universität, mit Erwerb eines Diploms für Humanmedizin

11/1999 – 04/2000 Besuch eines Deutschkurses der Volkshochschule Kiel

04/2000 – 03/2001 Besuch des Deutschkurses der Universität Kiel mit erfolgreichem Abschluss der „PNDS“ – Sprachprüfung

01/2005 – 04/2005 Diplomkurs „Gesundheitsversorgung in Entwicklungsländern“ an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, mit Erwerb eines Diploms für Tropenmedizin und community- health.

04/2001– 10/2005 Medizinstudium an der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Campus Kiel)

ab 11/2005 Assistenzärztin in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsklinikum des Saarlandes

Forschungsaktivitäten:

ab 2002: Promotion als medizinische Doktorandin in der „Molekularen Onkologie“ des Instituts für Experimentelle Tumorforschung, Comprehensive Cancer Center Nord, der Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Thema:” TRAF-2 schützt Pankreaskarzinomzellen vor CD95-vermittelter Apoptose und steigert deren Invasivität“

Veröffentlichungen:

Trauzold A, Röder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Muerköster S, Pagerols-Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H. (2005) **CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells.** FASEB J. 19:620-2.