Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt
Gastroenterologie und Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

Die funktionelle Interaktion von NFATc1 und EZH2 in der Karzinogenese des Pankreas

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades Doktor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt von

Teresa Luise Cecilia Christine Forster

aus Stuttgart

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 25.Oktober.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin : Frau Prof.Dr.D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof.Dr.med.V. Ellenrieder

1.Korreferent: Frau PD Dr. S. Müller-Brüsselbach

Widmung

In liebevoller Erinnerung an meine Mama und meine Oma

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

Abbildungsverzeichnis ..... **IX**

Tabellenverzeichnis ..... **X**

1 Einleitung **1**

1.1 Das Pankreaskarzinom **1**

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose des duktalen Pankreaskarzinoms 1

1.1.2 Histologische und molekulargenetische Eigenschaften des Pankreaskarzinoms 3

1.2 Die Histonmethyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) **5**

1.2.1 Histon- Modifizierungen 5

1.2.2 PRC2-Familie 6

1.2.3 Funktion und Regulation von EZH2 in verschiedenen Tumoren 7

1.2.4 Die Bedeutung von EZH2 im Pankreaskarzinom 8

1.3 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFATc1) **8**

1.3.1 Die Struktur von NFATc1 8

1.3.2 Der Calcium-/Calcineurin-/NFAT-Signalweg 9

1.3.3 Die Bedeutung von NFATc1 im Pankreaskarzinom 10

2 Zielsetzung der Arbeit **12**

3 Materialien **13**

3.1 Humane und Murine Zelllinien **13**

3.2 Lösungen und Puffer **14**

3.3 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien **17**

3.4 Kits **20**

3.5 Antikörper **20**

3.5.1 Antikörper für Immunologische Versuche 20

3.5.2 Antikörper für Western-Blot-Analysen 21

3.5.3 Antikörper für Chromatinimmunpräzipitationsversuche 21

3.6 Primer **22**

3.6.1 Primer für quantitative PCR 22

3.6.2 Primer für Chromatinimmunpräzipitationsversuche 22

3.6.3 siRNA-Konstrukt 22

3.7 Laborgeräte 22

3.8 Labormaterialien 25

3.9 Verwendete Softwareprogramme 26

4 Methoden 27

4.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz 27

4.1.1 Immunhistochemie 27

4.1.2 (Co-) Immunfluoreszenz 27

4.2 Zellbiologische Methoden 28

4.2.1 Zellkultur 28

4.2.2 Kultivierung 28

4.2.3 Passagieren von Zellen 28

4.2.4 Einfrieren, sowie Auftauen von Zellen 29

4.2.5 Messung der Zellzahl 29

4.2.6 Zellbehandlung 29

4.2.7 Transfektion mit siRNA 29

4.3 Molekularbiologische und immunologische Methoden: 30

4.3.1 Proteinexpressionsanalysen 30

4.3.1.1 Gewinnen von Zelllysat 30

4.3.1.2 Extraktion von Gesamtzelllysat 30

4.3.1.3 Quantitative Proteinbiobestimmung (nach Bradford) 30

4.3.1.4 SDS (Sodiumdodecylsulfat)- Polyacrylamid- Gelelektrophorese 31

4.3.1.5 Western Blot-Analyse-Verfahren 32

4.3.2 mRNA- Expressionsanalysen 33

4.3.2.1 RNA – Isolation 33

4.3.2.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren 33

4.3.2.3 Reverse Transkription 33

4.3.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) 34

4.3.2.5 Immunpräzipitation 35

4.3.2.6 Chromatinimmunpräzipitation 36

4.3.2.6.1 Isolation von Chromatin 36

4.3.2.6.2 Kontrolle der Sonifizierungseffizienz 37

4.3.2.6.3 Blockierung der Sepharose „G-*beads*“ 37

4.3.2.7 Preclearing und Immunpräzipitation 37

4.3.2.8 Waschen der Proben 38

4.3.2.9 Elution und Reversion 38

4.3.2.10 Purification 39
4.3.3 Statistische Auswertung und graphische Abbildung 39
5 Ergebnisse 40
5.1 Onkogenes Potential von EZH2 im Pankreaskarzinom 40
5.2 NFATc1 und EZH2 Co-Expression im PDAC 42
5.3 Einfluss von NFATc1 auf die Expression von *EZH2* 45
5.4 NFATc1 und EZH2 bilden einen Proteinkomplex 49
5.5 Posttranslationale Phosphorylierung von EZH2 als Voraussetzung für die Bildung des NFATc1/EZH2- Komplexes 50
6 Diskussion 55
6.1 Tumor-assoziierte Expression von EZH2 55
6.2 Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFATc1 auf die Histonmethyltransferase EZH2 57
6.3 Posttranslationale Modifikation von EZH2 58
Zusammenfassung 62
Summary 63
Literaturverzeichnis 64
Lebenslauf 77
Verzeichnis akademischer Lehrer 79
Danksagung 80
Ehrenwörtliche Erklärung 80

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADM	azinär-duktale Metaplasie
AEBP2	*AE-Binding-Protein-2*
AG	Arbeitsgruppe
AKT	Synonym für Proteinkinase B
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AR-A(014418)	GSK3-Inhibitor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CDK	*Cyclin dependent kinase*
CK-1	*Casein-Kinase-1*
cDNA	*complementary DNA*
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CRAC	*Ca2+ release activated channels*
C_T	*Cycle Threshold*
Cyclin D3	*Cyclin dependent Kinase 3*
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNZep	3-Deazaneplanocin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EED	*embryonic ectoderm development*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGTA	Ethylenglykolaminoethylester
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ER	Endoplasmatischen Retikulum
EZH2	*Enhancer of zeste homolog 2*

FAMMM	familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom
FCS	*Fetal calf serum*
FDR	*False discovery rate*
FKBP12	*12-kDa FK506-binding protein*
FK506	Tacrolimus
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
GBDPC	*global burden of disease study pancreatic cancer*
Gly	Glycin
GSEA	*Gene Set Enrichment Analysis*
GSK3ß	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H3K4trime	Trimethylierung von Lysin 4 an Histon H3
H3K27me3	Trimethylierung von Lysin 27 an Histon H3
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HIV-1	*Human immunodeficiency virus*
HRP	*Horseradish peroxidase*
IGF	Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
InsP3	Inositol-1,2,4-triphosphat
IP	Immunpräzipitation
IPMN	*intraductal papillary mucinous neoplasm*
KAT	Lysin-(K)-Acetyltransferasen
KC	*$Kras^{G12D;}$pdx1-Cre*
KNPC	*LSL-$Kras^{G12D/+;}$c.n.NFATc1;LSL-$TrpR^{172h/+;}$P48-Cre*
KPC	*LSL-$Kras^{G12D/+;}$LSL-$TrpR^{172h/+;}$PDX1-Cre*
KRAS	*Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene homologue*
LSL	*Lox-Stop-Lox*
MAP	*mitogen-activated protein*
MAPK	*mitogen-activated protein* kinase
MCN	*mucinous cystic neoplasm*
MEM	Minimum Essential Medium
MEN	multiple endokrine Neoplasie
miRNA	microRNA

mRNA	*messenger RNA*
nab-	Nanopartikel-Albumin-gebundenes-
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Non essential Amino acids
NES	Normalized Enrichment Score
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NHR	NFAT homologe Region
NKC-II	*c.n.NFATc1;Kras^{G12D};p48/PDX1-Cre*
NLS	*nuclear localisation signal*
NP-40	Nonidet P40
PanIN	*pancreatic intraepithelial neoplasia*
PBND	*PCR Buffer with Nonionic Detergents*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
Pdx1	*Pancreatic and duodenal homeobox 1*
Pen/Strept	Penicillin/Streptomycin
pGS	Phospho- Glykogensynthase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLC γ	Phospholipase C γ
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
PRC1	Polycomb-Repressor-Komplex 1
PRC2	Polycomb-Repressor-Komplex 2
pSer21EZH2	Phosphoserin21EZH2
(p)Rb	Retinoblastom Protein
RBBP4/7	Retinoblastom-Bindeproteine 4 und 7
RHR	Rel-homologe Region
RIPA-Puffer	*Radioimmunoprecipitation Assay*-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative PCR
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*small interfering RNA*
Sox9	*sex determining region Y (SRY) box 9*

SUZ12	*Supressor-of-Zeste 12*
SP	Serin-Prolin
SRR	Serin-reiche Region
STAT3	*Signal transducer and activator of transcription 3*
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit *Tween*
TE	Tris/EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
UICC	*Union for International Cancer Control*
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progressionsmodell einer normalen Pankreaszelle bishin zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms über Vorläuferstadien 4
Abbildung 2: GSEA identifiziert *EZH2* als eines der am stärksten regulierten NFATc1-Targetgene 11
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von EZH2 in 2-, sowie 5 Monate alten Mäusen des Genotyps *KPC.* 41
Abbildung 4: Nachweis der EZH2 Expression in Pankreaskarzinomzellen. 42
Abbildung 5: Nachweis der Co-Expression von NFATc1 und EZH2 in *KC- und KPC*-Mäusen. 43
Abbildung 6: *NFATc1*- und *EZH2*- mRNA-Expression in *KPC* und menschlichem PDAC nach Mikrodissektion tumorzellreicher Areale. 45
Abbildung 7: NFATc1 induziert die EZH2-Expression. 46
Abbildung 8: Einfluss des NFATc1 Knockdowns auf die EZH2 Expression. 47
Abbildung 9: Nachweis der NFATc1 Bindung an den Promotor von *Ezh2* (in *NKC-II*-Zellen*).* 48
Abbildung 10: Schematische Darstellung der EZH2-Expressionszunahme nach initialer Bindung von NFATc1 am EZH2-Promotor. 49
Abbildung 11: Physikalische Interaktion von NFATc1 und EZH2. 49
Abbildung 12: Immhunhistochemische Analyse der Expression von NFATc1 und pSer21EZH2 im PDAC 5 Monate alter *KPC*- Mäuse. 50
Abbildung 13: Co-Immunfluoreszenz von HA-NFATc1 und pSer21EZH2 in *NKC-II*-Zellen. 51
Abbildung 14: Western Blot-Analyse nach erfolgter Immunpräzipitation von pSer21EZH2 in *NKC-II*-Zellen. 52
Abbildung 15: Immunpräzipitation von EZH2 nach vorheriger Transfektion verschiedener myc-markierter EZH2-Konstrukte in *NKC-II*-Zellen. 52
Abbildung 16: Pharmakologische Hemmung der Phosphorylierung von EZH2 mittels GSK3-Inhibitor AR-A (20µM,24h). 53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Humane und murine Zelllinien 13
Tab. 2: Lyse-Puffer 14
Tab. 3: Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 15
Tab. 4: Puffer für ChIP 15
Tab. 5: Puffer für Immunhistochemie 16
Tab. 6: Puffer Ansätze für Western-Blot-Analysen 16
Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien 17
Tab. 8: Verwendete Kits 20
Tab. 9: Antikörper für die Immunhistochemische Versuche 20
Tab.10: Primär-und sekundär Antikörper für die Co-Immunfluoreszenz 21
Tab.11:Verwendete Primärantikörper für Western-Blot-Analysen 22
Tab.12:Verwendete Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen 22
Tab.13:Verwendete Antikörper ChIP 22
Tab.14:Verwendete murine Primer qPCR 23
Tab.15:Verwendete murine ChIP Primer 23
Tab.16:Verwendetes siRNA Konstrukt 23
Tab. 17: Verwendete Laborgeräte 22
Tab. 18: Verwendete Labormaterialien 25
Tab. 19: Verwendete Softwareprogramme 26
Tab. 20: Herstellung verwendeter Gele für die Gelelektrophorese 31
Tab. 21: Beispielablauf Amplifikation PCR 34
Tab. 22: Verwendete Antikörper Immunpräzipitation 36

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Prognose des duktalen Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom gilt als eines der aggressivsten Karzinome weltweit und nahm in den Cancer statistics 2023 in den USA den Platz der vierthäufigsten Krebs-Todesursache, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 %, ein (Siegel et al., 2023). Weltweit konnte eine Verdoppelung der Anzahl der durch das duktale Adenokarzinom des Pankreas (kurz: PDAC) bedingten Inzidenz- und Todesfälle zwischen den Jahren 1990 und 2017 beobachtet werden (*Collaborators GBDPC*, 2017).

In den letzten Jahrzehnten war trotz intensiver Grundlagenforschung sowie klinischer Forschung keine Verbesserung in Bezug auf die Mortalitätsrate zu beobachten. Die auffallend ungünstige Prognose des PDAC ist auf die anatomische Lage des Organs, die mangelnden Frühsymptome sowie das Fehlen spezifischer diagnostischer Marker, die aggressive Tumorbiologie, welche bei Erstdiagnose der Patienten meistens bereits lokal fortgeschrittene und metastasierte Tumorstadien aufweist und durch eine häufige Entwicklung einer Chemotherapieresistenz begleitet wird, bedingt (Spalding/Williamson, 2007). Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren gehören das Alter (PDAC wird extrem selten bei Patient-/innen unter 30 Jahren festgestellt), bei der Erstdiagnose sind mehr als 90 % der Patienten über 55 Jahre alt (Midha et al., 2016), sowie das Geschlecht, PDAC tritt bei Männern zu 30 % häufiger auf als bei Frauen. Patient-/innen mit einer positiven Familienanamnese haben ein etwa 9-fach erhöhtes Risiko, ein PDAC zu entwickeln. Es sind bisher sechs Erbkrankheiten bekannt, welche mit einem erhöhten Risiko für ein PDAC behaftet sind. Hierzu zählen das hereditäre Brust-/Ovarialkarzinom, das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (kurz: HNPCC), das multiple endokrine Neoplasie (kurz: MEN)-1-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis, das Peutz-Jeghers-Syndrom und das familiäre atypische multiple Muttermal-und Melanom (kurz: FAMMM)-Syndrom (Klein, 2021). Zu den modifizierbaren Risikofaktoren zählt chronischer Alkoholabusus, welcher an der Entstehung einer chronischen Pankreatitis beteiligt ist, welche ebenfalls als führender Risikofaktor mit einem über 20-mal höheren Risiko zur Entwicklung eines PDAC gilt (A. B. Lowenfels et al., 1993). Raucher zeigten ein 6-fach höheres Risiko für die Entwicklung eines PDAC im Vergleich zu Nichtrauchern (Treviño et al., 2012).

Eine Diabeteserkrankung kann einerseits als Risikofaktor sowie andererseits als Manifestation der Erkrankung gelten. Bei Patient-/innen, die bereits seit längerem an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt sind, konnte ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines PDAC nachgewiesen werden (J. Everhart et al., 1995, R. Huxley et. al, 2005). Des Weiteren werden Adipositas und ein erhöhter Body-Mass-Index mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Eine von 2008 bis 2015 an 110 Patient-/innen durchgeführte Studie konnte einen direkten Zusammenhang zwischen subcutanem und intraviszeralem Fettgewebe, präkanzerösen Vorläuferläsionen des Pankreas sowie einem hohen BMI nachweisen (V. Rebours et al., 2015).

Bei der Mehrheit der Patienten liegt bei Diagnosestellung leider bereits eine palliative Situation (UICC - Union for International Cancer Control, Stadium IV) mit entsprechend reduziertem Allgemeinzustand und somit weiterer Limitierung in Bezug auf aggressive Behandlungsoptionen vor (Partensky, 2013). In wenigen Fällen kann eine kurative Behandlung, die Resektion des Tumorgewebes (mit dem Ziel einer R-0 Resektion) erfolgen. Die Resektion in Kombination mit adjuvanter Therapie innerhalb von 6 Wochen postoperativ konnte eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate auf circa 20 % erzielen (Spalding/Williamson, 2007). Hierbei kann je nach Allgemeinzustand des Patienten Gemcitabin Monotherapie (oder in Kombination mit Capecitabin), das modifizierte „FOLFIRINOX“-Schema, welches sich aus Folinsäure (Leucovorin), Irinotecan und Oxaliplatin zusammensetzt und ohne die Bolusgabe von 5-Fluorouracil erfolgt, aber auch 5-Fluorouracil mit Folinsäuregabe, über eine Dauer von 6 Monaten angewendet werden.

Eine Anwendung der genannten Therapieoptionen kann neoadjuvant bei Patienten mit grenzwertig resektablen („Borderline“) Tumoren im Rahmen von Studien in Erwägung gezogen werden (onkopedia guidelines Stand 2018).
Als palliative Therapieoption galt zuvor die Gabe von Gemcitabin als Monotherapie zur Behandlung des PDAC als das Mittel der Wahl, sollte jedoch heutzutage nur noch bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand verwendet werden, da eine Kombinationstherapie mit nab (an Albumin-Nanopartikel gebundenes) – Paclitaxel oder aber die Verwendung anhand des „FOLFIRINOX-Schema“ eine längere Überlebensdauer und gesteigerte Remissionsrate erzielte (onkopedia guidelines, Stand 2018). Darauffolgende Studien ergaben in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit der behandelten Patienten ein besseres Outcome durch eine Kombinationstherapie nach dem „FOLFIRINOX-Schema“ (Seufferlein et al., 2012). Eine signifikant längere mittlere Überlebenszeit konnte durch die zusätzliche Anwendung von „Erlotinib“, eines EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors, zur Gabe von Gemcitabin in seiner Zulassungsstudie gezeigt, jedoch in Folgestudien nicht bestätigt werden (onkopedia guidelines 2018).

Der derzeitige Therapieerfolg bei soliden Tumoren mittels der Verwendung von Antikörpern, wie beispielsweise „Ipilimumab“ als Agonist von Anti-Cytotoxic T-Lymphozyte Associated Antigen 4 beim malignen Melanom, zeigte leider nur unzureichende Wirkung beim PDAC (Torphy et al., 2020).

Aufgrund seiner relativ geringen Inzidenz ist ein generelles Screening der Allgemeinbevölkerung bezüglich eines PDAC nicht hilfreich, weshalb es mehr als von Nöten ist, weitere mögliche Risikofaktoren, genetische Veränderungen und Regulationsmechanismen für die Entstehung des PDAC festzustellen, um sinnvolle Präventionsmaßnahmen zu entwickeln und um neue Therapieansätze zu erforschen (Zhang Q. et al., 2016).

1.1.2 Histologische und molekulargenetische Eigenschaften des Pankreaskarzinoms

Die meisten Pankreastumore sind exokrine Tumore, hierzu gehören unter anderem das duktale Adenokarzinom, das Azinuszellkarzinom und die muzinös-zystische Neoplasie. Am häufigsten wird das duktale Adenokarzinom mit über 90 % aller Pankreastumore festgestellt (Spalding/Williamson, 2007). Dies ist von mäßig bis schlecht differenzierten Drüsenstrukturen gekennzeichnet und entwickelt sich über mehrere Vorläuferstadien hinweg (Zhang Q. et al., 2016). Das duktale Adenokarzinom des Pankreas kann aus drei verschiedenen Vorläuferläsionen hervorgehen. Hierzu gehören die *pancreatic intraepithelial neoplasia* (kurz: PanINs), das *intraductal papillary mucinous neoplasm* (kurz: IPMN) und das *mucinous cystic neoplasm* (kurz: MCN) (Hruban et al., 2004).

Vor der Ausbildung von PanINs, kommt es aufgrund unterschiedlicher Reize wie beispielsweise Entzündungen oder Verletzungen zur Transdifferenzierung der Azinuszellen zu duktal-ähnlichen Zellen. Dieser Prozess wird als „azinär-duktale Metaplasie“ (kurz: ADM) bezeichnet (Wang et al. 2018). Laut Hruban et al. konnten die sog. PanINs bei weitem am häufigsten in menschlichen Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden. Die PanIN-Läsionen entwickeln sich aus Pankreasgängen, sind unter 5 mm groß und werden anhand ihrer Morphologie in drei Formen mit jeweils ansteigendem Maße an histologischen Auffälligkeiten des Epithels untergliedert (Hruban et al., 2007). Anhand des Mangels an nukleären Atypien kann man die flachen PanIN-1-Läsionen (1A) und die papillären (1B) PanIN-1-Läsionen identifizieren. Wohingegen bei PanIN-2-Läsionen eine mikropapilläre Architektur auffällt, zudem sind hier bereits nukleäre Atypien detektierbar. Den größten Grad an Dysplasien weisen sog. PanIN-3-Läsionen (auch *Carcinoma in situ* genannt) auf.

Diese Läsionen zeigen einen Polaritätsverlust, eine erhöhte Mitoserate sowie ebenfalls nukleäre Atypien (Hruban et al., 2008; Koorstra et al., 2008). Brune et al. und Detlefsen et al. berichteten, dass PanIN-Läsionen mit lobuzentrischen Atrophien assoziiert sind, welche den Abfluss des Azinussekrets behindern und somit eine lokale chronische Pankreatitis induzieren können. Hierdurch kann ein Circulus vitiosus entstehen, indem eine frühe PanIN-Läsion durch lokale Duktusobstruktion mit resultierender lokaler Entzündung und epithelialer Verletzung das Voranschreiten der PanIN-Läsionen begünstigt.

Hruban et al. legen bei einem vermehrten Nachweis von PanIN-Läsionen eine korrelierende Zunahme von Mutationen dar. Meist ist früh eine aktivierende Punktmutation im Bereich des *KRAS*-Gens (*Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene homologue*-Gen) während der Karzinogenese zu detektieren. *KRAS* gehört zur Familie der *Ras*-Gene und gilt aufgrund seiner deutlich erhöhten Mutationsrate als das meist mutierte Protoonkogen des Pankreaskarzinoms (Ottenhof et al., 2011). *KRAS* wird mittels Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF aktiviert und liegt nach darauffolgender GTP-Bindung im aktiven Zustand vor. Mittels *„gain-of-function“*-Mutation kommt es zur Beeinträchtigung der intrinsischen GTP-ase Aktivität des Proteins, welche normalerweise durch GTP-Abbau KRAS in den inaktiven Zustand versetzt. Bei weiterhin bestehendem aktiven Zustand erfolgt eine Aktivierung der „downstream“-RAF-MAP2K-MAPK-PI3K-AKT-Kaskade. Hierdurch wird die Zellprogression und Zellmotilität gefördert (Schneider et al., 2003).

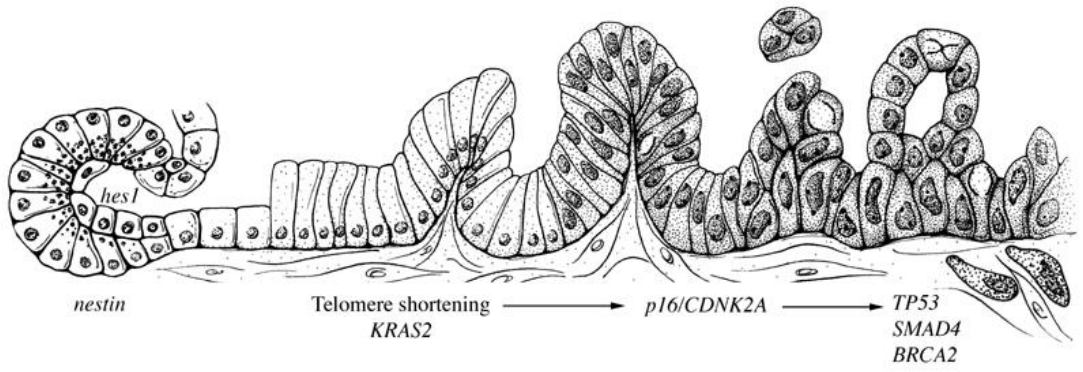


Abbildung 1: Progressionsmodell der histologischen und genetischen Veränderungen von einer normalen Pankreaszelle (links) bis hin zur Entstehung eines invasiv duktalem Pankreaskarzinoms (rechts) über Vorläuferstadien (PanIN Läsionen) (Hruban et al., 2007).

Bei Zunahme des Grades an PanIN-Läsionen konnte gleichzeitig eine Zunahme methylierter Gene festgestellt werden. Beispielsweise zeigte sich bei dem *p16/CDKNA2A*-Gen in einem Großteil der invasiven Pankreaskarzinome eine zum Teil durch Promotor-Hypermethylierung bedingte, genetische Inaktivierung (Fukushima et al., 2002; Matsubayashi et al., 2005).

Zusammenfassend fällt bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen sowie eine Aktivierung von Onkogenen auf, welche anhand von genetischen, als auch epigenetischen Mechanismen reguliert wird. Auf die epigenetischen Mechanismen soll im Folgenden weiter eingegangen werden.

1.2 Die Histonmethyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)

1.2.1 Histon- Modifizierungen

Eine „epigenetische“ Kontrolle der Transkription kann mittels kovalenter Histonmodifikation, DNA-Methylierung und durch ATP-abhängige Chromatin-Remodellierung bedingter Veränderungen erfolgen. Innerhalb der Zellen liegt die DNA als Chromatin, welches aus Nukleosomen als Grundbausteinen besteht, verpackt vor (Nakagawa/Kitabayashi, 2018). Histone sind zentraler Bestandteil der nukleosomalen Untereinheit und bilden ein Oktamer, welches die 4 Kernhistonproteine (H3, H4, H2A, H2B) beinhaltet. Jedes Histonprotein besitzt einen N-terminalen Bereich. Diese Bereiche können durch verschiedenste chemische Veränderungen, wie beispielsweise Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, zur Regulation der Expression eines Zielgens beitragen (Nakagawa/Kitabayashi, 2018). Dies gelingt durch kovalente posttranslationale Modifikationen, welche die Ladungsdichte zwischen Histonen und der DNA verändern und hierdurch die Organisation des Chromatins und weiteren Transkriptionsprozesse beeinflussen können (Audia/Campbell, 2016).

In dieser Arbeit soll auf epigenetische Veränderungen mittels Methylierung der DNA eingegangen werden. Die DNA-Methylierung konnte als erste epigenetische Veränderung, welche die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens bedingt, identifiziert werden (Feinberg et.al, 1983). In nicht mutierten Zellen dient die DNA-Methylierung zur Regulation der Genexpression mittels sog. DNMTs (DNA-Methyltransferasen), durch welche die Methylierung der DNA katalysiert wird. Bei der Histon-Methylierung kommt es zu Anlagerung von Methylgruppen an Lysin-/Arginin-Reste von Histonen (Hyun et al., 2017). Im Vergleich zur Acetylierung, welche grundsätzlich mit einer Aktivierung von Genen verbunden ist, kann die Methylierung in Abhängigkeit der Anzahl der

vorhandenen Methylgruppen (Mono-, Di- oder Trimethylierung) sowohl die Genexpression als auch die Repression von Genen induzieren (Dambacher et al., 2010). Es kann bspw. mittels Trimethylierung von Lysin 4 an Histon H3 (kurz: H3K4me3) die Expression von Genen induziert werden, wohingegen durch Trimethylierung von Lysin 27 an Histon H3 (kurz: H3K27me3) im Zusammenhang mit dem Polycomb-Repressor-Komplex-2 (kurz: PRC2, ein Proteinkomplex, auf welchen im Folgenden unter 1.2.2. detailliert eingegangen werden soll), die Repression von Genen gefördert werden kann (Schuettengruber et al., 2007).

1.2.2 PRC2-Familie

Die Komplexe der Polycomb-Gruppe konnten ursprünglich bei der Taufliege „Drosophila melanogaster“ als wichtige Regulatoren bei der Entwicklung der Fliegen identifiziert werden, bei welcher sie die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie z.Bsp. das Homeobox-(Hox)- Gen, regulieren (Laugesen et al., 2016). Sie sind in der Lage, die Genexpression passager oder auch dauerhaft durch Modulation der Chromatinstruktur zu aktivieren oder zu reprimieren, was vor allem während der Entwicklung eines Organismus während der mitotischen Zyklen eine entscheidende Rolle spielt (Laugesen et al., 2016). Die Polycombproteine sind demnach bei der Genregulation von der gesamten Entwicklung beginnend bei der Embryogenese bis hin zum Erwachsenenalter von essentieller Bedeutung (Golbabapour et al., 2011, 2013).

Die Polycomb-Gruppe wird untergliedert in den PRC-(Polycomb-repressor-complex-)1- und den PRC2-Komplex, bestehend aus mehreren Proteinkomplexen. Durch die Interaktion beider Komplexe mittels spezifischer Histonmodifikationen, beispielsweise durch Methylierung und somit Markierung von H3K27me3 über den PRC2-Komplex, kann diese Veränderung durch den PRC1-Komplex erkannt werden und zur weiteren Kondensation des Chromatins und damit zur Repression der Transkription führen (Golbabapour et al., 2011, 2013). Der PRC2-Komplex setzt sich aus vier Kernproteinen zusammen. Hierzu zählt die Histonmethyltransferase EZH2, das Protein EED (Kurzform von „embryonic ectoderm development“), der Supressor-of-Zeste 12 (kurz: SUZ12) sowie die Retinoblastom-Bindeproteine 4 und 7 (kurz: RBBP4/7). Des Weiteren beinhaltet der PRC2-Komplex noch weitere akzessorische Proteine, wie beispielsweise AEBP2 (AE-Binding-Protein-2) (Aranda et al., 2015). EZH2 ist die SET-Domäne enthaltende, katalytische Untereinheit des Komplexes und für die Trimethylierung von H3K27 verantwortlich (Müller et al., 2002). Deletionen und „loss-of-function“-Mutationen der PRC2-Komplexkernproteine konnten bereits in diversen Tumoren nachgewiesen werden (Moritz et al., 2017).

1.2.3 Funktion und Regulation von EZH2 in verschiedenen Tumoren

Bisherige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass EZH2 den Progress der Karzinogenese überwiegend begünstigt. Dies zeigte sich durch den Nachweis einer Überexpression von EZH2 in verschiedenen Krebsarten wie Prostata-, Brust-, Blasen-, Magen-, Leber-, Lungen- und Bauchspeicheldrüsenkrebs (Chen et al., 2010; Matsukawa et al., 2006).

Der Nachweis einer erhöhten EZH2 Expression ging in Brustkrebs und Prostatakarzinomen mit Metastasierung und somit mit einer ungünstigen Prognose einher (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). Eine erhöhte EZH2 Expression kann auch durch verschiedene Transkriptionswege verursacht werden. Beim Mammakarzinom konnte über die Bindung von phosphoryliertem ETS Like-1 (kurz: ELK1) an der Bindungsstelle des *EZH2*-Promotor eine Aktivierung der *EZH2*-Transkription nachgewiesen werden (Fujii et al., 2011). Ein weiterer Transkriptionsweg, welcher an der EZH2-Regulation beteiligt ist, ist der Retinoblastom-Protein (kurz: pRb) -/E2F-Signalweg. Der pRb/E2F-Komplex wird mittels Phosphorylierung von pRb getrennt, um somit anschließend an die Bindungsstelle auf dem *EZH2*-Promotor anzudocken und die Transkription von *EZH2* zu fördern (Bracken et al., 2003).

Binnen der letzten Jahre wurden bereits erste EZH2-Inhibitoren bekannt, beispielsweise S-Adenosyl-L-Methionin (kurz: SAM) - kompetitiver EZH2-Inhibitor wie z. Bsp. EPZ6438 (Tazemetostat). Tazemetostat gilt als erster zielgerichteter Regulator, welcher im Vergleich zu anderen Methyltransferasen eine 1000-mal höhere Selektivität für EZH2 aufweist und die EZH2-Aktivität antagonisieren kann (McGrath et al., 2015). Aktuell erfolgt die Durchführung klinischer Studien bezüglich möglicher Kombinationstherapie von EZH2-Inhibitoren mit anderen Therapien, wie beispielsweise Chemo-und Immuntherapie (Duan et al., 2020; Kang et al., 2020).

Des Weiteren „3-Deazaneplanocin“, (kurz: DNZep), ein S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH)- Hydrolasehemmer, welcher anfänglich als Anti-HIV1-Wirkstoff entwickelt wurde (Li et al., 2019). Dieser zeigte gerade bei Prostata- sowie Brustkrebsformen eine vielversprechende Wirkung, indem er die EZH2- und H3K27me3-Spiegel senkte und dessen Funktion im Rahmen des PRC2-Komplexes wiederherstellte, erhielt allerdings aufgrund seines Nebenwirkungsprofils keine Zulassung (Tan et al., 2007; Gaudichon et al. 2014).

1.2.4 Die Bedeutung von EZH2 im Pankreaskarzinom

In vorherigen Arbeiten der AG Ellenrieder konnte gezeigt werden, dass die Histonmethyltransferase EZH2 im Stadium der akuten Pankreatitis im Rahmen seiner bereits bekannten Rolle als Mitglied des PRC2-Komplexes tumorrepressiv agiert. Um die schädigenden Eigenschaften von NFATc1 („*Nuclear factor of activated t-cells 1“*, auf welchen im Kapitel 1.3 noch detaillierter eingegangen werden soll) zu beeinflussen, erfolgt dessen Hemmung mittels Bindung an den Transkriptionsstartpunkt des *NFATc1*-Gens. Dies ermöglicht anschließend eine Regeneration des Organs und eine Redifferenzierung von Azinuszellen (Singh et al., 2015).

Ebenso ist die EZH2 Expression therapeutisch relevant was sich anhand von Studien bei mittels Gemcitabin behandelter Patienten mit niedriger EZH2-Expression zeigte, bei welchen eine signifikant längere Überlebenszeit nachgewiesen werden konnte (Toll et al., 2010). Interessanterweise gelang es Ougolkov und Kollegen, eine nukleäre Überexpression von EZH2 in fast 70% der Adenokarzinome des Pankreas mittels Immunhistochemie nachzuweisen. In schlecht differenzierten Adenokarzinomen zeigte sich eine nukleäre Akkumulation von EZH2, was wiederum für die tumorfördernden Eigenschaften von EZH2 spricht. Die Inhibition der Histonmethyltransferase EZH2 diente dazu den Beginn von Apoptose zu induzieren und gleichzeitig die Sensibilität gegenüber der Behandlung mit Gemcitabin zu erhöhen (Ougolkov et al., 2008).

Therapeutisch konnte der bereits unter 1.2.3 genannte EZH2-Inhibitor Tazemetostat, im Rahmen einer Phase 1 Studie bei soliden Tumoren (das PDAC einschließend für ein sehr kleines Patientenkollektiv) eingesetzt werden. Aufgrund der starken Kontextabhängigkeit der EZH2 Funktionen (Hessmann et al. 2017) ist aber davon auszugehen, dass ein tiefer greifendes Verständnis der molekularen Abhängigkeiten sowie der Funktion von EZH2 in der Tumorprogression erlangt werden muss, um die EZH2 Inhibition zielgerichtet in der Therapie des PDAC einsetzen zu können.

1.3 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFATc1)

1.3.1 Die Struktur von NFATc1

Erstmalig wurde der „*Nuclear Factor of activated T-cells“* im Jahre 1988 von Shaw et al. genannt, welche NFAT als Regulator von T- Zellen durch Bindung an deren Promotor identifizierten. Es sind fünf Transkriptionsfaktoren bekannt, welche zur NFAT- Familie zählen, mit Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie (NF-B) vergesellschaftet und im menschlichen Genom auf dem Chromosom 20q13.2-q13.3 lokalisiert sind (Graef et al., 2001). Die NFAT–homologe Region (kurz: NHR) befindet sich am N-terminalen Ende

und dient als regulatorische Domäne. Diese beinhaltet 18 der insgesamt 20 Phosphorylierungsstellen der NFAT-Transkriptionsfaktoren (Okamura et al., 2000). Des Weiteren beinhaltet sie die Transaktivierungsdomäne (kurz: TAD), welche durch Bindung von Promotorelementen die Gentranskription induziert, sowie zwei Calcineurin-Bindungsstellen und eine Kernlokalisierungssequenz („nuclear localisation signal“,kurz: NLS) (Hogan et al., 2003; Crabtree/Schreiber, 2009; Liu et al., 1999).

C- terminal-gelegen befindet sich die DNA-Bindungsdomäne, welche aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zur verwandten REL/NF-Kb-Familie als Rel-homologe-Region (kurz: RHR) bezeichnet wird. Am c- terminalen Ende befindet sich die carboxy-terminale Domäne (Mancini/Toker, 2009).

1.3.2 Der Calcium-/Calcineurin-/NFAT-Signalweg

Die NFAT-Familie wird mittels des Ca^{2+}/Calcineurin-Signalwegs reguliert (Loh et al., 1996). NFAT liegt in phosphorylierter Form im Zytoplasma im inaktiven Zustand vor und kann durch die Serin-/ Threonin–Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und somit aktiviert werden (Luo et al., 1996). Mittels Phospholipasen C- Aktivierung kommt es zur Freisetzung von Phosphatidylinositol-4,5- Bisphosphonat Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-Trisphosphonat (kurz: $InsP_3$) über Hydrolysierung, dies wird über eine Ligandenbindung an der Zelloberfläche induziert. Hierdurch erfolgt eine passagere Ca^{2+}-Freisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern. Um für die Iniitierung der Ca^{2+}/Calmodulin- abhängigen Phosphatase Calcineurin die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration aufrecht zu erhalten, erfolgt durch sog. „*Ca^{2+} release activated channels“* (kurz: CRAC)-Kanäle der Einstrom von extrazellulär befindlichem Calcium (König et al., 2010b). Nach Bindung von Calcium an der regulatorischen Untereinheit B des Calcineurins wird eine Calmodulin- Bindungsstelle an der katalytischen Untereinheit A des Calcineurins freigesetzt. Hierdurch kommt es zur Freisetzung einer autoinhibitorischen Sequenz in der katalytischen Tasche der Phosphatase (Mancini/Toker, 2009). Das nun in aktivierter Form vorliegende Calcineurin dephosphoryliert die SP-(Serin-Prolin)-Region der NHR–Domäne des im Zytoplasma befindlichem NFAT und setzt dessen nukleäre Lokalisationssequenz frei. Anschließend kann NFAT durch Translokation in den Zellkern gelangen, um dort als Transkriptionsfaktor zu agieren (Mancini /Toker, 2009; Ellenrieder et al., 2007). NFAT kann die Transkription diverser Gene einleiten und aufrechterhalten, des Weiteren interagiert NFAT mit unterschiedlichen Partnern (wie beispielsweise anderen Transkriptionsfaktoren) um an Promotoren oder Enhancern die Transkription zu regulieren (König et al., 2010a; Choo et al., 2009). Die Interaktion von NFAT und seinen Partnerproteinen sorgt für eine verstärkte Bindungsaffinität an der DNA und nimmt

Einfluss auf die Spezifität der NFAT- Promotorbindung sowie auf die Gentranskription (König et al., 2010b). Die Aktivität von NFAT kann mittels diverser Phosphatasen und Kinasen reguliert werden.

Die Hemmung der endogenen NFAT-Aktivität kann durch Exportkinasen wie z.B. der Serin-/Threoninkinase GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3) sowie Erhaltungskinasen wie z.B. der CK-1 (Casein-Kinase-1), welche durch Phosphorylierung der SP- und SRR-Regionen der NHR Domäne für einen Export von NFAT ins Zytosol sorgen, erfolgen (Beals et al., 1997). Ebenso ist eine medikamentöse Hemmung der NFAT-Aktivität mittels Cyclosporin A (kurz: CsA) und dem Immunmodulator Tacrolimus möglich. Diese bilden Komplexe mit Cyclophyllin A bzw. FKPB12 („12-kDa FK506-binding protein"), welche Calcineurin binden und somit für eine Hemmung dessen Phosphatase Aktivität sorgen (Mancini/Toker 2009; Liu et al., 1991).

1.3.3 Die Bedeutung von NFATc1 im Pankreaskarzinom

Die bisherigen Forschungsergebnisse ergaben, dass NFAT ubiquitär exprimiert wird und an diversen Differenzierungsprozessen verschiedenster Gewebe wie beispielsweise von Inselzellen des Pankreas, Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen beteiligt ist (Mancini/Toker, 2009; Chang et al., 2004; Molkentin et al., 1998). Eine konstitutive Aktivierung sowie vermehrte Expression von NFAT konnte sowohl in epithelialen als auch nicht epithelialen Tumoren nachgewiesen werden (Mancini/Toker, 2009; Duque et al., 2005; Chen et al., 2011; Macian, 2005; Sitara/Aliprantis, 2010).

Buchholz et al. stellten in 16 von 23 humanen Pankreaskarzinomgewebsproben die Expression von dephosphoryliertem, somit im aktiven Zustand und im Zellkern befindlichen NFATc1 fest (Buchholz et al., 2006). Die Zunahme der Karzinogenese des Pankreas mittels pankreasspezifischer konstitutiver Aktivierung von NFATc1 konnte bereits in vorherigen Arbeiten der AG von Professor Ellenrieder in unterschiedlichen transgenen Mauslinien nachgewiesen werden**.** Es zeigte sich, dass ein endogener Verlust des Tumorsupressorgens „*p53*" im Mausmodell zu einem aggressiveren Phänotyp führte. Dieses Modell enthält eine konstitutive Aktivierung von NFATc1, sowie die $Kras^{G12D}$- Mutation (Singh et al.,2015). Das transgene Mausmodell mit dem Genotyp *NKC (c.n.NFATc1;*$Kras^{G12D}$*;P48/PDX1-Cre)* wies zudem eine starke Zunahme des EZH2-Expressionslevels auf (Baumgart et al., 2014). Der Transkriptionsfaktor NFATc1 führt in Kombination mit $Kras^{G12D}$ mit einer Penetranz von fast 100% zu der Entwicklung eines PDAC (Baumgart et al., 2014).

Das *NKC-II*-Modell erwies sich als vergleichbar mit humanem Pankreaskarzinomgewebe und zeigte gleichermaßen eine häufige Entstehung von Aszites, eine Gallenstauung und hepatisches Metastasierungsmuster (Baumgart et al., 2014). In dieser Arbeit wurden die aus den Pankreata der transgenen Mäuse extrahierten Zellen für Versuche verwendet.

Baumgart et al. verwendeten Primärtumorzellen der Pankreata aus *NKC-II*-Mäusen und unterzogen diese einer Microarray und einer gene-set-enrichment-analysis (kurz: GSEA), jeweils in Anwesenheit oder Abwesenheit von NFATc1.

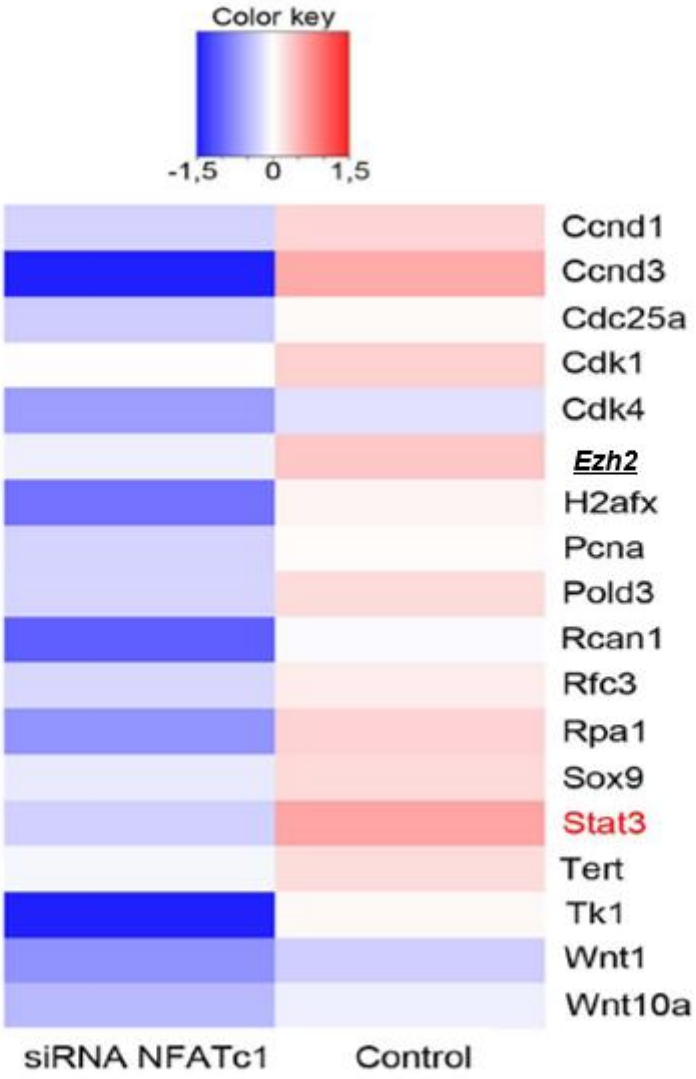


Abbildung 2: GSEA identifiziert *Ezh2* als eines der am stärksten regulierten NFATc1-Targetgene (Baumgart et al.,2014).

Hierbei konnte die unter 1.2. genauer charakterisierte Histonmethyltransferase *EZH2* als eines der stärksten regulierten NFATc1-Targetgene identifiziert werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Entstehung des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas ist multifaktoriell und wird sowohl von genetischen Veränderungen wie der konstitutiven Aktivierung des Protonkogens *KRAS* als auch von epigenetischen Ereignissen begleitet. In vorangegangenen Arbeiten der AG Ellenrieder konnte bereits gezeigt werden, dass NFATc1 die Entstehung und Progression des PDAC durch die Regulation pro-tumorgener Gensignaturen fördert. Genweite Expressionsanalysen zeigten, dass die Transkription der Histonmethyltransferase *EZH2* durch NFATc1 aktiviert wird. Basierend auf dieser Beobachtung postulierten wir, dass die tumorprogressionsfördernden Wirkungen von NFATc1 zumindest teilweise von der Aktivität des NFATc1 Zielgens *EZH2* abhängen. Basierend auf dieser Hypothese sollte in dieser Arbeit die Interaktion des Transkriptionsfaktors NFATc1 und der Histonmethyltransferase EZH2 erforscht werden.

In dieser Arbeit sollte folgenden zentralen Fragestellungen nachgegangen werden:

1. Wie verhält sich die EZH2 Expression in der Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms?
2. Welchen Einfluss nimmt NFATc1 auf die EZH2 Expression?
3. Besteht eine biochemische Interaktion von NFATc1 und EZH2?
4. Welche weiteren Faktoren müssen für die Interaktion von NFATc1 und EZH2 gegeben sein?

3 Materialien

3.1 Humane und Murine Zelllinien

Tab.1: Humane und murine Zelllinien

Name	Abstammung	Herkunft	Medium
Humane Zelllinien			
Panc-1	Humane Pankreas-karzinomzellinie	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strept
L3.6	Humane Pankreas-karzinomzellinie	AG Daniel Billadeau, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota	MEM + 10 % FCS + 1 % NaPyruvat + 1 % NEAA + 1 % Glutamin
PaTu8988t	Humane Pankreas-karzinomzellinie	H. P. Elsässer, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland	DMEM + 10% FCS +0,5% Gentamycin
Murine Zelllinien			
LSL-Kras$^{G12D/+;}$LSL-Trp$^{R172h/+;}$PDX1-Cre *(kurz: KPC*)	Murines Pankreas-karzinom	AG Ellenrieder, Gastroenterologie, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10%FCS +1%NEAA + 1% Pen/Strept
LSL-Kras$^{G12D/+;}$c.n.NFATc1;LSL-TrpR$^{172h/+;}$P48-Cre (kurz: *KNPC*)	Murines Pankreas-karzinom	AG Ellenrieder, Gastroenterologie, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10%FCS +1%NEAA + 1% Pen/Strept
c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre *(kurz: NKC-II*)	Murines Pankreas-karzinom	AG Ellenrieder, Gastroenterologie, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10%FCS +1%NEAA + 1% Pen/Strept

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien stammen aus humanen und murinen Zellen und sind mit ihren Eigenschaften, ihren Kulturmedien und ihrer Herkunft in Tabelle 1 aufgeführt.

Neben den oben beschriebenen Zelllinien wurden in dieser Arbeit Expressionsanalysen in primären Azinuszellen durchgeführt und deren Proteinisolate/RNA verwendet. Die Isolation und Kultivierung der Zellen (Chen et al. 2017) wurde durch Mitarbeiter der AG Ellenrieder durchgeführt.Es wurden primäre Azinuszellen aus den folgenden transgenen Mauslinien verwendet:

Kras$^{G12D;}$pdx1-Cre (kurz: KC): Azinuszellen, welche aus dem Pankreas von *LSLKras^{G12D};pdx1Cre*-Mäusen isoliert wurden (Hingorani et al., 2003). Die Isolation und Kultivierung der Zellen (Chen et al. 2017) wurde nicht selbst durchgeführt.

Des Weiteren Azinuszellen aus *Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl;}$pdx1-Cre*- (NFATc1-Knockout) Mäusen. Diese Mäuse weisen zusätzlich zur konditionalen Aktivierung von *Kras* einen pankreasspezifischen *Nfatc1* Knockout auf. *NFATc1$^{fl/fl}$*-Mäuse wurden ursprünglich von Aliprantis et al. 2008 beschrieben.

Medium (zur Kryokonservierung):

Zusammensetzung: 47,5 ml FCS + 2,5 ml DMSO.

3.2 Lösungen und Puffer

Verwendete Lösungen und Puffer für Proteinexpressionsanalysen.

Tab. 2: Lyse-Puffer

Bradford Protein	
50 ml	Bio Rad Protein Assay
200 ml	destilliertes Wasser
Lysepuffer für Gesamtzelllysat	
50 mM	HEPES
150 mM	NaCl
1mM	EGTA
100 mM	Natriumfluorid
10 mM	Natriumpyrophosphat H20
0,04 %	25 x Complete (kurz vor Verwendung hinzugeben)
5 x Laemmli	
225 mM	Tris-HCl
50%	Glycerin
20%	SDS
10 mM	DTT
0,02 %	Bromphenolblau
5%	β-Mercaptoethanol

Tab. 3: Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS Trenngelpuffer
1,5 M Tris Base 0,4 % SDS H2O ----→ pH: 8,8
SDS- Sammelgelpuffer
0,5 M Tris Base 0,4 % SDS H2O ----→ pH: 8,8
Laufpuffer (10x)
288 g Glycin 60,6 g Tris SDS

Tab. 4: Puffer für ChIP

Lysepuffer I	
5 mM	PIPES (pH 8,0)
85 mM	Kaliumchlorid
0,5 %	NP-40
0,04 % 25 x Complete (kurz vor Verwendung hinzugeben)	
RIPA Puffer	
50 Mm	Tris (pH 7,4)
150 mM	NaCl
10 nM	EDTA
10 nM	EGTA (pH 7,2)
1%	Triton-X-100
1%	Natriumdesoxycholat
0,1 %	SDS
	H2O
0,04 % 25 x Complete (kurz vor Verwendung hinzugeben)	
Waschpuffer I	
20 mM	Tris (pH 8,1)
150 mM	NaCl
2mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton-X-100

Waschpuffer II	
20 mM	Tris (pH 8,1)
500 mM	NaCl
2mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton-X-100
Waschpuffer III	
10 mM	Tris (pH 8,1)
250 mM	Lithiumchlorid
1 mM	EDTA
1%	SDS
1%	NP-40

Tab. 5: Puffer für Immunhistochemie

PBS- Puffer	
214 ml	Kaliumhydrogenphosphatlösung
536 ml	Natriumhydrogenphosphatlösung
45 g	NaCl
	---→pH: 7,4
TE- Puffer	
20 mM	Tris (pH 8,0)
1 mM	EDTA
DAB-Lösung	
200 mg	DAB
200 ml	TBS
100 µl	H2O2

Tab.6: Puffer Ansätze für Western-Blot-Analysen

10 x Blottingpuffer	
0,25 M Tris	
1,92 M Glycin	
1x Blottingpuffer	
100 ml	Trans-Blot-Puffer
200 ml	Methanol
700 ml	H20
10 x TBS	
100 ml	TBS
900 ml	H2O
1 ml	Tween 20

Blockingpuffer	
4g	Milchpulver
200 ml	1 x TBST
1 ml	Tween 20

3.3 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Name	**Firma**
Agarose	Carl Roth GmbH
APS	Merck
Aqua ad iniectabilia	Braun
AR-A014418	Sigma-Aldrich®
Bromphenolblau	SIGMA
BSA (10mg/ml)	Sigma-Aldrich®
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Chloroform	Merck
Colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega
Cyclosporin A	SIGMA
DAB	Carl Roth GmbH
DMEM	Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich®
DNase I	New England Biolabs
dNTPs	Sigma-Aldrich®
DTT	Serva Electrophoresis
Dulbecco’s PBS	GE Healthcare
EDTA	Carl Roth GmbH
EGF	Sigma-Aldrich®
EGTA	Sigma-Aldrich®
Eosin	Sigma-Aldrich®
Ethanol	Sigma-Aldrich®
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
FCS	PAA Laboratories GmbH

Name	Firma
Formaldehyd	Sigma-Aldrich®
GeneRulerTM 1kB DNA Ladder	Fermentas GmbH
Glutamin	Gibco
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
GoTaq DNA-Polymerase	Promega
HBSS	Gibco
HEPES	Carl Roth GmbH
H_2O_2	Carl Roth GmbH
Hämatoxylin solution	SIGMA
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Merck
Lipofectamin	Invitrogen
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich®
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	SIGMA
MEM	Gibco
Methanol	Sigma-Aldrich®
Midori Green	Nippon Genetics
Milchpulver	Carl Roth GmbH
MultiscribeTM RT Enzyme	Life Technologies
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
NaCl isotonische Lösung	Diaco
Natriumcitrat	Merck
Natriumflourid	Sigma-Aldrich®
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich®
Natriumpyrophosphat	SIGMA
Natriumpyruvat	Carl Roth GmbH
Non essential Amino acids	PAA Laboratories GmbH
NP-40	Sigma-Aldrich®
Pen/Strept	SIGMA
PageRulerTM Proteinmarker	Fermentas GmbH

Name	Firma
PIPES	SIGMA
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich®
Protein A Agarose	Millipore
Protein G Agarose	Millipore
Proteinase K	Proteinase K
Protein Assay	BIO RAD
Qiazol Lysis Reagent	QIAGEN
RNase A	Sigma-Aldrich®
Salmon sperm	Invitrogen
Salzsäure	Thermo Fisher chemical
siLentFect™	BioRad
SDS	Carl Roth GmbH
RNase-Inhibitor	Applied Biosystems
SYBR GREEN	Applied Biosystems
TaqMan®Universal Master Mix II	Life Technologies
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris Base	ACROS Organic
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Carl Roth GmbH
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich®
Tween ®20	Sigma-Aldrich®
Western Lightning™ Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Ultra ECL Oxidizing Reagent Plus	Perkin Elmer
Western Lightning™ Ultra ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	Perkin Elmer
Xylol	Sigma-Aldrich®

3.4 Kits

Tab. 8: Verwendete Kits

Name	Firma
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit	Roche
DNeasy Blood&Tissue Kit	Qiagen
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
Omniscript®RT Kit	Qiagen
peqGOLD Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories

3.5 Antikörper

3.5.1 Antikörper für Immunologische Versuche

Tab.9: Antikörper für die Immunhistochemischen Versuche

Antikörper	Verdünnung	Firma
pSer21EZh2	1 : 1000	Bethyl
HA	1 : 100	Cell signaling
EZH2	1 : 100	Cell signaling

Tab. 10: Primär-und Sekundärantikörper für die Co-Immunfluoreszenz

Antikörper	Verdünnung	Firma
pSer21EZh2	1 : 100	Bethyl
HA	1 : 100	Cell signaling
myctag	1 : 200	Cell signaling
ALEXAFluor568(donkey anti mouse)	1: 500	Invitrogen
ALEXAFluor568(donkey anti rabbit)	1: 500	Invitrogen

3.5.2 Antikörper für Western-Blot-Analysen

Tab. 11: Verwendete Primärantikörper Western-Blot-Analysen

Antikörper	Art	Verdünnung	Größe (kDa)	Firma/ Artikelnr.
β-Actin HRP		1: 20000	42	Santa Cruz,A3854
EZH2	Kaninchen	1: 1000	95	Cell signaling, 5246
HA	Maus	1:1000	60	Cell signaling, 2367
NFATc1	Maus	1: 500	95	Santa Cruz, sc-7294
pGS	Kaninchen	1:1000	85-90	Cell signaling, 3891
Myctag	Kaninchen	1:1000		Cell signaling,7076
pSer21EZH2	Kaninchen	1:1000	95	Bethyl, ICH-00388

Tab. 12: Verwendete Sekundärantikörper Western-Blot-Analysen

Antikörper	Verdünnung	Firma/ Artikelnr.
Kaninchen HRP	1: 10000	Cell signaling, 7076
Maus HRP	1: 10000	Cell signaling,7074

3.5.3 Antikörper für Chromatinimmunpräzipitationsversuche

Tab. 13: Verwendete Antikörper ChIP

Antikörper	Volumen	Herkunft	beads	Firma
IgG	1 µl	Maus	G	Santa Cruz
NFATc1 (H110)	16 µl	Kaninchen	A	Santa Cruz

3.6 Primer

3.6.1 Primer für quantitative PCR

Tab.14: Verwendete murine Primer für qPCR

Primer	Sequenz	Firma
Ezh2 forward	CAACCCGAAAGGGCAACAAA	Biomers
Ezh2 reverse	*ACCAGTCTGGATAGCCCTCT*	Biomers
Nfatc1 forward	GCCTTTTGCGAGCAGTAT	Santa Cruz
Nfatc1 reverse	GCTGCCTTCCGTCTATA	Santa Cruz

3.6.2 Primer für Chromatinimmunpräzipitationsversuche

Tab. 15: Verwendete murine ChIP Primer

Primer	Sequenz
Ezh2 forward	ATGCCTTCTTACCACAGTGACTT
Ezh2 reverse	CAGGGCACGAATTTTTACCACAT

3.6.3 siRNA-Konstrukt

Tab.16 Verwendetes siRNA-Konstrukt

siRNA Konstrukt	Sequenz	Firma
NFATc1	GCGUUUCACGUACCUUCCUTT	Ambion

3.7 Laborgeräte

Tab. 17: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Firma
Autoklav	Tuttnauer
Brutschrank WTB Binder	Hereaus Instruments
ChemoCam	Intas
DLReady^{TM} Luminometer	Berthold Technologies
Eismaschine	Ziegra Eis
Elektrophoresekammer	Bio Rad

Laborgerät	**Firma**
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Gefriertruhe	Heraeus Instruments
Heizblock	Techne AG
Inkubator	Memmert
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge Micro 200R	Hettich Zentrifuge
Mikroskop	Olympus
Mikrotom RM 2155	Leica
Multiscan FC Mikroplate Photometer	Thermo Scientific
Nano-Drop®-ND-1000	NanoDrop Technologies
pH-Meter	Mettler-Toledo
Reagenzglasschüttler Reax2000	Heidolph Instruments
Real-Time PCR 7500 Fast	Applied Biosystems
Real-Time PCR StepOnePlus™	Applied Biosystems
Schüttler	Bachofer
Sonifier W 250-D	Branson Digital Sonifier
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments
Stickstofftank	Tec-Lab
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermal Cycler T100	BioRAD
Thermomixer 5436	Eppendorf
Trans-Blot-Kammer	BioRad
Trockenschrank	Heraeus
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments
UV-Scanner	Kaiser
Video Graphic Printer	SONY
Videokamera Gel Print 1000i	BioPhotonics
Voltmeter für SDS-Gelelektrophorese	BioRAD
Wasserbad	GFL®
Zentrifugen	
- PicofugeTM	Stratagene

Laborgerät	**Firma**
- Biofuge Pico	Heraeus Instruments
- Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
- Laborfuge GL	Heraeus Instruments
- Mikro 200R	Hettich Zentrifugen
- Zentrifuge 5415C	Eppendorf

3.8 Labormaterialien

Tab. 18: Verwendete Labormaterialien

Material	**Firma**
96 Well für BrdU-Assay	Perkin-Elmer
Blottpapier Whatman	Schleicher & Schüll
Corning Platten	Fisher Scientific GmbH
Dako-Pen	Dako
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Einwegnadeln, Spritzen	Greiner-Bio-One
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Eppendorf
Glaswaren	Schott
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One
Kultivierungsplatten (6 Wells)	Sarstedt
Neubauerzählkammer	Carl Roth GmbH
Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll
Objektträger	Menzel-Gläser
Petrischale 3 cm, 10 cm, 20 cm	Thermo Scientific Nunc
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	
2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Discovery Comfort
2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Pipettenspitzen	Greiner Bio One
Platten für Bradfordproteinbestimmung	Sarstedt
Mikropistill	Carl Roth GmbH
Multipipetten	Eppendorf
PCR-Platten	Applied Biosystems
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Papier für UV-Licht-Entwickler	Mitsubishi Electric
Spritzen	Braun
Zellkulturflasche (50 ml, 250 ml,500 ml)	Greiner-Bio-One
Zellschaber	Sarstedt

3.9 Verwendete Softwareprogramme

Tab.19: Verwendete Softwareprogramme

Programm	**Firma**
Photoshop CS4	Adobe
Axio Vision Rel. 4.6	Carl Zeiss
ChemoStar Imager	Intas
Excel 2010	Microsoft®
StepOne™ Software v2.3	Applied Biosystems
Word 2010	Microsoft®

4 Methoden

4.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

4.1.1 Immunhistochemie

Durch immunhistochemische Färbung können durch Verwendung von spezifischen Antikörpern bestimmte Proteine in Gewebsabschnitten (aus paraffiniertem murinem Pankreasgewebe der AG Ellenrieder) mittels der Avidin-Biotin-Complex (kurz: ABC) - Methode angefärbt werden. Hierbei wird das „Vectastain® ABC Kit“ für die Immunfärbung genutzt. Die verwendeten Gewebsschnitte wurden für 15 Minuten in Xylol zweimalig eingelegt, sowie anschließend in absteigender Alkoholkonzentrationsreihenfolge (von 99-50%) für je 3 Minuten bei RT inkubiert.
Nun konnten die Schnitte für 20 Minuten in den unter Kapitel 3.2 Tabelle 5 genannten Puffern (Citrat, sowie TE-Puffer) gekocht werden. Es folgte nach Auskühlung der Gewebsschnitte die Verwendung von Blockpuffer über 20 Minuten, sowie die Zugabe und Inkubation der unter 3.5 Tabelle 9 genannten primären Antikörpern über Nacht. Die Schnitte konnten nun mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper für eine halbe Stunde inkubiert werden. Vor der Visualisierung mittels dem Substrat Diaminobenzidin erfolgte ein letzter Inkubationsschritt mit dem ABC-Komplex (dieser enthielt Streptavidin, welches eine deutliche Bindung mit an Biotin gekoppelten sekundären Antikörpern eingeht).

4.1.2 (Co-) Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz gelingt die Darstellung der subzellulären Lokalisation von Proteinen. In dieser Arbeit wurde gleichzeitig der Lokalisation von NFATc1 und pSerin21EZH2, sowie deren Verhältnis nachgegangen, daher („Co“) - Immunfluoreszenz. Dies gelingt mittels der Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, welche einzelne Proteine anfärben. In dieser Arbeit wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Hierbei kommt es nach initialer Bindung des Primärantikörpers an das Epitop des gesuchten Proteins zum indirekten Nachweis des Proteins mittels Interaktion mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörpers. Es erfolgte die Aussaat von Zellen in 6-Well-Platten, um nach Entfernung derer Kulturmedien mit 300µl DBPS gewaschen zu werden. Unter Verwendung von 300µl 4,5 oder 13%igem Paraformaldehyd wurden die Zellen fixiert und über 15 Minuten inkubiert.

Es erfolgte Wiederholung des initialen Waschschrittes, sowie Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran mittels 0,2% TritonX-100 in 300µl PBS und Inkubation für 20 Minuten. Daraufhin erfolgte die Waschung der Zellen mit DPBS für weitere viermal, sowie Inkubation mit 10% FCS in DPBS für eine Stunde. Durch letzteren Schritt gelingt eine Maskierung unspezifischer Bindungen, womit die Zellen nun mit einem Primärantikörper versehen werden können. Anschließend Notwendigkeit zur weiteren Inkubation über eine Stunde, sowie dreimalige Wiederholung der Waschung mit DPBS mit anschließender Zugabe des Sekundärantikörpers. Nach erneuter Inkubation für eine weitere Stunde (im Dunkeln, nicht wie zuvor bei Raumtemperatur), erfolgte dreimalige Waschung mit DPBS, sowie Entfernung der flüssigen Anteile. Die Zellen konnten auf Deckgläser übertragen und mittels weniger DAPI Tropfen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Die verwendeten Primär-und Sekundärantikörper sind unter Tabelle 10 aufgelistet.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die für die Versuche verwendeten humanen und murinen Zelllinien sind unter 3.1. unter Tabelle 1 charakterisiert.

4.2.2 Kultivierung

Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte nach Übertragung in eine mit 20 ml Nährmedium enthaltende Zellkulturflasche. Anschließend erfolgte die Anzucht in einem konstant mit 37°C temperiertem Brutschrank bei 5% CO_2-Gehalt. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tage nach vorheriger Waschung der Zellen mit 5 ml PBS gewechselt.

4.2.3 Passagieren von Zellen

In Abhängigkeit der gewünschten Zelldichte erfolgte die Überführung der Zellen in eine neu angelegte mit Nährmedium befüllten Zellkulturflasche. Es erfolgte Waschung der Zellen mit 10 ml PBS nach initialen Absaugens des genutzten Mediums. Die Zellen wurden nun mittels einer 4 ml Trypsin-EDTA enthaltenden Flüssigkeit für 10 Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu beenden erfolgte zusätzliche Gabe von 10 ml Medium. Nun konnte die Suspension für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und nach erfolgtem Absaugen des erhaltenen Überstandes in erneuertem Kulturmedium resuspendiert werden.

Entsprechend ihres Wachstumsverhaltens wurden die Zellen in variierender Anzahl in zusätzliche angelegte Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung übertragen oder es erfolgte die direkte Verwendung für Versuche.

4.2.4 Einfrieren, sowie Auftauen von Zellen

Um Zellen konservieren zu können, wurden diese eingefroren und in Flüssigkeitsstickstoff gelagert. Es erfolgt Hinzugabe von DMSO (in einer 1:10 Verdünnung) zu den in Kulturmedium befindlichen Zellen, wovon 1ml dieser Mischung in ein Kryo-Gefäß überführt wurde. Die Zellen wurden bei –80°C gelagert (Dauer 24 bis 48h) um die Konservierung mittels flüssigem Stickstoff ohne Schaden gewährleisten zu können. Bei geplanter Verwendung der Zellen erfolgte das Auftauen im Wasserbad (Temperatur bei 37 °C), mit anschließender Übertragung in eine Zellkulturflasche. Nachdem sich die Zellen am Boden der mit 10 ml Nährmedium befüllten Flasche anlagerten, konnte das bereits verwendete Medium mittels Absaugung entfernt, die Zellen erneut gewaschen und frisches Nährmedium hinzugefügt werden.

4.2.5 Messung der Zellzahl

Nach vorheriger Lösung wurden 10µl der zuvor ausgiebig resuspendierter Zellen in eine Neubauer-Zählkammer übertragen. Mithilfe eines Lichtmikroskops erfolgte die Auszählung der Zellzahl in allen vier Quadraten und die anschließende Bildung deren Mittelwertes. Das ermittelte Ergebnis wurde mit 10.000 multipliziert und somit der Zellanteil pro Milliliter bestimmt. Anschließend wurde die rechnerische Ermittlung der Verdünnung je nach gewünschter Zellzahl durchgeführt.

4.2.6 Zellbehandlung

Es erfolgte die Behandlung von *NKC-II*-Zellen mit 20 µM AR-A014418 (GSK-Inhibitor) oder DMSO nach vorangegangenem Mediumwechsel für insgesamt 24 Stunden.

4.2.7 Transfektion mit siRNA

Die für die Transfektion vorgesehenen Zellen wurden bereits am Vortag ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Um die Zellen mit gerichteter siRNA („small interfering*“* RNA) gegen NFATc1 zu transfizieren, erfolgte die Nutzung von siLentFect. Zunächst wurden 7 µl des gewünschten Konstrukts mit 150µl serumfreiem Nährmedium inkubiert. Als Kontrolle diente destilliertes H2O. Währenddessen erfolgte die Inkubation von 7 µl siLentFect mit 200 µl serumfreiem Nährmedium.

Danach wurden je 105µl der siLentFect-Lösung nach etwa fünf Minuten zu der Konstrukt- und Kontrolllösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubationszeit sowie eine Überführung dieser auf Zellen mit einer Konfluenz von 70-80 %. Je nach verwendeter si-RNA ergaben sich unterschiedliche Inkubationszeiten. Die Ernte und Weiterverarbeitung von Zellen mit siNFATc1 erfolgte nach 48-stündiger Inkubationszeit.

4.3 Molekularbiologische und immunologische Methoden:

4.3.1 Proteinexpressionsanalysen

4.3.1.1 Gewinnen von Zelllysat

Durch die Verwendung von verschiedenen Lyseverfahren ist es möglich, Aussagen über die Quantität eines Proteins in der gesamten Zelle, aber auch über die Verteilung eines bestimmten Zielantigens in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu treffen.

4.3.1.2 Extraktion von Gesamtzelllysat

Zu Beginn erfolgte eine einmalige Waschung der Zellen mit einem ml DPBS. Je nach Zellzahl des genutzten Wells wurden 70-150 µl des Lysepuffers auf die Zellen hinzugegeben. Es erfolgte die vorsichtige Lösung der Zellen vom Boden des Wells sowie die Übertragung der Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß. Dieses Eppendorfgefäß wurde nun „gevortexed“. Um die Zellmembran zu zerstören. Daraufhin erfolgte eine halbstündige Zentrifugation mit 1300rpm bei 4°C, um eine weitere Trennung der Zellbestandteile zu erzielen. Es erfolgte anschließend die Überführung des proteinhaltigen Überstandes in ein weiteres Eppendorfgefäß.

4.3.1.3 Quantitative Proteinbiobestimmung (nach Bradford)

Die quantitative Proteinbiobestimmung der Proben erfolgte mithilfe der photometrischen Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Um vergleichbare Ergebnisse zu erlangen, musste für alle Proben die äquivalente Proteinkonzentration verwendet werden. Über die Bildung eines Komplexes des Triphenylmethanfarbstoff „Coomassie-Brillant-Blau-G-250“ mit den Proteinen erfolgt eine Änderung des Absorptionsmaximums (Rehm und Letzel, 2010). Dies konnte daraufhin photometrisch bestimmt werden. Um die Methode nach Bradford durchzuführen, erfolgte nach Vorlage von 200 µl der Proteinassay-Mischung in eine 96-Well-Platte das Hinzufügen von 2 µl der Proben (Dissertationsschrift S.Vogt, 2016). Je nach Konzentration der Proteine zeigte sich ein Farbumschlag von braun nach blau.

Um exaktere Ergebnisse zu erlangen, erfolgte die Proteinbestimmung jeweils in zweifacher Bestimmung mit anschließender Berechnung des Mittelwertes. Die verschiedenen Konzentrationen von Bovine Serum Album (kurz BSA) konnten zum Herstellen einer Kalibrierungskurve verwendet werden. Hierfür erfolgte die Hinzugabe von 1, 2, 4 und 8 µl BSA (Konzentration entsprechend 1 ng/µl), auch zweifach bestimmt. Im Anschluss konnten die unterschiedlichen Extinktionswerte photometrisch ermittelt werden.

4.3.1.4 SDS (Sodiumdodecylsulfat)- Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde die SDS-(Sodiumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (kurz: SDS) verwendet. Damit die Proteine eine monomere Struktur annahmen, erfolgte die Denaturierung der Lysate durch das Aufkochen bei 95°C über fünf Minuten mit zusätzlich 2-Mercaptoethanol. Es wurden 10-/15 % Gele je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins verwendet. Um das Polyacrylamidgel herzustellen, wurden die unter Kapitel 3.3. aufgeführten Materialien gemischt. Hierbei wurde der hergestellte Ansatz nach Hinzugabe von APS (Polymerisationsinitiator) und von TEMED (Katalysator) sehr rasch vermischt und in den Zwischenraum zweier Glasplatten pipettiert. Es erfolgte die Polymerisation für eine Stunde. Daraufhin stand das Gel zur direkten Verwendung zur Verfügung oder konnte bei 4°C über Nacht aufbewahrt werden.

Tab.20: Herstellung verwendeter Gele für die Gelelektrophorese

Gel	**Puffer**	**APS**	**TEMED**
Sammelgel	1,75 ml Sammelgelpuffer	5,5 µl	5,5 µl
Trenngel	5 ml Trenngelpuffer	5,75 µl	5,75 µl
Stoppgel	0,5 ml Trenngelpuffer	4 µl	4 µl

Zur Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese musste zunächst die Eigenladung der Proteine neutralisiert werden. Dies erfolgte durch die Bindung von SDS, welches bereits im Lade-/ und Laufpuffer sowie im Gel enthalten und negativ geladen ist, an die Proteine im Lysat. Hierdurch sind alle Proteine im Gel negativ nach außen hin geladen und können sich je nach Massen-Ladungs-Verhältnis im Gel auftrennen. Es erfolgte die Hinzugabe von 5x 15 µl Laemmli zu 50 µl einer jeweiligen Probe. Anschließend wurde die Inkubation bei 95 °C über fünf Minuten durchgeführt. Vor Verwendung des Probengemisches erfolgte eine Zentrifugation über eine Minute sowie eine Volumenanpassung anhand der jeweiligen Konzentration. Nun konnten 20 µg der Proteingemische in die Geltaschen übertragen werden.

Um eine Zuordnung der einzelnen Banden bezüglich ihres entsprechenden Molekulargewichtes zu gewährleisten, ließ man 6 µl eines Proteinmarkers in einer Tasche während des Versuches mitlaufen. Nun wurden die Gelelektrophoresekammern mit Laufpuffer befüllt und es konnte die elektrophoretische Auftrennung unter Anlage einer Spannung von 120 V erfolgen. Nach Passieren des Sammelgels konnte die Spannung auf 160V erhöht und für weitere 90 Minuten angelegt werden. Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte daraufhin für ein bis zwei Stunden bei 160V.

4.3.1.5 Western Blot-Analyse-Verfahren

Mittels des Western Blot-Verfahrens können gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern visualisiert werden, indem sie auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Hierfür wurde ein Primärantikörper verwendet, welcher gegen ein proteinspezifisches Epitop gerichtet war und das zu untersuchende Protein detektierte. Des Weiteren wurde ein Sekundärantikörper verwendet, welcher enzymgekoppelt an den Primärantikörper bindet. Es erfolgte die vorsichtige Lösung des Sammel- und Stoppgels von der Glasplatte sowie die Übergabe in Trans-Blot-Puffer. Der Aufbau der Western Blot-Transfer-Kassette erfolgte in folgender Reihenfolge, in welcher die Western Blot-Analyse bei 400mA über eine Dauer von 1,5 h bei 4 °C erfolgt:

Anode

Schwamm

Blotting-Papier

Nitrocellulosemembran

SDS-Polyacrylamid-Gel

Blotting-Papier

Schwamm

Kathode

Um den Übertragungsprozess zu prüfen, indem die Banden sichtbar gemacht werden, erfolgt anschließend die Membranfärbung mittels einer Ponceaurotlösung. Es folgt das „Blocken“ der Membran auf einem Schüttler unter Verwendung von Milchpuffer (5 %) über eine Stunde nach vorherigem Zuschneiden sowie die Waschung der Membran mit TBST-Puffer (1x). Nach Hinzugabe spezifischer Antikörper (unter Berücksichtigung der Verdünnung) wird die geblockte Membran bei 4°C weiterhin in Milchpuffer bis zum nächsten Tag inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt das Reinigen der Membran mit 1 x TBST dreimal für je 10 Minuten sowie die Hinzugabe des Sekundärantikörpers, welcher

zuvor in 5%igem Milchpuffer angesetzt wurde. Es folgt eine erneute Inkubation auf dem Kippschüttler sowie die erneute Waschung mit 1x TBST, um nicht gebundene Primärantikörper zu lösen. Um die Proteinbanden zu detektieren, wurde „ECL Oxidizing Reagent“ und „ECL Enhanced Luminol Reagent“ in äquivalenter Menge gemixt und auf die Membran aufgetragen. Hierdurch konnten über das darin enthaltende Luminol, welches als Substrat für die mittels des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers katalysierte Chemolumineszenzreaktion dient, die jeweiligen Proteinbanden auf einem Röntgenbild sichtbar gemacht werden. Unsere Arbeitsgruppe verwendete die ChemoCam, um die jeweiligen lumineszierenden Banden sichtbar zu machen.

4.3.2 mRNA- Expressionsanalysen

4.3.2.1 RNA – Isolation

Um RNA aus Zellen zu isolieren, erfolgte zunächst die Entfernung des Mediums sowie Waschung mit PBS. Nach Absaugen des PBS wurde durch Verwendung des Lysis-Buffer-T die Lysierung der Zellen durchgeführt. Es erfolgte die Lösung der sich auf dem Boden der Platte befindlichen Zellen mittels Verwendung eines Zellschabers, sowie Überführung in ein 1,5 ml großes Eppendorfgefäß. Daraufhin erfolgte die RNA Extraktion unter Verwendung des „peqGOLD Total RNA Kit“. Das protokollgemäße Vorgehen wurde beachtet.

4.3.2.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des NanoDrop®-ND-1000- Spektrometers konnte die jeweilige Konzentration von DNA- und RNA-Proben bestimmt werden. Es erfolgte eine Adsorptionsmessung bei 260nm zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration der Probe, von welcher 1,5 µl aufgetragen wurden. Des Weiteren erfolgte die Ermittlung des Verhältnisses der Extinktionen bei 260- und 280nm. Es gilt ein Verhältniswert von >2,0 für RNA und >1,8 für DNA. Konnte ein geringerer Wert nachgewiesen werden, war dies ein Anhaltspunkt für eine Kontamination der Lösung.

4.3.2.3 Reverse Transkription

Um RNA in cDNA umzuschreiben, benötigt man das Enzym „Reverse Transkriptase“. Hierfür wurde das „Omniscript® RT Kit“ sowie dessen Protokollvorgaben verwendet. Es erfolgte folgende Ansatzzusammensetzung für 2µg jeder Probe:

2 µl	10x Buffer RT
2 µl	dNTP Mix
0,4 µl	Oligo dt Primer
0,5 µl	Rnase Inhibitor
1 µl	Omniscript RT

Die Proben, welche den Ansatz und die Zugabe von 2 µg RNA enthielten, wurden nun mit Wasser (ohne Rnase) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und inkubiert (Dauer eineinhalb Stunden, 37°C).

4.3.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Durch Verwendung quantitativer (Real-Time)-Polymerase-Kettenreaktionen können Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden, um so auf mRNA-Ebene die Expression eines bestimmten Gens nachzuweisen. Die Amplifizierung der zuvor gewonnen cDNA kann durch sich wiederholende Zyklen bestehend aus Enzymaktivierung, DNA-Denaturierung sowie Primerhybridisierung erzielt werden. In dieser Arbeit dient der Fluoreszenzfarbstoff SYBR–Green zur Kenntlichmachung der amplifizierten DNA mittels Anlagerung und anschließender Detektion.

Für je 2 µl jeder Probe erfolgte vor der Durchführung der qPCR die Vorlage folgenden Ansatzes in den Vertiefungen der 96- Well-Platte:

10 µl	SYBR Green
0,1 µl	Primer forward
0,1 µl	Primer reverse
7,8 µl	H2O

Es ist wichtig zu nennen, dass es für unterschiedliche PCR-Geräte für diverse Primer entsprechende Voreinstellungen gibt.

Tab.21: Beispielablauf Amplifikation PCR

Enzymaktivierung	95 °C	10 min.	
Denaturierung	95 °C	15 min.	
Primerhybridisierung	60 °C	1 min.	**39 x**
Elongation	95 °C	1min	

Anschließend erfolgte die Verdünnung der cDNA mit Wasser im Verhältnis 1:5, von diesem Ansatz wurden je 2 µl pro 96-Well pipettiert und gemessen. Es erfolgt zur Gewinnung genauer Messwerte eine Dreifachbestimmung, aus welcher der Mittelwert berechnet wurde.

4.3.2.5 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation (kurz: IP) können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Hierbei wird durch einen proteinspezifischen Antikörper ein Protein mitsamt der gebundenen Interaktionspartner aus einem Proteingemisch präzipitiert und im Anschluss mittels Western Blot (Versuchsbeschreibung s. bitte 4.3.1.5.) nachgewiesen. Zu Beginn wurden die bereits oben genannten Schritte zur Gewinnung von Protein aus Gesamtzellysat (s.bitte unter 4.3.1.2.) und Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (s. bitte unter 4.3.1.3.) durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 400-500 µg Protein aus Gesamtzelllysaten bzw. 100-200µg Protein aus nukleären Lysaten verwendet. Um Störungen durch unspezifische Bindung zu reduzieren, erfolgte vor der Durchführung der IP zunächst das sogenannte „preclearing“. Hierbei erfolgte nach Abhängigkeit der Isoform des zur Anwendung kommenden Antikörpers 20 µl Protein A– oder G-beads pro IP Zentrifugation bei 4°C sowie 5000rpm, sowie nachfolgende Waschung mit DPBS. Es konnten nun Überführung von 20µl der bereits mit DPBS im Verhältnis 1:1 verdünnten beads in das Zelllysat. Nach Hinzugabe von 40µl 25x Complete erfolgte das Komplettieren des Ansatzes mit Auffüllung auf 1 ml mittels DPBS. Die Proben wurden inkubiert (Dauer: 2h, mit 5000rpm bei 4°C), sowie der resultierende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die für die Versuche verwendeten Antikörper konnten nun den Ansätzen zugefügt werden. IgG wurde zur Negativkontrollle der Verdünnung, anstatt des präzipitierenden Antikörpers, verwendet. Die verwendeten Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen sind anschließend unter Tabelle 22 aufgelistet. Die Probenansätze wurden auf einem Rotator während der Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag konnte jedem Ansatz 50µl an beads hinzugefügt werden.

Um den Antikörper-Protein-Komplex zu fixieren, erfolgte eine Rotation der Proben (Dauer: 2 Stunden, bei 4°C). Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 4°C mit 1500rpm und anschließender Abnahme des Überstandes. Dann wurden dreimalige Waschungen der beads mit je 500µl DPBS und die erneute Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C zwischen den einzelnen Waschvorgängen durchgeführt. Nach den erfolgten Waschungen wurde der verbliebene Überstand verworfen und die beads mit 65µl 1x Lämmli benetzt. Zum Lösen der Interaktion des Protein-Antikörper-Komplexes und der beads erfolgte die Inkubation bei 95°C.

Es erfolgte daraufhin eine letztmalige Zentrifugation, sodass der resultierende- die präzipitierten Proteine enthaltende– Rest auf ein Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid–Gel pipettiert werden konnte.

Tab. 22: Verwendete Antikörper Immunpräzipitation

Name	Verdünnung	Hersteller/ Artikelnr.
pSer21EZH2	1:1000	Bethyl, ICH-00388
NFATc1	1:500	Santa Cruz, sc-13033
EZH2	1:1000	Cell signaling,5246
Myctag	1:1000	Cell signaling, 2272S

4.3.2.6 Chromatinimmunpräzipitation

Mittels Chromatinimmunpräzipitation (kurz: ChIP) kann die Bindung eines Proteins an eine definierte endogene Chromatinregion (von Zellen oder Gewebe) *in-vivo* detektiert werden. Um die zu einem Zeitpunkt an das Chromatin gebundenen Proteine zu fixieren erfolgte die Verwendung von Formaldehyd, sowie das Lysieren der Zellen. Das Chromatin kann nun mittels Ultraschall fragmentiert und für eine Immunpräzipitation verwendet werden. Im Anschluss kann durch Verwendung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen werden, ob die zu untersuchenden Proteine an dem gewünschten DNA-Abschnitt binden. Des Weiteren kann auch eine Aussage über die „Stärke“ der Bindung getroffen werden.

4.3.2.6.1 Isolation von Chromatin

Im Folgenden erfolgte die Kultivierung der Zellen nach initialer Aussaat der Zellen in drei 20 cm große Schalen. Bei Nachweis einer Konfluenz von 90 % konnte mit der Chromatinisolierung begonnen werden. Hierfür wurde zunächst eine 37%-ige Formaldehydlösung hinzugefügt, um die Protein-DNA-Bindungen zu fixieren (274 µl Lösung je 10 ml Medium). Durch die hinzugegebene Formaldehydlösung werden Amino- und Iminogruppen aufgrund von einer Kondensationsreaktion kovalent miteinander verknüpft, sofern sich die Moleküle in räumlicher Nähe zueinander befinden. Um eine ausgewogene Verteilung des Formaldehyds zu erreichen, wird die Kulturschale zehn Minuten lang bei RT geschwenkt und inkubiert. Im Anschluss wurde die Quervernetzung über fünf Minuten lange Inkubation mit 550µl 2,5M Glycin je Kulturschale gestoppt. Es erfolgte ein zweimaliges Waschen mit gekühltem PBS und anschließender Übernahme des PBS und Zellgemisches aller Kulturschalen mithilfe eines Zellschabers in ein 15 ml-Röhrchen.

Es erfolgte die Zentrifugation der Proben über 5 Minuten bei 2500rpm und 4°C mit anschließender Absaugung des Überstandes. Das resultierende Zellpellet, welches Zellen von drei Kulturschalen beinhaltet, wurde nach Resuspendierung in 5 ml an Lysepuffer für eine halbe Stunde inkubiert und hierfür auf Eis gelagert.

Es erfolgte eine erneute 5-minütige Zentrifugation bei 2500rpm und 4°C, mit darauffolgendem Verwerfen des Überstandes. Um aus dem resultierenden Zellpellet das Chromatin freisetzen zu können, erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 5 ml RIPA-Puffer sowie die Aufteilung des Gemisches auf fünf 15 ml-Röhrchen. Es erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für weitere 10 Minuten. Zur Chromatinfragmentierung erfolgte in einem Ethanol-Eisbad unter Verwendung des „Sonifier W 250-D“ die Sonifizierung mit einer Pulsanzahl von 120-140 (je nach Zellkonfluenz) sowie die Vorgabe der Amplitude bei 20%. Im Anschluss an die Sonifizierung konnten die Proben in ein Röhrchen (15ml) zusammengeführt und bei 4°C aufbewahrt werden.

4.3.2.6.2 Kontrolle der Sonifizierungseffizienz

Mittels einer gelelektrophoretischen Auftrennung von einem Anteil der Proben konnte die Effizienz des Sonifizierungsprozesses vor der geplanten Immunpräzipitiation kontrolliert werden. Hierfür erfolgte die Entnahme von 50µl jeder Probe. Nach Hinzugabe von 0,7 µl RNase A sowie 1 µl Proteinase K wurden die Probengemische zunächst über drei Stunden bei einer Temperatur von 55 °C, sowie anschließend bei 65 °C bis zum Folgetag inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 19 µl der Probe auf ein 1% Agarose-Elektrophoresegel geladen. Eine Länge zwischen 200 -1000 bp des Chromatins galt als Richtwert, um mit der IP umgehend fortfahren zu können.

4.3.2.6.3 Blockierung der Sepharose „G-*beads*“

Um die beads zu blockieren, wurden bei geplanter IP 110 µl Agarose G- beads (mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen (dieser Schritt wurde zweimalig durchgeführt). Daraufhin erfolgte die Hinzugabe von 400 µl Complete (25x), 438 µl von *Salmon Sperm* (400 µg/ml) und die Gabe von 586 µl BSA (10 mg/ml), sowie unter Verwendung von RIPA-Puffer Auffüllung auf 10ml Gesamtvolumen. Bis zum Folgetag ließ man die Proben bei 4°C rotieren.

4.3.2.7 Preclearing und Immunpräzipitation

Das *Preclearing* wird verwendet, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Hierbei erfolgt eine Zentrifugation der geblockten *beads* bei 5000 rpm sowie 4°C. Daraufhin erfolgte die Verdünnung der Proben mit gleichem Volumen an RIPA-Puffer. Je geplanter

IP konnten 30 µl der erstellten Lösung 1 µg von „Maus- und Kaninchen“-IgG beigefügt und auf 1 ml Gesamtmenge mit RIPA-Puffer aufgefüllt werden.

Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Rotation der Suspension bei 4°C. Die Suspension konnte nun den Proben beigefügt werden. Es erfolgte eine Wiederholung der zweistündigen Rotation. Daraufhin wurde die Lösung über 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert (bei 4°C).

Nun wurde pro IP 100 µg des mit vorgereinigtem Chromatin enthaltenen Überstandes in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Hinzugabe von 4µg Antikörper zu den Proben (in der jeweiligen Verdünnung) rotierten diese bis zum Folgetag bei 4°C. Am nächsten Tag konnten 50 µl der übrigen geblockten *beads* nach vorheriger Verdünnung mit RIPA-Puffer (in äquivalenter Menge) jeder IP hinzugefügt werden. Es erfolgte nun eine zweistündige Rotation der Probenansätze bei 4°C.

4.3.2.8 Waschen der Proben

Es erfolgte die Zentrifugation der Ansätze bei 1300 rpm und 4°C für eine Minute mit anschließender Aspiration des Überstandes mithilfe einer Spritze. Im Anschluss wurden die Pellets mit je einem Milliliter unterschiedlicher Waschpuffer durch Schwenken gemischt.

(Reihenfolge: Waschpuffer I (einmalig), Waschpuffer II (einmalig), Waschpuffer III (zweimalig erfolgt), TE-Puffer (zweimalig erfolgt)).

Daraufhin erfolgte die erneute Zentrifugation bei 13000 rpm. Im Anschluss an den letzten „Waschgang“ konnte durch Stoßen einer Spritzenkanüle in das Pellet der Rest des Waschpuffers entfernt werden.

4.3.2.9 Elution und Reversion

Der Vorteil der Formaldehydfixierung ist, dass bei geeignetem pH–Wert oder bei ausreichend Hitze die initiale Kondensreaktion wieder reversibel ist. Hierfür werden die Pellets in 250 µl Elution-Puffer gelöst und rotieren bei RT über 15 Minuten. Diese Proben werden mit 1300 rpm für eine Dauer von 1 Minute (bei 4°C) zentrifugiert, sowie folgend der entstandene Überstand in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Nach Hinzugabe von 50µl Reversionspuffer erfolgte eine dreistündige Inkubation der Proben (bei 55°C). Als Inputkontrolle diente 1 % des IP-Volumens der bereits sonifizierten Proben, welches mit 500µl Elution Puffer vor der dreistündigen Inkubation vermengt wurde. Die Proben konnten nun über Nacht inkubiert werden (bei 65°C). Das gleiche Vorgehen erfolgte bei den eluierten DNA–Proben.

4.3.2.10 Purification

Die Aufreinigung der DNA erfolgte anhand der Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kits“. Die Amplifikation der Proben wurde anschließend mittels qRT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden 2µl Probe pro Well aufgetragen und im Anschluss wurden die Inputwerte von den IP-Proben-Werten zum Auswerten der ChIP subtrahiert.

4.3.3 Statistische Auswertung und graphische Abbildung

Es wurden graphische Abbildungen in Form von Säulendiagrammen erstellt, welche die Mittelwerte und die Standardabweichungen darstellen. Es erfolgte die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung oder des Standardfehlers aller numerischen Ergebnisse.

Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines ungepaarten einseitigen t-Tests bei Werten n größer 1 (mit Hilfe von Excel). Ein p-Wert von $p<0,05$ konnte als signifikant (*) und ein p-Wert von $p<0,01$ als deutlich signifikant (**) bewertet werden.

5 Ergebnisse

5.1 Onkogenes Potential von EZH2 im Pankreaskarzinom

Um der Rolle der Histonmethyltransferase EZH2 im gesunden Pankreas, während der Karzinogenese und im etablierten Tumor nachzugehen, erfolgte die Durchführung von Expressionsanalysen in unterschiedlichen Modellen.

Unter Verwendung von Pankreasgewebe aus *KPC*-Mäusen stammend, welche durch eine Pankreas-spezifische Induktion einer *Trp53*-Mutation und einer konstitutiven Expression des Protoonkogens *Kras* charakterisiert sind erfolgten immunhistochemische Analysen (Hingorani et al., 2003, 2005; Singh et al., 2015). Hignorani et al. zeigten, dass Mäuse dieses Genotyps binnen weniger Monate zuverlässig mäßig differenzierte Karzinome entwickeln. Im Alter von 2 Monaten konnte bei diesen Mäusen noch gesundes Pankreasgewebe nachgewiesen werden, wohingegen im Alter von 5 Monaten bereits hepatisch metastasierte Tumore vorzufinden waren. Interessanterweise konnte bei diesen *KPC*-Mäusen eine Zunahme des EZH2-Expressionslevels von Azinuszellen bis hin zum PDAC beobachtet werden (s. bitte Abb. 3).

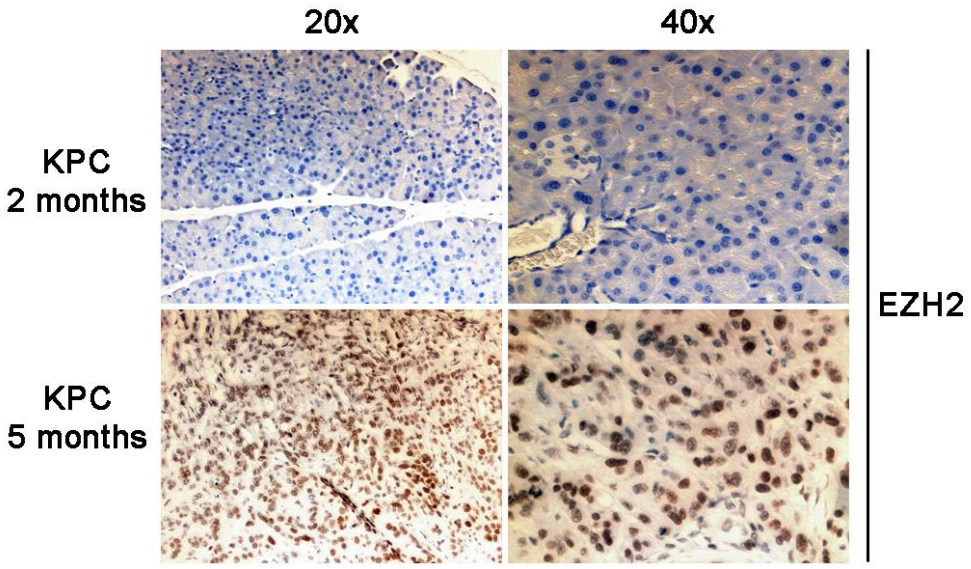


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung von EZH2 in 2-, sowie 5 Monate alten Mäusen des Genotyps *KPC.* Abbildungen sind dargestellt in 20- und 40- facher Vergrößerung.

Mittels Western Blot konnte sowohl in *murinen* als auch in humanen Pankreaskarzinomzellen ebenso eine erhöhte EZH2-Expression nachgewiesen werden. Für die Untersuchung der Expression von EZH2 in humanen PDAC wurden folgende Zelllinien verwendet: PaTu8988T, PANC-1 und L3.6. EZH2 ließ sich in allen untersuchten humanen Zellen nachweisen (s. bitte Abb. 4).

Des Weiteren konnte eine deutliche EZH2-Expression in Tumoren aus *KPC*- und *KNPC* Mäusen festgestellt werden. Bei der *KNPC*-Mauslinie, welche bereits NFATc1 konstitutiv aktiv sowie die oben bereits beschriebene *Kras*-Mutation enthielt, wurde eine Mutation des *Trp53*-Gens integriert, welche der bereits in humanem Pankreaskarzinomgewebe mehrmals nachgewiesenen Mutation entspricht. Diese genetische Veränderung wurde mit Hilfe einer *p48*-gekoppelten *Cre*-Rekombinase aktiviert. Bei diesen Mäusen konnte durch den Verlust der tumorsuppressiven p53-Funktion eine deutliche Beschleunigung der Karzinogenese sowie die Bildung äußerst schlecht differenzierter Pankreaskarzinome nachgewiesen werden (Dissertationsschrift, S.Vogt, 2016; Singh et al., 2015).

Auffallend im Vergleich zu den bereits genannten Mausmodellen zeigten die *NKC-II*-Zellen, welche zusätzlich zur *Kras*-Mutation mithilfe einer *p48*-gekoppelten *Cre*-Rekombinase konstitutiv aktives NFATc1 exprimieren (Baumgart et al., 2014), ein vergleichsweise geringeres EZH2-Expressionslevel (s. bitte Abb.4).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine EZH2-Expression ubiquitär im PDAC nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren konnte eine Zunahme der EZH2 Expression beim Voranschreiten der Karzinogenese beobachtet werden.

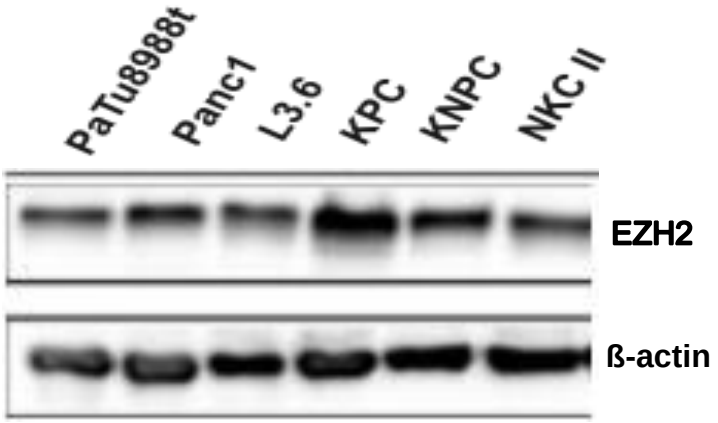


Abbildung 4: Nachweis der EZH2 Expression in Pankreaskarzinomzellen.
EZH2 Expressionsnachweis mittels Western-Blot-Verfahrens nach Proteingewinnung aus humanen Pankreaskarzinomzelllinien (PaTu8988t, Panc1 und L3.6), sowie transgenen Mäusen folgender Genotypen: *KPC*, *KNPC* und *NKC-II*. ß-actin diente hierbei als Ladekontrolle.

5.2 NFATc1 und EZH2 Co-Expression im PDAC

In zahlreichen Publikationen konnte eine wichtige Rolle von NFATc1 im Pankreaskarzinom bestätigt werden. Dabei reguliert NFATc1 die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen durch transkriptionelle Regulation spezifischer Targetgene (Buchholz/Ellenrieder, 2007; Baumgart et al., 2012, 2014). Baumgart et al. verwendeten Primärtumorzellen von Bauchspeicheldrüsenkrebs aus *NKC-II*-Mäusen und unterzogen diese einer Microarray-vermittelten Genexpressionsanalyse in Anwesenheit oder Abwesenheit von NFATc1. Wie bereits einleitend erwähnt, konnte hierbei EZH2 als eines der am stärksten regulierten NFATc1-Targetgene identifiziert werden (s. bitte Abb.2). In Kenntnisnahme dessen sowie bei Nachweis von erhöhten Expressionslevel beider Faktoren in humanen Pankreaskarzinomzellen (Chen et al., 2017), stellten wir die Hypothese auf, dass EZH2 und NFATc1 während der Entstehung und Tumorprogression des PDAC kooperieren.

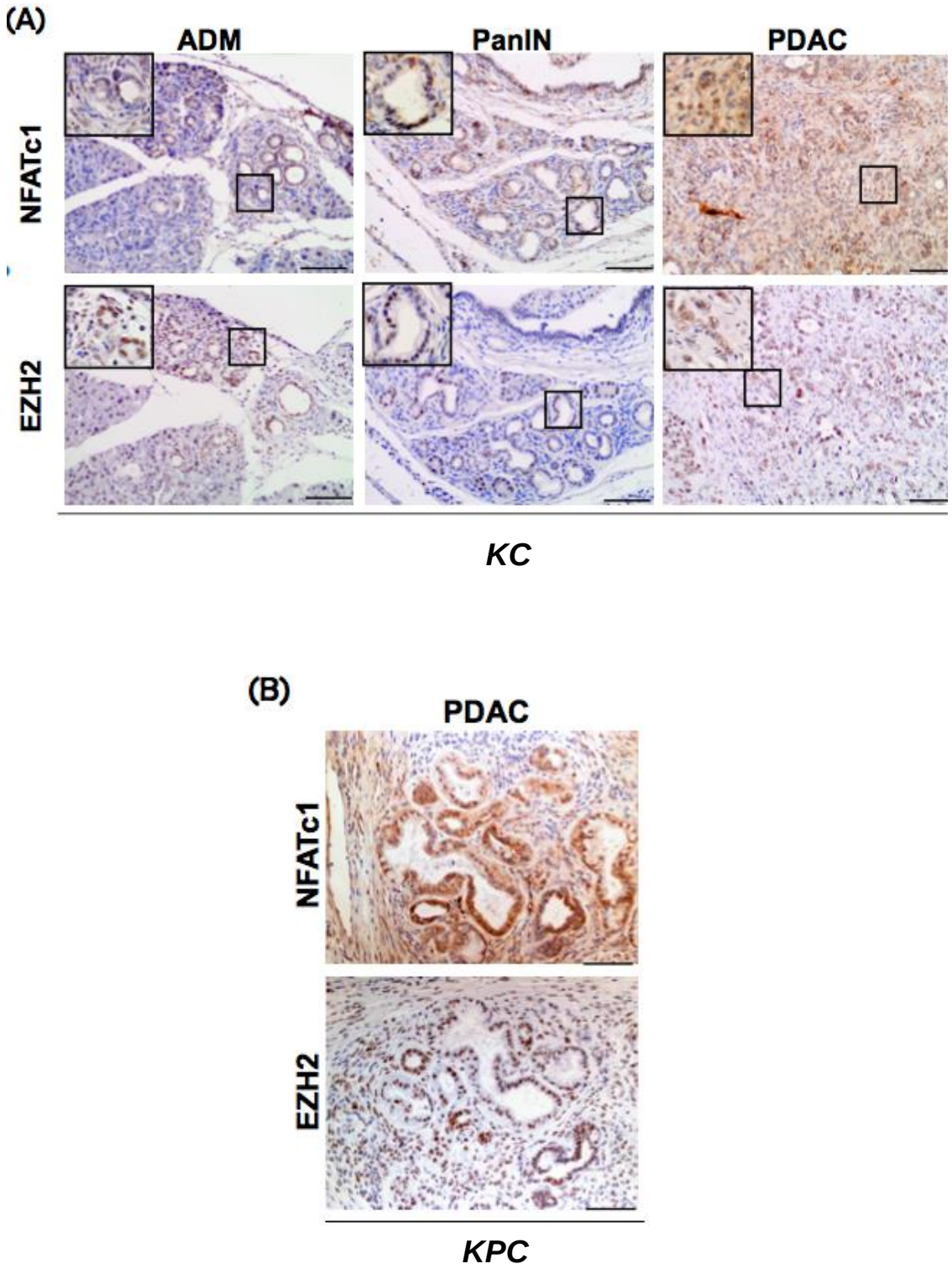
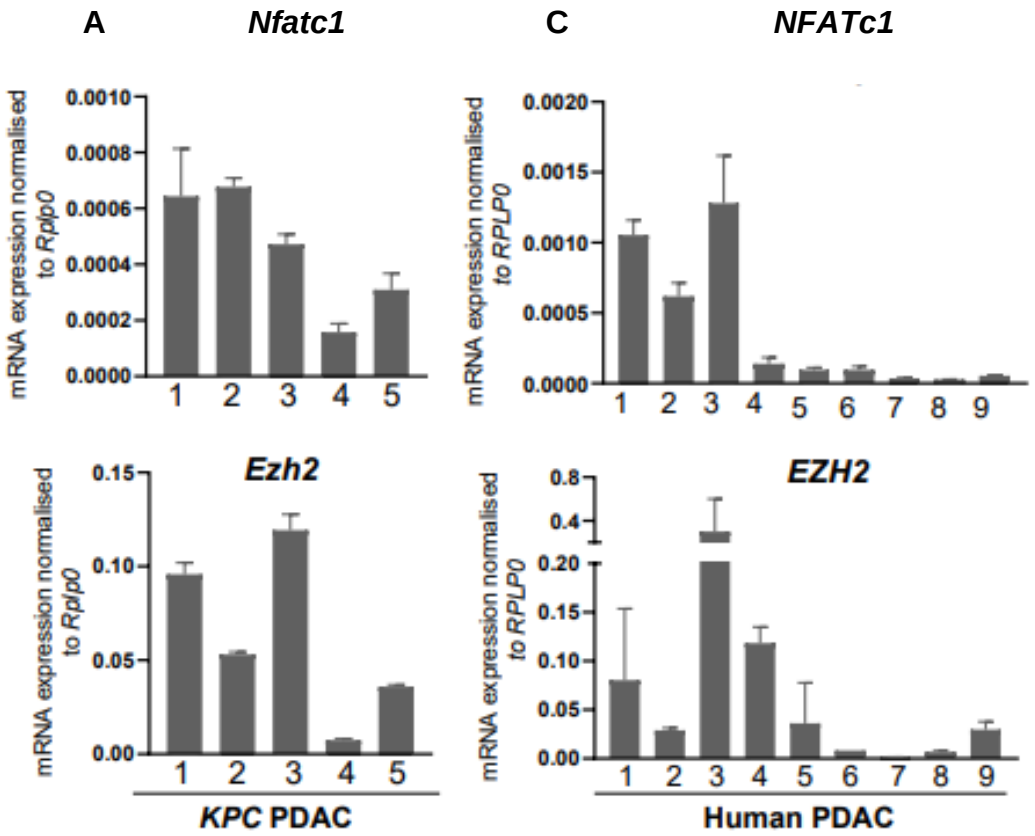


Abbildung 5: Nachweis der Co-Expression von NFATc1 und EZH2 in *KC*- und in *KPC*-Mäusen. Abbildung (A) zeigt immunhistochemische Analyse von NFATc1 und EZH2 im Stadium der ADM, PanIN-Läsionen und invasivem PDAC in *KC*-Mäusen (repräsentativ für jeweils 6 Mäuse). Vergrößerung 20x; Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Abbildung (B) zeigt immunhistochemische Analyse von NFATc1 und EZH2 im Stadium des PDAC von *KPC*-Mäusen (repräsentativ für jeweils 6 Mäuse). Vergrößerung 20x; Maßstabsleiste: 50 µm. (Abbildungen bereits publiziert in „Cells“, Patil et al.2021)

Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte sich bereits in benignen Vorläuferläsionen (ADM- und PanIN-Läsionen) und mit zunehmender Intensität in invasiv wachsenden Tumoren von *KC*-Mäusen eine Co-Expression von EZH2 und NFATc1 (s.bitte Abb. 5A). Ähnliche Ergebnisse konnten wir in invasiven Pankreastumoren von *KPC*-Mäusen erzielen (s.bitte Abb. 5B).

In Kooperation mit Prof. Jochen Gaedcke, (Klinik für Allgemein-Viszeral-und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen) wurden mittels manueller Mikrodissektion tumorzellreiche Areale aus dem Pankreas humaner und *muriner* (*KPC*-Modell) Proben entnommen und anschließend RNA isoliert. In *murinen* Tumoren konnten wir sowohl eine mRNA Expression von *Nfatc1* als auch *EzH2* nachweisen, wenngleich nur bei deutlich erhöhter *Nfatc1*-Expression auch eine Tendenz zu erhöhten *EzH2* mRNA Expressionslevel festzustellen war *(*s. bitte Abb. 6 A, sowie B mit Nachweis eines Korrelationskoeffizienten von r = 0,63). In humanem PDAC Gewebe konnte hingegen eine signifikante Korrelation der jeweiligen Expression von *EZH2*- und *NFATc1*-mRNA gezeigt werden (s. bitte Abb. 6C und D, mit einem Korrelationskoeffizienten von r = 0,75).



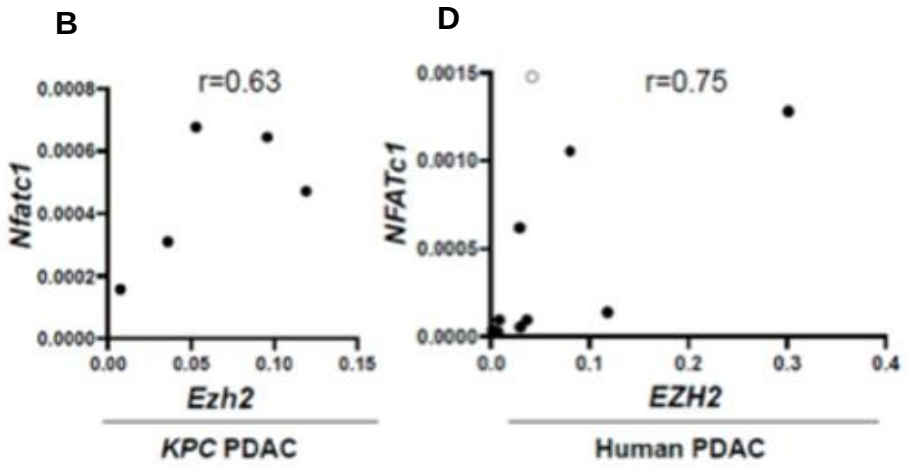
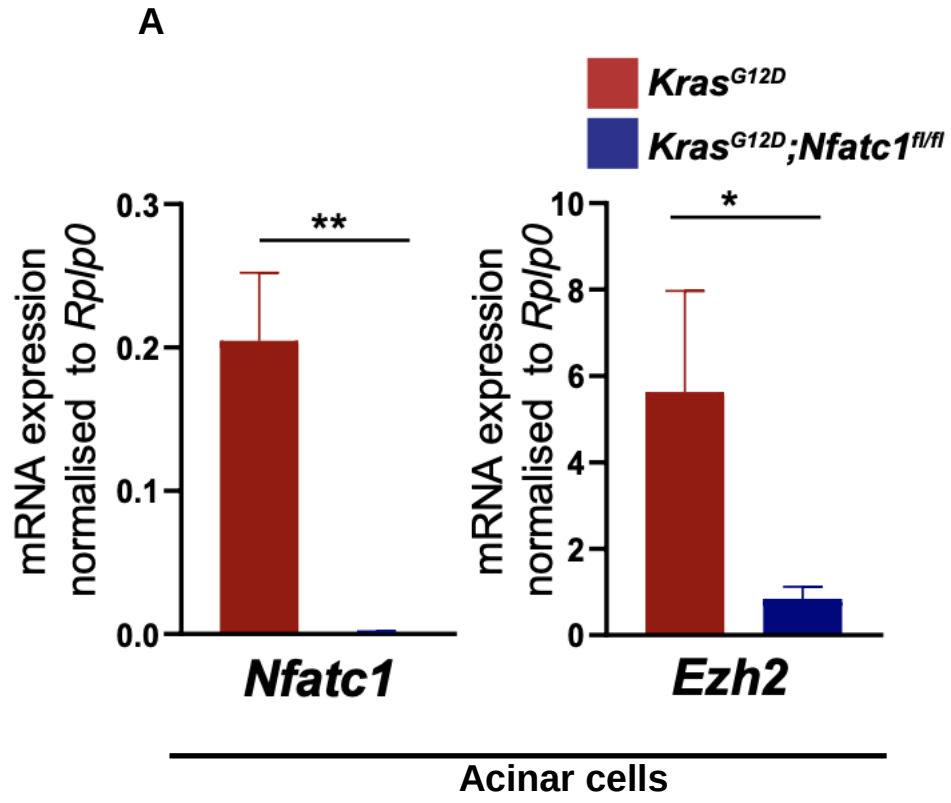


Abbildung 6: *NFATc1*- und *EZH2*- mRNA-Expression in *KPC* und menschlichem PDAC nach Mikrodissektion tumorzellreicher Areale. Abbildung (A) Balken/Nummern repräsentieren 5 Mäuse, sowie die Balken/Nummern in Abbildung (C) repräsentieren 9 Patienten. Abbildung (B) und (D) zeigen Korrelationsdiagramme der *NFATc1*- und *EZH2*-mRNA-Expression in *KPC* (B) und menschlichen (D) PDAC. Hierbei entspricht ´r´ dem „Pearson"-Korrelationskoeffizient. (Abbildungen bereits publiziert in „Cells", Patil et al.2021)

5.3 Einfluss von NFATc1 auf die Expression von *EZH2*

Als Transkriptionsfaktor reguliert NFATc1 die Genexpression seiner Zielgene über spezifische Bindung an Promotoren und-/oder Enhancer. In Abhängigkeit des zellulären Kontexts kann NFATc1 die Expression seiner Zielgene aktivieren oder reprimieren (Rao et al., 1997; Koenig et al., 2010a*).*

Unter Verwendung von Azinuszellexplantaten aus transgenen Mausmodellen mit wildtypischer NFATc1 Expression (*Kras^{G12D}-Maus)*, sowie aus *Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl}$* -Mäusen, in welchen das *Nfatc1* Gen pankreasspezifisch deletiert ist, konnte dem Einfluss der NFATc1-Expression auf die *Ezh2*-mRNA-Expression nachgegangen werden (Aliprantis et al., 2008; Baumgart et al., 2014; Chen et al., 2015). In Azinuszellen aus *Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl}$* -Mäusen konnte eine im Vergleich zur Expression in *Kras^{G12D}*-Mäusen deutlich reduzierte *Ezh2-mRNA*-Expression nachgewiesen werden, ebenso zeigte sich eine erniedrigte Proteinexpression in der Western Blot-Analyse (s. bitte Abb.7 A und B). Die Bestätigung des NFATc1-Knockdowns erfolgte in Proteinlysaten aus Azinuszellen 6 Wochen alter *Kras^{G12D-}* und *Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl}$* -Mäusen mittels Western Blot-Analysen (s. bitte Abb. 7 B).



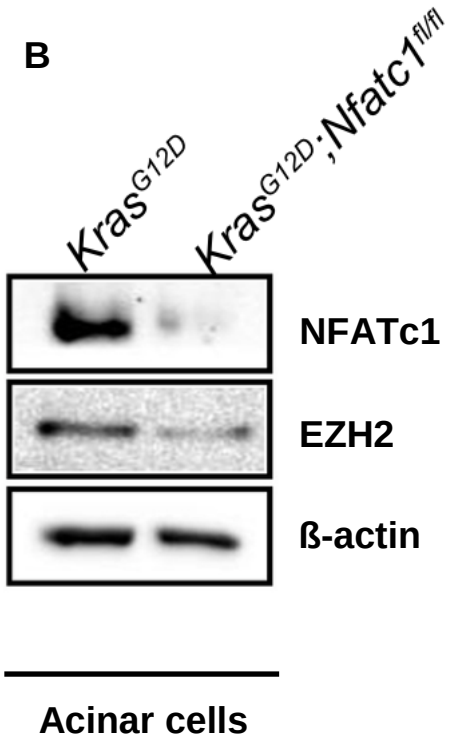


Abbildung 7: NFATc1 Depletion führt zum Verlust von EZH2.

(A) *Nfatc1* (links) und *Ezh2* (rechts) mRNA-Expression in Azinuszellen, welche aus *Kras*^{G12D}-und Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl}$ –Mäusen isoliert wurden (n = 3 Mäuse/Genotyp). Die Werte sind Mittelwerte +/- SD von n=3 ((zweiseitiger, ungepaarter student´s t-test). Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von < 0,05 gewertet. Hierbei entspricht die Kennzeichnung * einem p-Wert von < 0,05; ** entspricht einem p-Wert von p < 0,01. (B) Nachweis der NFATc1- und EZH2-Expression aus Lysaten von Azinuszellen, welche aus 6 Wochen alten *Kras*^{G12D}-und Kras^{G12D};NFATc1$^{fl/fl}$–Mäusen extrahiert wurden. ß-actin diente als Ladekontrolle. (Abbildungen bereits publiziert in „Cells“, Patil et al.2021)

Um zu untersuchen, ob sich eine NFATc1–abhängige Expression von EZH2 auch im etablierten Karzinom findet, wurden primäre Pankreaskarzinomzellen untersucht, die aus *NKC-II*-Mäusen mit pankreas-spezifischer Expression von aktivem *Kras und NFATc1* isoliert wurden. Es erfolgte die Transfektion der Zellen mit siRNA NFATc1. Nach einer Dauer von 24 Stunden erfolgte die Isolation von RNA und Gesamtzelllysat. Mittels Western Blot-Verfahren ließ sich der Knockdown bestätigen (s. bitte Abb. 8 B).

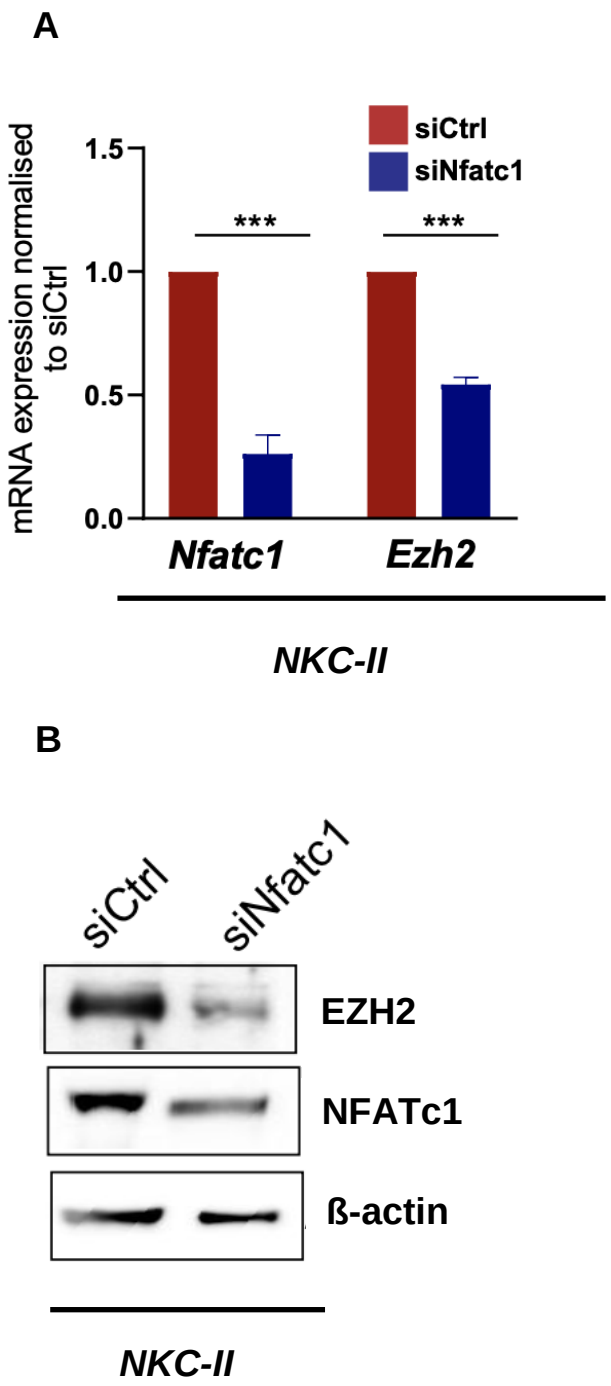


Abbildung 8: Einfluss des NFATc1 Knockdowns auf die EZH2 Expression.

(A) Darstellung der *Nfatc1*- und *Ezh2*-mRNA Expression nach erfolgtem *NFATc1*-Knockdown in *NKC-II*- Zellen mittels qRT-PCR. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten werden zusammen mit auf den SD-Ausdruck normierten Standardabweichungen dargestellt. (B) Expression in *NKC-II*-Zellen, nachgewiesen durch Western Blot-Analyse 24 Stunden nach der Transfektion mit siRNA gegen NFATc1 oder nach der Behandlung mit Silentfect als Negativkontrolle. *ß-actin* diente hierbei als Ladekontrolle.(Abbildungen bereits publiziert in „Cells“, Patil et al.2021)

Es konnte nach erfolgtem NFATc1-Knockdown äquivalent zu den Untersuchungen der Azinuszellen ebenfalls eine deutliche Reduktion der *Ezh2*-Expression auf *mRNA*- und Proteinebene (s. bitte Abb. 8 A und B) detektiert werden. Zusammenfassend konnte eine NFATc1-abhängige Regulation der EZH2 Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien des PDAC auf mRNA-Ebene sowie ebenso auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Mittels ChIP wurde dem Bindungsverhalten mit der Frage einer NFATc1-abhängigen Regulation der EZH2-Expression über eine direkte Bindung seitens NFATc1 an das *EZH2* Gen nachgegangen. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur IgG-Kontrolle eine robuste Bindung des Transkriptionsfaktors im Bereich des *Ezh2* Promotors (s. bitte Abb. 9).

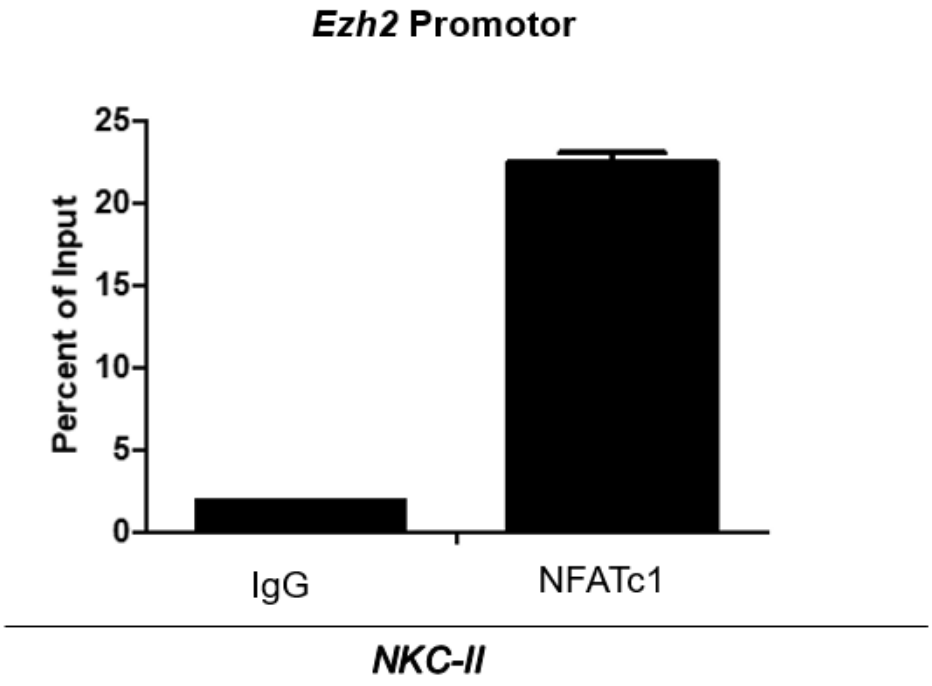


Abbildung 9: Nachweis der NFATc1 Bindung an den Promotor von *Ezh2.*
Chromatinimmunpräzipitation in *NKC-II*-Zellen. Nach entsprechender Anzucht der Zellen im Kulturmedium erfolgte eine ChIP unter Präzipitation von NFATc1 bzw. IgG. Anschließend erfolgte die Durchführung einer qRT-PCR mit Hilfe derer die Bindung am Promotor von *Ezh2* als prozentualer Anteil der Bindung des Inputs ermittelt wurde. Kontrolle diente IgG (n=3).

Abbildung 10: Modell der EZH2-Expressionszunahme nach initialer Bindung von NFATc1 am *EZH2*-Promotor.

5.4 NFATc1 und EZH2 bilden einen Proteinkomplex

Wie einleitend erwähnt, besitzen NFAT-Proteine eine sehr geringe DNA-Bindungsaffinität und regulieren die Gentranskription daher regelmäßig gemeinsam mit Partnerproteinen (Baumgart et al., 2013). Da Partnerproteine von NFATc1 häufig auch NFATc1-Zielgene darstellen, wie beispielsweise *SOX2* (Singh et al., 2015) und *STAT3* (Baumgart et al., 2014), stellte sich die Frage, ob NFATc1 und EZH2 ebenfalls physikalisch miteinander interagieren.

Mittels Immunpräzipitation von endogenem NFATc1 aus Gesamtzelllysat von humanen Panc1- Zellen mit anschließender Western Blot-Analyse (s. bitte Abb. 11) konnte eine robuste Komplexbildung und somit EZH2 als Bindungspartner von NFATc1 bestätigt werden.

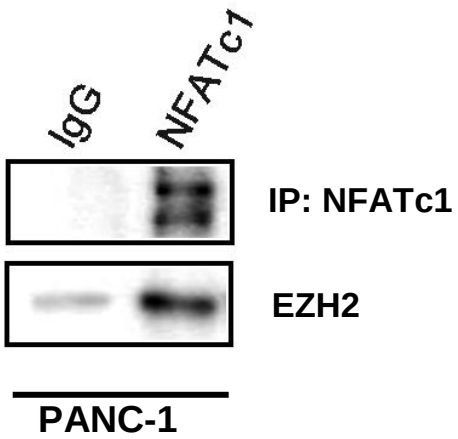


Abbildung 11: Physikalische Interaktion von NFATc1 und EZH2**.** Es erfolgte die Immunpräzipitation von NFATc1 in humanen Panc-1 Zellen (Verwendung von Gesamtzelllysaten) mit anschließender Durchführung einer Western Blot Analyse, um die biochemische Interaktion mit EZH2 zu untersuchen. Hierbei diente IgG als Negativkontrolle.

5.5 Posttranslationale Phosphorylierung von EZH2 als Voraussetzung für die Bildung des NFATc1/EZH2-Komplexes

Die Aktivität von NFATc1 kann mittels diverser Phosphatasen und Kinasen reguliert werden. Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit führten zur Aufstellung der Hypothese, dass NFATc1 und EZH2 einen gemeinsamen Komplex bilden, wodurch sie zum einen die Genregulation beeinflussen und zum anderen die onkogenen Eigenschaften von EZH2 fördern können. Xu et al. beschrieben 2012 eine PRC2-unabhängige Funktion von EZH2, die durch Phosphorylierung von Serin-21 induziert wird.

Kim et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung an Serin-21 mit der Aneignung aktivierender Eigenschaften von EZH2 im Glioblastom einhergeht.

In Kenntnisnahme dieser Forschungsergebnisse stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung von Serin-21 auch im Pankreaskarzinom bedeutsam ist und Einfluss auf die Komplexbildung mit NFATc1 ausübt. Tatsächlich konnte mittels Immunhistochemie eine Co-Expression von NFATc1 und pSer21EZH2 im Pankreaskarzinom bei *KPC*-Mäusen nachgewiesen werden (s. bitte Abb. 12).

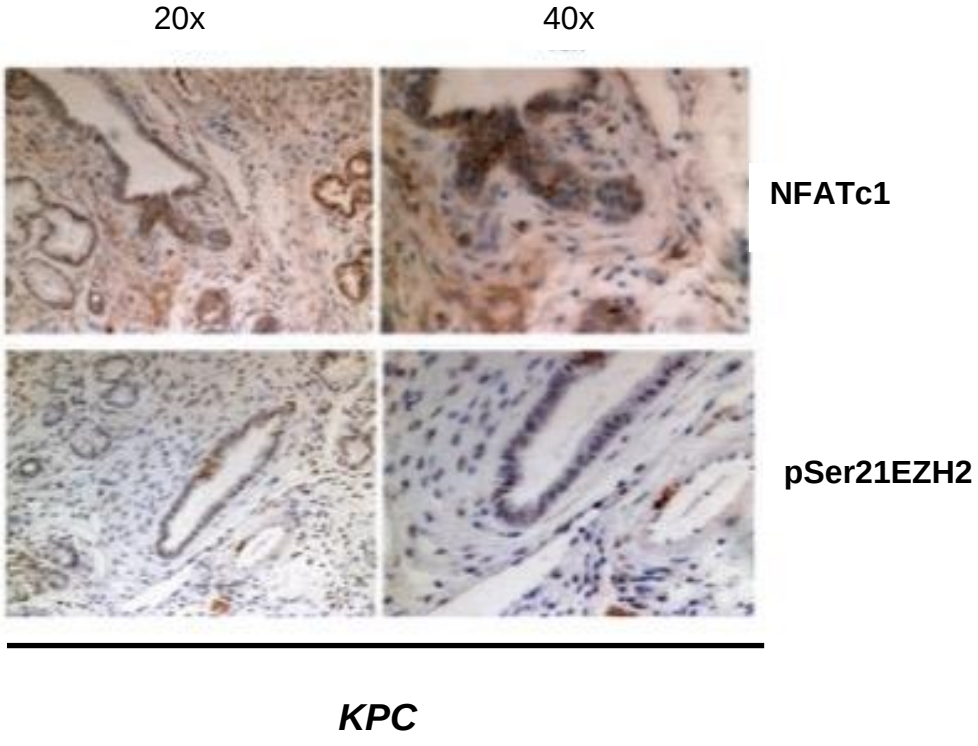


Abbildung 12: Immunhistochemische Analyse der Expression von NFATc1 und pSer21EZH2 im PDAC 5 Monate alter *KPC*- Mäuse. In 20-und 40× Vergrößerung. Die Färbungen erfolgten in direkt benachbarten seriellen Schnitten.

Die Co-Expression von NFATc1 und pSer21EZH2 lässt sich ebenfalls im Zellkern von PDAC Zellen (hier beispielsweise in *NKC-II*-Zellen) nachweisen. Hierfür erfolgte die Verwendung eines fluoreszierenden Antikörpers, welcher spezifisch pSer21EZH2 detektiert (s. bitte Abb.13).

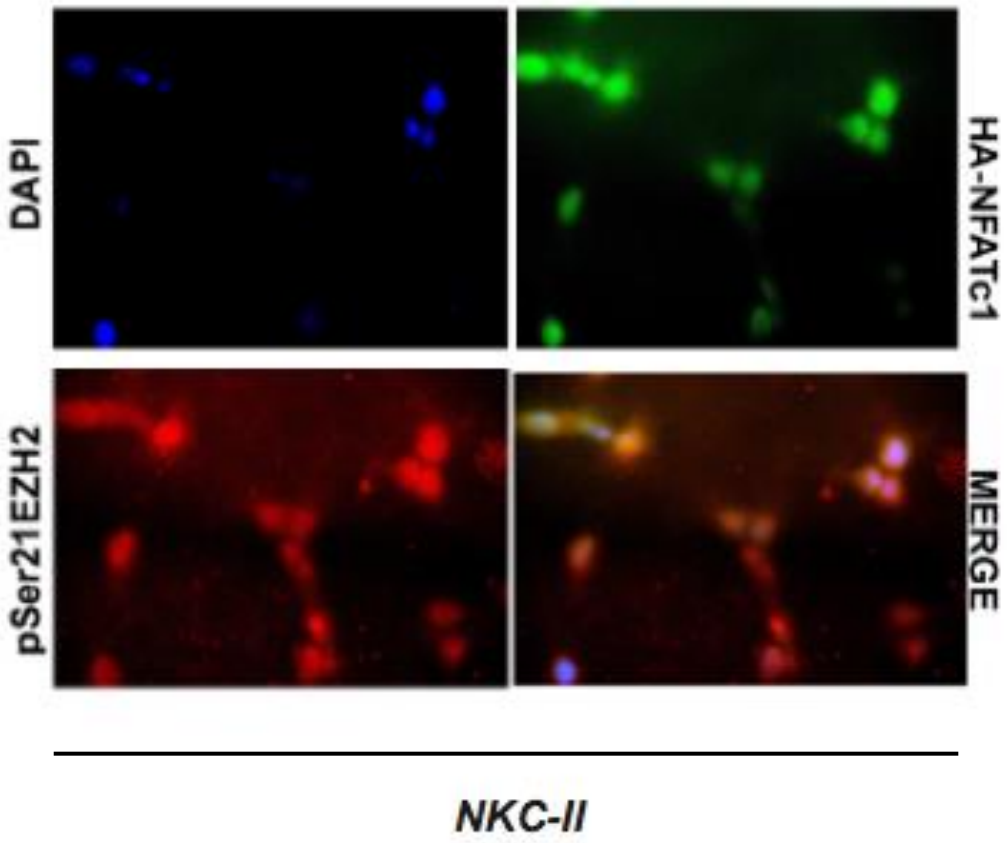


Abbildung 13: Co-Immunfluoreszenz von HA-NFATc1 und pSer21EZH2 in *NKC-II*-Zellen. Skalenbalken: 100 µm.

Ferner ließ sich eine nukleäre Co-Lokalisation von NFATc1 und pSer21EZH2 in einem Teil der Tumorzellen nachweisen, was die Hypothese einer phosphorylierungsabhängigen Komplexbildung der beiden Proteine bestärkt.

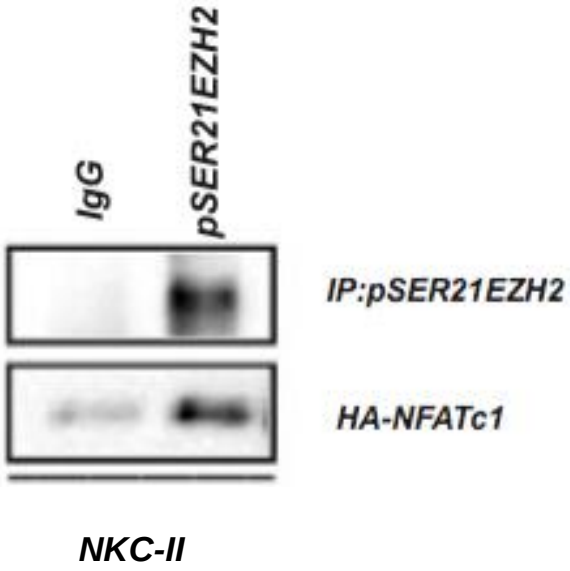


Abbildung 14: Western Blot-Analyse nach erfolgter Immunpräzipitation von pSer21EZH2 in *NKC-II*-Zellen. Zur Ladekontrolle diente IgG.

Zur Untersuchung der Einflussnahme des Phosphorylierungszustandes von EZH2 auf die Komplexbildung erfolgte die transiente Überexpression verschiedener EZH2-Konstrukte in *NKC-II*-Zellen. Diese beinhalteten entweder Wildtyp-EZH2 (EZH2wt), eine Deletion der katalytischen Domäne von EZH2(delSet) oder EZH2-Konstrukte, welche eine konstitutive Phosphorylierung des Serin-21-Restes *(*EZH2,S21D*)* imitiert oder eine unphosphorylierbare Mutante von S21 zu Alanin (EZH2*,*S21A) enthielten. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation von Myctag-EZH2 durchgeführt*.*

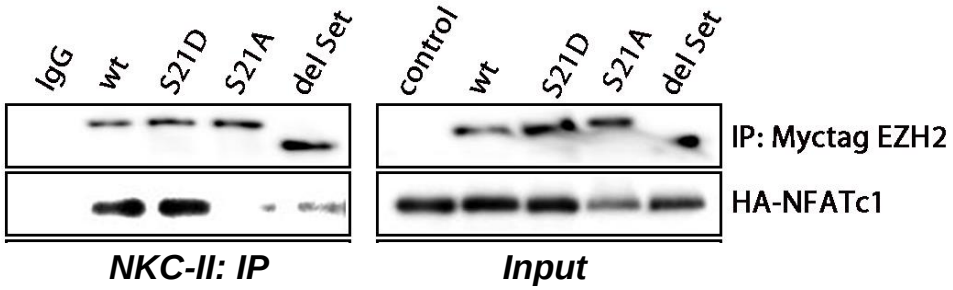


Abbildung 15: Immunpräzipitation von EZH2 nach vorheriger Transfektion verschiedener myc-markierter EZH2-Konstrukte in *NKC-II*-Zellen.
(wt: Wildtyp, *S21D:* phosphorylierungs-imitierende Mutation von Serin-21*,* S21A unphosphorylierbare Mutation von Serin-21; del Set: Deletion der katalytischen Domäne von EZH2). Als Ladekontrolle wurde IgG verwendet.

Die EZH2-Konstrukte ließen sich insgesamt gleichmäßig transfizieren. Es konnte eine Komplexbildung von NFATc1 mit Wildtyp-EZH2 und S21D-EZH2 nachgewiesen werden, während die Mutation von S21 zu Alanin zu einem Verlust der Bindung führte. Dies deutet auf die Notwendigkeit zur posttranslationalen Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 hin. Die Phosphorylierung von EZH2, die in der Regel an Serin-,Threonin- und Tyrosin- Resten erfolgt, kann durch unterschiedliche Kinasen bedingt sein (Li et al., 2020). Cha et al. zeigten die AKT- (auch bekannt als Proteinkinase B) vermittelte Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 (pSerin21-EZH2) in Brustkrebszellen.

Schmidt et al. beschrieben die Einflussnahme der *„Glykogensynthase-Kinase 3 beta“* auf die Proliferation und De-Differenzierung im Pankreaskarzinom und wiesen eine Komplexbildung von NFATc1 und GSK3ß nach. Sie zeigten, dass GSK3ß nicht nur mit Transkriptionsfaktoren wie NFATc1 interagieren kann, sondern auch mit epigenetischen Regulatoren wie der Histonmethyltransferase EZH2. Wir überprüften den Einfluss von GSK3ß auf die EZH2-Phosphorylierung und behandelten Zellen mit einem spezifischen GSK3-Inhibitor (AR-A014418).

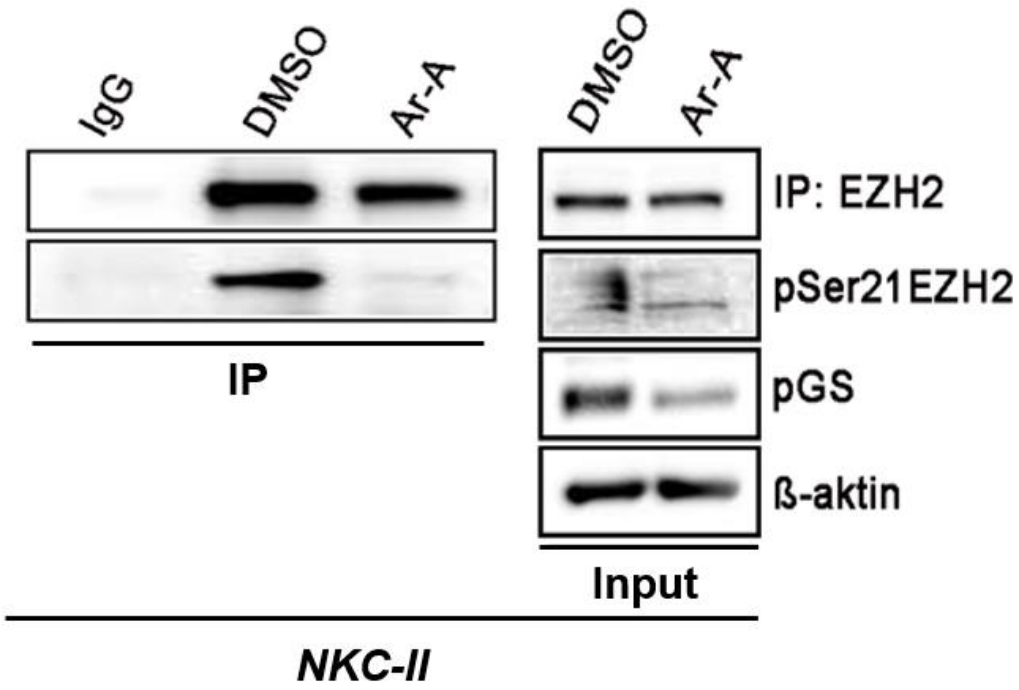


Abbildung 16: Pharmakologische Hemmung der Phosphorylierung von EZH2 mittels GSK3-Inhibitor AR-A014418 (20µM,24h). Immunpräzipitation in *NKC-II*-Zellen. DMSO,Dimethylsulfoxid.Als Ladekontrolle dienten pGS (Phospho-Glykogensynthase) und ß-actin.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse und belegt eine deutliche Reduktion der EZH2-Phosphorylierung nach Hemmung von GSK3ß. Die Behandlung nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtexpression von EZH2.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine für das Verständnis der Tumorbiologie des PDAC relevanter feedforward loop identifiziert werden, in dem der Transkriptionsfaktor NFATc1 die Histonmethyltransferase EZH2 induziert und anschließend nukleäre Komplexbildungen eingeht. Ferner konnten wir zeigen, dass EZH2 onkogene Eigenschaften besitzt, welche abhängig vom Phosphorylierungsstatus von EZH2 an Serin-21 sind. Die Phosphorylierung von EZH2 wird in Pankreaskarzinomzellen z.B. durch GSK3ß, einem bekannten onkogenen Partnerprotein von NFATc1 induziert. Unklar bleibt allerdings noch, ob die Komplexbildung zwischen NFATc1 und EZH2 durch GSK3ß-vermittelte Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 gesteuert wird und ob hierüber zentrale onkogene Funktionen des NFATc1/ EZH2-Komplexes reguliert werden.

6 Diskussion

6.1 Tumor-assoziierte Expression von EZH2

EZH2 ist eine Histonmethyltransferase, die über Regulation des Histon-3 Proteins Einfluss auf Genexpression und Chromatinstruktur ausübt. Dabei führt die Methylierung von Histon 3 an K27 zu einer EZH2-abhängigen und PRC2-vermittelten Repression spezifischer Targetgene. Zahlreiche Untersuchungen belegen ein onkogenes Potenzial von EZH2 in diversen epithelialen Tumoren und hämatologischen Malignitäten, die mit spezifischen zellulären Veränderungen, einer gesteigerten Proliferation und Ausbildung von Überlebensstrategien einhergeht. In Übereinstimmung hiermit konnte eine große Anzahl an Studien eine enge Korrelation zwischen der EZH2 Expression und der Prognose diverser Tumorerkrankungen aufzeigen (Christofides et al., 2016). Beispielsweise geht eine Überexpression von EZH2 mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung und ungünstigen Prognose bei Patient-/innen mit Brustkrebs und Prostatakarzinom einher (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). Allerdings trifft dies nicht auf kolorektale Karzinome zu, hier sind hohe EZH2 Level mit einem günstigeren Tumorverlauf und besserer Prognose assoziiert, wenngleich die zugrundeliegenden Mechanismen bislang unklar bleiben (Bremer et al., 2019).

Aus jüngsten eigenen Untersuchungen und Studien anderer Arbeitsgruppen wissen wir, dass die Induktion von EZH2 auch in Pankreaserkrankungen eine zentrale Rolle spielt und dass EZH2 über die Bindung des Polycomb-Repressor-Komplexes 2 an der transkriptionellen Repression wichtiger Zellzyklusgene beteiligt ist. In der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten wir das Expressionsmuster von EZH2 während der Karzinogenese und unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens von NFATc1, einem Calcium responsiven Transkriptionsfaktors mit großem onkogenen Potential im Pankreaskarzinom. Tatsächlich konnten wir in Vorarbeiten eine zentrale Rolle von NFATc1 sowohl in der chronischen Pankreatitis als auch in der Entstehung und Progression der K*ras*-induzierten Pankreaskarzinogenese aufzeigen. Nach azinärer Zellschädigung führt die Induktion und Aktivierung von NFATc1 zu einer massiven Zellschädigung, die mit einer Induktion duktaler Transdifferenzierungsprozesse und Freisetzung inflammatorischer Zytokine einhergeht. Für eine erfolgreiche Regeneration geschädigter Azini muss die NFATc1 Aktivierung abgeschaltet und ein azinäres Redifferenzierungsprogramm induziert werden. Im Rahmen dieser Prozesse spielt EZH2 eine zentrale Rolle, aber auch in der späteren Progression zum duktalen Karzinom.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir tatsächlich einen progredienten Anstieg der EZH2 Expression während der Pankreaskarzinogenese aufzeigen. Während in gesunden Azinuszellen und benignen Vorläuferläsionen keine oder nur gering erhöhte Expressionslevel nachzuweisen waren, konnten wir in fortgeschrittenen Läsionen und invasiven Karzinomen eine starke Induktion von EZH2 aufzeigen. Die ansteigenden Expressionslevel von EZH2 während der Karzinogenese deuten dabei auf eine onkogene Funktion der Methyltransferase auch beim Pankreaskarzinom hin.

Auf funktioneller Ebene vermittelt EZH2 v.a. reprimierende Eigenschaften, die – wie bereits ausgeführt – v.a. über Interaktion mit dem Polycomb-Repressor-Komplex 2 vermittelt werden. Interessanterweise ergeben jüngste Arbeiten ein deutlich komplexeres Bild der biochemischen und funktionellen Rolle von EZH2 in der Karzinogenese. So konnten zum einen aktivierende Funktionen von EZH2 in der Genexpression und zum anderen auch tumor-supprimierende Eigenschaften von EZH2, wie z.B. beim *KRAS*-abhängigen Adenokarzinom der Lunge nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ein Funktionsverlust von EZH2, welcher häufig durch Mutationen oder genetische Deletionen bedingt sein kann (Duan et al., 2020). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten Patil et al. 2020 im PDAC die Einflussnahme der Aktivität von EZH2 auf die Hemmung von Transkriptionsprozessen und Gensignaturen, welche die Differenzierung fördern, wodurch De-Differenzierung und Tumorprogression angetrieben werden. Zusammenfassend ergibt sich also derzeit noch kein einheitliches Bild zur Funktion von EZH2 in Tumorerkrankungen. Die Ergebnisse unserer Expressionsanalysen belegen allerdings eine positive Korrelation zwischen der Expression der Methyltransferase und der Tumorprogression beim Pankreaskrebs, was eine onkogene Funktion von EZH2 in dieser Tumorerkrankung unterstützt. Darüber hinaus konnten wir auch eine gemeinsame Expression von EZH2 und NFATc1 im PDAC nachweisen.

Eigene Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe belegen ein ausgeprägtes onkogenes Potenzial von NFATc1 im Pankreas. Dabei finden wir eine Zunahme der NFATc1 Expression während des Progresses von initialen Vorläuferläsionen bis hin zum invasiv wachsenden duktalen Karzinoms (Buchholz et al., 2006). Der von Chen et al. beschriebene Nachweis erhöhter Expressionslevel von EZH2 und NFATc1 im humanen PDAC konnte ebenfalls in den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen bestätigt werden. Dabei konnte aber nicht nur eine Co-Expression von EZH2 und NFATc1 gezeigt werden, sondern auch eine Zunahme der Expressionslevel mit Voranschreiten der Karzinogenese. Zu diskutieren ist das Ergebnis der in dieser Arbeit gezeigten Versuche einer Co-Expression von NFATc1 und EZH2 auch auf mRNA-Ebene (durchgeführt anhand von murinen und humanen epithelialen PDAC-Proben) (s. bitte

Abbildung 6). Anhand dieser epithelialen Tumoranteile konnte zwar einerseits eine gemeinsame Expression von *NFATc1* und *EZH2*-mRNA in einem Anteil der Proben gezeigt werden, allerdings korrelierte die Co-Expression in den murinen Proben statistisch nicht signifikant. Zu diskutieren wäre sicherlich eine begrenzte repräsentative Aussagekraft des Versuchs in Bezug auf die geringe Anzahl der verwendeten Proben. Zudem ließ sich nur bei den humanen Proben eine signifikante Korrelation der mRNA aufzeigen, was darauf hindeuten könnte, dass eine nicht nur mittels NFATc1 gesteuerte EZH2-Expression stattfindet, sondern weitere Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Einfluss nehmen können. NFATc1 muss in den Zellkern translozieren, um die transkriptionelle Aktivierung von EZH2 zu gewährleisten, die biochemische Interaktion von NFATc1 und EZH2 findet jedoch auf Proteinebene statt. Allerdings konnte in dieser Arbeit eine deutliche Reduktion der EZH2 Expression sowohl auf RNA- als auch Proteinebene nach erfolgtem siRNA-vermitteltem Knockdowns- oder genetischer Inhibition von NFATc1 gezeigt werden, was die Hypothese der NFATc1-abhängigen EZH2-Induktion auf Ebene der Gentranskription untermauert.

Damit postulieren unsere Ergebnisse, dass NFATc1 direkten Einfluss auf die Expression von EZH2 ausübt und dass eine gemeinsame Expression vor allem in fortgeschrittenen Tumoren der Bauchspeicheldrüsen nachweisbar ist.

6.2 Der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFATc1 auf die Histonmethyltransferase EZH2

Wie einleitend erwähnt, übt NFATc1 seine Funktionen in Bezug auf die Genregulation mit Hilfe seiner jeweiligen Bindungspartner wie beispielsweise SOX2 aus (Mancini/Toker, 2009; Singh et al. 2015). Rao et al. zeigten, dass NFATc1 seine Targetgene mittels Bindung an Promotoren und auch mittels Bindung an Enhancer des jeweiligen Targetgens steuern kann. In dieser Arbeit konnte dieses Regulationsmuster ebenfalls beobachtet werden. Es konnte eine NFATc1-Bindung an den *EZH2*-Promotor festgestellt werden. Die bereits vorbeschriebene Fähigkeit zur Bildung von Proteinkomplexen seitens NFATc1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren (Chen et al. 2015; Baumgart et al. 2014) ließ sich ebenfalls mit EZH2 vermuten, was sich anhand des Nachweises einer robusten NFATc1/EZH2-Komplexbildung mittels Immunpräzipitation (s.bitte Abb.11), sowie durch die gemeinsame Lokalisation beider Proteine im Immunfluoreszensversuch (s. bitte Abb.13) bestärken ließ. Eine erwartete gemeinsame Regulation von Transkriptionsprozessen konnte seitens Patil et al. nicht bestätigt werden, welche keine gemeinsamen direkten NFATc1/EZH2-abhängige Gensignaturen feststellen konnten.

Anzunehmen wäre daher eine Chromatin-unabhängige Funktion des NFATc1/EZH2-Komplexes, die nicht an der transkriptionellen Genregulation beteiligt ist. Interessanterweise konnten ähnliche Beobachtungen zur Funktion von EZH2, die nicht an die transkriptionelle Genregulation gebunden sind, bereits für Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren aufgezeigt werden. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass Rezeptor-vermittelte STAT3 Aktivierung die Transkription und anschließende Bindung von EZH2 stimuliert und dass dieser neu formierte Komplex anschließend Chromatin-unabhängige und PRC2-unabhängige Prozesse reguliert. Kim et al. beschrieben eine EZH2-abhängige Aktivierung von STAT3 mittels posttranslationaler Methylierung und eine Zunahme der Expression dessen Zielgene beim Glioblastoma multiforme. In der vorliegenden Arbeit konnte NFATc1 erstmalig als ein Aktivator der EZH2-Transkription und EZH2-Expression im Pankreaskarzinom detektiert werden. Interessanterweise interagiert NFATc1 auch mit STAT3, welcher an der Aktivierung onkogener Eigenschaften von EZH2 beteiligt ist (Baumgart et al., 2014). Wenngleich dieser Aspekt nicht Gegenstand dieser Promotionsarbeit war, erscheinen weitere Untersuchungen zur Regulation und Funktion dieser Komplexe im Pankreaskarzinom sinnvoll. Denkbar ist z.B. eine konkurrierende Bindung von STAT3 und NFATc1 um eine DNA-abhängige oder -unabhängige Komplexformation mit EZH2 oder auch die Bildung größerer EZH2-definierter Proteinkomplexe, in denen STAT3 und NFATc1 gleichermaßen Impulse spezifischer Signalkaskaden in eine geordnete Genregulationen übertragen.

6.3 Posttranslationale Modifikation von EZH2

Eine Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 wurde erstmalig in Brustkrebszellen gezeigt (Cha et al., 2005). Hierbei konnte eine IGF-vermittelte Aktivierung von AKT und anschließende Phosphorylierung von EZH2 nachgewiesen werden (Lu et al., 2016). Interessanterweise ist bei Kolonkarzinomen eine EZH2-abhängige Transkriptionsaktivierung zu beobachten, welche unabhängig ihrer Methyltransferasenaktivität erfolgt (Jung et al. 2013), wohingegen beim metastasiertem Prostatakarzinom die Methyltransferaseaktivität entscheidend für die aktivierenden Eigenschaften von EZH2 ist (Xu et al. 2012). Eine Relevanz der Methyltransferasenaktivität in Bezug auf die Bildung des NFATc1/EZH2-Komplexes wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch konnte eine Notwendigkeit zur posttranslationalen Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 nachgewiesen werden.

Die Notwendigkeit zur posttranslationalen Modifikation im Sinne einer Phosphorylierung an Serin-21 von EZH2 mit resultierender Interaktion mit weiteren TF konnte beispielsweise beim Glioblastom, bei welchem EZH2 mit STAT3 interagiert, ebenfalls

gezeigt werden (Kim et al., 2013). In dieser Forschungsarbeit wurde zum einen in unterschiedlichen Mausmodellen eine Co-Expression von pSer21EZH2 und NFATc1 immunhistochemisch und mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Zum anderen konnte mittels Immunpräzipitation von pSer21EZH2 eine biochemische Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden. Mittels transienter Überexpression von verschiedenen EZH2-Konstrukten konnte die Notwendigkeit zur posttranslationalen Modifikation im Sinne einer Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 gezeigt werden, indem sich eine Komplexbildung von NFATc1 und wildtyp-EZH2 sowie S21D-mutantenexprimierenden Zellen nachweisen ließ. Die im Versuch der Transfektion verschiedener EZH2-Konstrukte beschriebene Komplexbildung von NFATc1 und EZH2 konnte ebenfalls in humanen Panc1-Zellen mittels Immunpräzipitation von NFATc1 sowie in murinen *NKC-II*-Zellen mittels Immunpräzipitation von pSer21EZH2 bestätigt werden.

In Anbetracht der Ergebnisse scheint die Phosphorylierung von EZH2 beim PDAC ein Schlüsselereignis zu sein, um die Komplexbildung von EZH2 mit NFATc1 zu gewährleisten. Die an der posttranslationalen Modifikation von EZH2 beteiligte Kinase GSK3β ist bereits für ihre Beteiligung am Voranschreiten der Karzinogenese des PDAC, sowie der Stabilisierung von NFATc1 Proteinen bekannt (Baumgart et al., 2016). Dies lässt vermuten, dass EZH2 eine über Phosphorylierung getriggerte onkogene Aktivität im Rahmen des NFATc1/EZH2-Komplexes erlangt. Es ist vorstellbar, dass durch die phosphorylierungsabhängige Komplexbildung die bekannte Rekrutierung von EZH2 seitens des PRC2-Komplexes ans Chromatin gehemmt und stattdessen die Karzinogenese des PDAC vorangetrieben wird. Interessanterweise ist jedoch zu beachten, dass die Phosphorylierung von EZH2 in Bezug auf andere Krebsentitäten unterschiedliche Auswirkungen hat und ebenso der Zeitpunkt der Phosphorylierung eine Rolle spielt, was es auch beim PDAC zu bedenken gilt (Li et al., 2020). Eine Unterdrückung der Aktivität der an der posttranslationalen EZH2-Phosphorylierung bekannten beteiligten Kinase AKT konnte keinen Einfluss auf die pSer21EZH2-Expression in PDAC-Zellen zeigen (Patil et al., 2022). Schmidt et al. beschrieben hingegen die Interaktion der Kinase GSK3β sowohl mit Transkriptionsfaktoren wie NFATc1 als auch mit epigenetischen Regulatoren wie EZH2. In den Arbeiten von Ko et al. konnte eine Interaktion von GSK3β mit EZH2 im Zytosol lokalisiert werden. Von Baumgart et al. konnte eine GSK3ß-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 mit anschließender Komplexbildung mit NFATc2 detektiert werden. Hieraus resultierend konnten Karzinogenese-fördernde Kinasen wie die Cyclin-abhängige Kinase-6 (kurz: CDK-6) stimuliert sowie die NFAT-Proteinstabilität erhöht werden (Baumgart et al., 2016).

Die von Baumgart et al. beschriebene GSK3β-vermittelte Stabilisierung der NFAT DNA-Bindungsaffinität über eine Komplexbildung von NFAT mit anderen Faktoren konnte ebenfalls beim NFATc1/EZH2-Komplex festgestellt werden. Die in Abbildung 16 gezeigten Ergebnisse der Auswirkung einer pharmakologischen Hemmung mittels der Verwendung des GSK3-Inhibitors AR-A014418 zeigten einen entscheidenden Einfluss auf die Phosphorylierung von EZH2 im Sinne einer signifikanten Reduktion derer, jedoch ohne die Gesamtexpression von EZH2 bedeutend zu beeinflussen. Kunnimalaiyaan et. al konnten eine deutliche Wachstumsreduktion in Pankreaskarzinomzellen durch die Behandlung mit AR-A014418 feststellen. In Anbetracht dieser Befunde ist anzunehmen, dass eine konstitutive Aktivierung von GSK3β entscheidend für die Proteinstabilisierung und NFATc1/EZH2-Komplexbildung ist und hierüber die onkogenen Eigenschaften von EZH2 und NFATc1 kontrolliert. Diese Hypothese bedarf einer weiteren experimentellen Validierung, zumal weitere Erklärungen ebenfalls denkbar erscheinen: so könnte beispielsweise die NFATc1-Stabilität im Zellkern durch alternative pSer21EZH2-abhängige Modifikationen (wie z. B. Methylierung) von NFATc1 erhöht und konsekutiv die Translokation aus dem Zellkern verhindert werden. Zudem könnten weitere Kinasen an der Komplexbildung beteiligt sein, welche ebenfalls als Therapieansatzpunkte dienen könnten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit, welche zum molekularen Verständnis zur Entstehung und Progression des Pankreaskarzinoms beitragen, könnten Basis für weitere Therapieoptionen sein, die entweder auf eine pharmakologische Hemmung der EZH2 Expression oder deren Phosphorylierung an Serin-21 abzielen und somit die Bildung onkogener Komplexe verhindern könnten. Bei Patienten mit Nachweis einer erhöhten EZH2 Expression werden bereits EZH2–Inhibitoren eingesetzt, wie z.B. Tazemetostat bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen epitheloiden Sarkomen oder auch bei refraktären follikulären Lymphomen (Straining et al., 2022). Interessant erscheint auch ein Kombinationsansatz mit GSK3β-Inhibitoren in der Behandlung des PDAC mit gesteigerter Aktivierung beider Enzyme. Tatsächlich werden GSK3β-Inhibitoren (z.B. 9-ING41) aktuell in Kombination mit Chemotherapie in Phase 2 Studien beim Pankreaskarzinom validiert. Basierend auf unseren Ergebnissen postulieren wir, dass eine Kombination von EZH2- und GSK3β-Inhibitoren gerade bei Patienten mit hohen Expressions- und Aktivitätslevel beider Enzyme besonders wirksam sein könnte. Zukünftige experimentelle Ansätze der Arbeitsgruppe widmen sich dem translationalem Potenzial der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit und werden das therapeutische Potenzial einer gezielten Kombinationstherapie in präklinischen Modellen des Pankreaskarzinoms evaluieren.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine NFATc1-abhängige EZH2 Expression während der Pankreaskarzinogenese und belegen eine besonders hohe Expression der Histonmethyltransferase in fortgeschrittenen Karzinomen. Wir konnten ferner aufzeigen, dass EZH2 mit NFATc1 Proteinkomplexe eingeht und dass eine EZH2-Phosphorylierung an Serin-21 als Voraussetzung für eine robuste Komplexbildung mit dem Calcium-responsiven Transkriptionsfaktor dient. Die Phosphorylierung an Serin-21 erfolgt durch Signal-regulierte Kinasen, wie z.B. GSK3β, die im Pankreaskarzinom wichtige onkogene Funktionen durch Stabilisierung von NFATc1 kontrolliert. Tatsächlich konnten wir kürzlich einen neuen Subtyp des Pankreaskarzinoms nachweisen, der durch hohe nukleäre Expression von GSK3β und NFATc1 gekennzeichnet ist und mit einer ausgeprägten Therapieresistenz und einer besonders infausten Prognose assoziiert ist. Zusammen mit diesen aktuellen Erkenntnissen könnten die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit dazu beitragen, neue Therapiestrategien in der Behandlung des Pankreaskarzinoms zu entwickeln, die auf eine gezielte Hemmung von GSK3β und EZH2 und somit auf die Zerstörung zentraler onkogener Komplexe (NFATc1/ EZH2 und NFATc1/GSK3β) abzielen. Ferner wird diese Arbeit die Basis sein für weitere Untersuchungen zur Rolle von EZH2 und deren Phosphorylierung an Serin-21, insbesondere im Kontext der Transkriptions- und Chromatinregulation und in der Formation weiterer onkogener Komplexe. Dies beinhaltet auch Untersuchungen zum Einfluss weiterer Co-Faktoren (z.B. Signalkaskaden, Phosphatasen) und Signal-spezifischer Transkriptionsfaktoren (wie z.B. STAT3) auf die NFATc1/EZH2-Komplexbildung und dessen Funktion.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Die Expression der Histonmethyltransferase EZH2 nimmt mit dem Progress der Pankreaskarzinogenese zu und erreicht höchste Level in fortgeschrittenen Tumoren.

2. NFATc1 bindet spezifisch an den Promotor von *EZH2* und reguliert die EZH2-Expression im PDAC.

3. NFATc1 interagiert mit EZH2 in Pankreaskarzinomzellen. Die Komplexbildung ist dabei abhängig von Serin-21-Phosphorylierung von EZH2.

4. Eine Hemmung der Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 kann die Bildung des NFATc1/EZH2-Komplexes verhindern.

Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gilt bis heute als einer der aggressivsten soliden Tumore überhaupt. Ursachen hierfür sind das aggressive Wachstumsverhalten, die frühe Invasion und Metastasierung und die ausgeprägte Therapieresistenz. Es ist daher unerläßlich, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die das Wachstumsverhalten kontrollieren und die Resistenz auf herkömmliche Chemotherapie überwinden können.

In Vorarbeiten der AG Ellenrieder konnte der Transkriptionsfaktor „Nuclear-Factor-of-activated-T-cells“ (kurz: NFATc1) als relevantes Onkogen in der Entstehung und Progression des duktalen Pankreaskarzinoms identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde dessen Interaktion mit der Histonmethyltransferase EZH2 untersucht, welche zur katalytischen Untereinheit des PRC2-Komplexes gehört und dessen Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression stark kontextabhängig ist.

In mRNA-Seq Analysen konnten wir EZH2 als eines der am signifikantesten differenziell exprimierten NFATc1-Zielgene identifizieren. Wir stellten fest, dass NFATc1 die Genexpression von *EZH2* durch direkte Bindung an dessen Promotor induziert. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EZH2 und NFATc1 Proteinkomplexe eingehen und das diese durch posttranslationale Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 reguliert wird. Basierend auf begleitenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe und Ergebnissen anderer Forschungsgruppen postulieren wir, dass die Phosphorylierung von EZH2 an Serin-21 durch signalregulierte Kinasen wie z.B. der onkogenen Kinase GSK3β erfolgt. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass eine pharmakologische Blockade der GSK3β-vermittelten Phosphorylierung von EZH2 zu einer Störung der Bildung des NFATc1/EZH2-Komplexes führt. Der identifizierte Komplex könnte, nach weiterer funktioneller Charakterisierung seiner Rolle in der Pankreaskarzinomprogression, eine vielversprechende Zielstruktur für neue therapeutische Ansätze in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen.

Summary

To this day, pancreatic cancer is considered one of the most aggressive solid tumors of all. This is due to aggressive growth behaviour, early invasion and metastasis, and pronounced resistance to therapy. It is therefore essential to develop new therapeutic strategies that can control growth behaviour and overcome resistance to conventional chemotherapy.

In preliminary work by the Ellenrieder group, the transcription factor "nuclear factor of activated T-cells" (briefly: NFATc1) was identified as a relevant oncogene in the development and progression of pancreatic ductal carcinoma. In this thesis, its interaction with histone methyltransferase EZH2, which belongs to the catalytic subunit of the PRC2-complex and whose role in carcinogenesis and tumor progression is strongly context-dependent, was investigated.

In mRNA-seq analyses, we were able to identify EZH2 as one of the most significantly differentially expressed NFATc1 target genes. We found that NFATc1 induces gene expression of *EZH2* by binding directly to its promoter. Furthermore, it could be shown in this work that EZH2 and NFATc1 form protein complexes and that this protein is regulated by posttranslational phosphorylation of EZH2 to serine-21. Based on accompanying investigations by our research group and results from other research groups, we postulate that the phosphorylation of EZH2 to serine-21 occurs by signal-regulated kinases such as the oncogenic kinase GSK3β. Consistent with these results, it could be demonstrated that pharmacological blockade of GSK3β-mediated phosphorylation of EZH2 leads to a disruption of the formation of the NFATc1/EZH2-complex. After further functional characterization of its role in pancreatic cancer progression, the identified complex could represent a promising target structure for new therapeutic approaches in the treatment of pancreatic cancer.

Literaturverzeichnis

Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest.* 2008;118:3775–3789.

Aranda, Sergi, Gloria Mas, and Luciano Di Croce. 2015. “Regulation of Gene Transcription by Polycomb Proteins.” *Science Advances* 1(11): 1–16.

Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK, Lubeseder-Martellato C, Teichmann N, Mazur PK, Delgiorno KE, Carpenter ES, Halbrook CJ, Hall JC, Pal D,

Arnold LD, Patel AV, Yan Y, Jacobs EJ, Thun MJ, Calle EE, Colditz GA. Are racial disparities in pancreatic cancer explained by smoking and overweight/obesity? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2009

Audia, James E., and Robert M. Campbell. 2016. “Histone Modifications and Cancer.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8(4): 1–31.

Baumgart S, Chen NM, Siveke JT, Konig A, Zhang JS, Singh SK, et al.Inflammation-induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. Cancer Discov 2014;4:688–701.

Baumgart S, Glesel E, Singh G, Chen NM, Reutlinger K, Zhang J, et al.Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. Gastroenterology 2012;142:388–98.

Baumgart, S.; Ellenrieder, V.; Fernandez-Zapico, M.E. Oncogenic transcription factors: Cornerstones of inflammation-linked pancreatic carcinogenesis. *Gut* **2013**, *62*, 310–316.

Baumgart,[1,*] Nai-ming Chen,[2,*] Jin-San Zhang,[3] Daniel D. Billadeau,[3] Irina Gaisina,[4] Alan P. Kozikowski,[4]Shiv Singh,[5] Daniel Fink,[1] Philipp Ströbel,[6] Caroline Klindt,[1] Lizhi Zhang,[7] William R. Bamlet,[8] Alexander Koenig,[2]Elisabeth Hessmann,[2] Thomas Gress,[1] Volker Ellenrieder,[2] and Albrecht Neesse[2] GSK-3β governs inflammation-induced NFATc2 signaling hubs to promote pancreatic cancer progression, Mol.Cancer Ther.(2016)

Baylin SB, Jones, Epigenetic Determinants of Cancer,Cold Spring Harb Perspect Biol.(2016)

Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. Genes & development 1997;11:824-34.

Beurel E, Jope RS.Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes. Neuroscience 2010;169:1063–70.

Beurel E, Yeh WI, Michalek SM, Harrington LE, Jope RS.Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells. J Immunol 2011;186:1391–8.

Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J. 2003 Oct 15;22(20):5323-35. doi: 10.1093/emboj/cdg542. Erratum in: EMBO J. 2024 Mar;43(5):886. PMID: 14532106; PMCID: PMC213796.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal Biochem, v. 72, p. 248-54.

Bremer SCB, Conradi LC, Mechie NC, Amanzada A, Mavropoulou E, Kitz J, Ghadimi M, Ellenrieder V, Ströbel P, Hessmann E, et al. (2019): Enhancer of zeste homolog 2 in colorectal cancer development and pro- gression. Digestion 102, 227–235

Briel T, Herner A, Trajkovic-Arsic M, Sipos B, Liou GY, Storz P, Murray NR, Threadgill DW, Sibilia M, Washington MK, Wilson CL, Schmid RM, Raines EW, Crawford HC, Siveke JT. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis.Cancer Cell, 2012 Sep 11;22(3):304-17.

Brune KA, Abe T, Canto MI, O'Malley L, Klein AP, Maitra A, Adsay NV, Fishman EK, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. Am J Surg Pathol. 2006;30:1067–1076. [

Buchholz M, Ellenrieder V. An emerging role for Ca2+/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. Cell cycle (Georgetown, Tex) 2007;6:16-9.

Buchholz M, Schatz A, Wagner M*, et al.* Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca2+/calcineurin signaling pathway. The EMBO journal 2006;25:3714-24.

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G,et al.Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca^{2+}/calcineurin signaling pathway. EMBO J 2006;25:3714–24.

Cao R and Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. Molecular cell. 2004; 15:57-67.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS and Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. 2002; 298:1039-1043.

Cell. 2005 May 6

Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. Science. 2005;310:306–310.

Chang CJ, Chao CH, Xia W*, et al.* p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. Nature cell biology 2011;13:317-23.

Chang CP, Neilson JR, Bayle JH*, et al.* A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. Cell 2004;118:649-63.

Chen N, Neesse,Ellenrieder, Hessmann et al.; Context-Dependent Epigenetic Regulation of Nuclear Factor of Activated T Cells 1 in Pancreatic Plasticity, Gastroenterology 2017

Chen, N.M.; Singh, G.; Koenig, A.; Liou, G.-Y.; Storz, P.; Zhang, J.-S.; Regul, L.; Nagarajan, S.; Kühnemuth, B.; Johnsen, S.A.; et al. NFATc1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar-Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 1024–1034.e9.

Chen Y, Xie D, Yin Li W, Man Cheung C, Yao H, Chan CY, Chan CY, Xu FP, Liu YH, Sung JJ, Kung HF. RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. Cancer Lett. 2010 Nov 1;297(1):109-16. doi: 10.1016/j.canlet.2010.05.003. Epub 2010 Jun 1.PMID: 20684863

Chi Han Li[1] and Yangchao Chen Targeting EZH2 for Cancer Therapy: Progress and Perspective Curr Protein Pept Sci. 2015 Sep; 16(6): 559–570

Christofides,A.[#1,2] Theodoros Karantanos,[#1,2,3] Kankana Bardhan,[1,2] and Vassiliki A. Boussiotis, Epigenetic regulation of cancer biology and anti-tumor immunity by EZH2,Oncotarget. 2016 Dec 20; 7(51): 85624–85640.

Choo MK, Yeo H, Zayzafoon M (2009) NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone 45: 579-589.*

Collaborators GBDPC. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. Lancet. Gastroenterol Hepatol. 2019;

Costa JMD. On the morbid anatomy and symptoms of cancer of the pancreas. Philadelphia: J.B. Lippincott & Co.; 1858.

Crabtree GR, Schreiber SL (2009) SnapShot: Ca2+-calcineurin-NFAT signaling. *Cell 138: 210-210*

Dambacher, S., M. Hahn, and G. Schotta. 2010. “Epigenetic Regulation of Development by Histone Lysine Methylation.” *Heredity* 105(1): 24–37.

Damjanov I, Fan F. Cancer Grading Manual. New York: Springer; 2007.

Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Kloppel G. Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia. Virchows Arch. 2005;447:800–805.

Doble BW, Woodgett JR, GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J Cell Sci 2003

Donaldson-Collier MC, Sungalee S, Zufferey M, Tavernari D, Katanayeva N, Battistello E, Mina M, Douglass KM, Rey T, Raynaud F, Manley S, EzH2 oncogenic mutations drive epigenetic, transcriptional, and structural changes within chromatin domains. Nature genetics (2019)

Ciriello G, Oricchio E. EZH2 oncogenic mutations drive epigenetic, transcriptional, and structural changes within chromatin domains. Nat Genet. 2019 Mar;51(3):517-528.

Ducreux M, Cuhna AS, Seufferlein T, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.

Duan R, Du W, Guo W. EZH2: a novel target for cancer treatment. J Hematol Oncol. 2020

Duque J, Fresno M, Iñiguez MA (2005) Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry 280: 8686-8693.*

Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet. 2010;42:722-726.

ESMO Guidelines Committee.Ann Oncol. 2015 Sep;26 Suppl 5:v56-68. doi: 10.1093/annonc/mdv295.PMID: 26314780

Espinosa L, Ingles-Esteve J, Aguilera C, Bigas A.Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. J Biol Chem 2003;278:32227–35.

F. Bray, R. Sankila, J. Ferlay, D.M. Parkin,Estimation of cancer incidence an mortality in Europe 1995, Eur. J. Cancer 38 2002

Feber, Andrew et al. 2004. “Amplification and Overexpression of E2F3 in Human Bladder Cancer.” *Oncogene* 23(8): 1627–30.

Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983;

Fujii, S. et al. 2011. “MEK-ERK Pathway Regulates EZH2 Overexpression in Association with Aggressive Breast Cancer Subtypes.” *Oncogene* 30(39): 4118–28.

Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. Am J Pathol. 2002;160:1573–1581.

Fukushima N, Walter KM, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron JL, Hruban RH, Canto M, Yeo CJ, Goggins M. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice. Cancer Biol Ther. 2003;2:78–83. [

Gaudichon, Jérémie et al. 2014. “Deazaneplanocin a Is a Promising Drug to Kill Multiple Myeloma Cells in Their Niche.” *PLoS ONE* 9(9): 1–12.

Golbabapour S, Majid NA, Hassandarvish P, Hajrezaie M, Abdulla MA, Hadi AH. Gene silencing and Polycomb group proteins: an overview of their structure, mechanisms and phylogenetics.OMICS. 2013 Jun;17(6):283-96.

Golbabapour S. Abdulla MA. Hajrezaei M. A concise review on epigenetic regulation: Insight into molecular mechanisms. Intl J Mol Sci. 2011;12:8661–8694.

Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, He M, Li Z, Sun X, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nature genetics.* 2011

Graef IA, Chen F, Crabtree GR. NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:505–512.

H.A. Risch, H. Yu, L. Lu, M.S. Kidd, ABO blood group, Helicobacter pylori 1051 seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study, J. Natl. Cancer 1052 Inst. 102 (2010) 502–505.

Hessmann E, Ellenrieder V, Koenig A (2014) NFAT in Pancreatic Carcinogenesis. J Carcinog Mutagen 5: 203.

Hidalgo M (2010) Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine 362: 1605-1617*

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A*, et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer cell 2003;4:437-50.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS*, et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Cancer cell 2005;7:469-83.

Hoeflich [1], J Luo, E A Rubie, M S Tsao, O Jin, J R Woodgett. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. Nature 2000;406:86–90. 2076–2083.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, NFAT. *Genes & Development 17: 2205-2232*

How-Wen Ko, Heng-Huan Lee, Longfei Huo et al. GSK3β inactivation promotes the oncogenic functions of EZH2 and enhances methylation of H3K27 in human breast cancers Oncotarget. 2016 Aug 30.

Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. International journal of clinical and experimental pathology 2008;1:306-16.

Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M. Precursors to pancreatic cancer. Gastroenterology clinics of North America 2007;36:831-49, vi.

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS*, et al.* An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. The American journal of surgical pathology 2004;28:977

Hyun, Kwangbeom, Jongcheol Jeon, Kihyun Park, and Jaehoon Kim. 2017. “Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations.” *Experimental and Molecular Medicine* 49(4): 324-22.

J. Everhart, D. Wright, Diabetes mellitus as a risk factor for PC. A meta-analysis, JAMA 273 (1995) 1605–1609.

Jackson E.L. , Willis N., Mercer K., Bronson R.T. Crowley D. et al.

Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 2001;

Jung HY, Jun S, Lee M, Kim HC, Wang X, Ji H, McCrea PD, Park JI. PAF and EZH2 induce Wnt/β-catenin signaling hyperactivation. Mol Cell. 2013 Oct 24;52(2):193-205. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.028. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24055345; PMCID: PMC4040269.

Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JRGSK-3: functional insights from cell biology and animal models. Front Mol Neurosci 2011;4:40.

Kang N, Eccleston M, Clermont PL, Latarani M, Male DK, Wang Y, Crea F. EZH2 inhibition: a promising strategy to prevent cancer immune editing. Epigenomics. 2020

Ketel, C. S. et al. 2005. "Subunit Contributions to Histone Methyltransferase Activities of Fly and Worm Polycomb Group Complexes." *Molecular and Cellular Biology* 25(16): 6857–68.

Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rheey J, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Cancer Cell. 2013 Jun 10;23(6):839-52.

Kleer, Celina G. et al. 2003. "EZH2 Is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(20): 11606–11.

Klein, "Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer," Nature Reviews Cancer,vol.13, no.1,pp. 66– 74, 2013

Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021

Koenig A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V. Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) [et al] 2010a;10:416-22.

Koenig A, Linhart T, Schlengemann K*, et al.* NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. Gastroenterology 2010b;138:1189-99 e1-2.

Koenig A, Linhart T, Schlengemann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, et al.NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. Gastroenterology 2010;138:1189–99.

König A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010b) Primers on Molecular Pathways - the NFAT Transcription Pathway in Pancreatic Cancer. *Pancreatology 10: 416-422*

König A, Linhart T, Schlengelmann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, Singh G, Hofmann L, Kunsch S, Büch T, Schäfer E, Gress TM, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010a)

NFAT-induced Histone Acetylation Relay Switch promotes c- Myc-dependent growth in Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology 138: 1189- 1199*

Kouzarides Chromatin modifications and their function. *T Cell. 2007*

Kunnimalaiyaan S, Gamblin TC, Kunnimalaiyaan M. Glycogen synthase kinase-3 inhibitor AR-A014418 suppresses pancreatic cancer cell growth via inhibition of GSK-3-mediated Notch1 expression. HPB (Oxford). 2015 Sep;17(9):770-6. doi: 10.1111/hpb.12442. Epub 2015 Jul 6.

Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. Genes & development. 2002; 16:2893-2905.

L.Moore, T. Le, G. Fan, DNA Methylation and ist basic function, 2013

Laugesen A, Højfeldt JW, Helin K (2016) Role of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) in transcriptional regulation and cancer. Cold Spring Harb Perspect Med6:a026575.

Li, Z., Li, M., Wang, D. *et al.* Post-translational modifications of EZH2 in cancer. *Cell Biosci***10**, 143 (2020).

Li B, Chng WJ. EZH2 abnormalities in lymphoid malignancies: underlying mechanisms and therapeutic implications. J Hematol Oncol. 2019

Lindsay E. Moritz[‡,1] and Raymond C. Trievel[§,]Structure, mechanism, and regulation of polycomb-repressive complex 2, 2017

Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell 1991;66:807-15.

Liu J, Masuda ES, Tsuruta L, Arai N, Arai K (1999) Two independent calcineurin- binding regions in the N-terminal domain of murine NFATx1 recruit calcineurin to murine NFATx1. *Journal of Immunology 162: 4755-4761*

Lowenfels, P.Maisonneuve, G. Cavallini et al., “Pancreati- tis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group,” The New England Journal of Medicine,vol.328, pp. 1433–1437, 1993.

Lu H, Li G, Zhou C, Jin W, Qian X, Wang Z, Pan H, Jin H, Wang X. Regulation and role of post-translational modifications of enhancer of zeste homologue 2 in cancer development. Am J Cancer Res. 2016

Luo C, Shaw KT, Raghavan A*, et al.* Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996;93:8907-12.

Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology 5: 472-484*.

Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene 20: 2476-2489*

Maftouh M, Avan A, Funel N, et al. A polymorphism in the promoter is associated with EZH2 expression but not with outcome in advanced pancreatic cancer patients.Pharmacogenomics. 2014 Apr;15(5):609-18. doi: 10.2217/pgs.13.225.PMID: 24798718

Makoto Nakagawa[1,2], Issay Kitabayashi 2018 Oncogenic roles of enhancer of zeste homolog 1/2 in hematological malignancies Makoto Nakagawa[1,2], Issay Kitabayashi

Mancini M, Toker A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. Nature reviews Cancer 2009;9:810-20.

Margueron, Raphael et al. 2008. “Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms.” *Molecular Cell* 32(4): 503–18.

Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein AP, Abe T, Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo AN, Hruban RH, Goggins M. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. Cancer Res. 2005;66:1208–1217.

Matsukawa y., Semba S. et al, Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer, Cancer ScienceVolume 97, Issue 6 First published: 26 May 2006

McGrath, John, and Patrick Trojer. 2015. “Targeting Histone Lysine Methylation in Cancer.” *Pharmacology and Therapeutics* 150: 1–22.

Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. Cancer Lett. 2016;381:269–277

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell 93: 215-228*

Morgagni GB. *De Sedibus, et Causis Morborum per Anatomen Indagatis Libri Quinque*. Venetiis: Typog Remondiniana 1761.

Morin, R.D.; Johnson, N.A.; Severson, T.M.; Mungall, A.J.; An, J.; Goya, R.; Paul, J.E.; Boyle, M.; Woolcock, B.W.; Kuchenbauer, F.; et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* **2010**,

Müller, Jürg et al. 2002. “Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex.” *Cell* 111(2): 197–208.

Neureiter D., Jäger T. et al. Epigenetics and pancreatic cancer: pathophysiology and novel treatment aspects ,Gastroenterology 2014

Niki A. Ottenhof, [1] Roeland F. de Wilde, [1, 2,] Anirban Maitra, [2] Ralph H. Hruban, [2] and G. Johan A. Offerhaus [1,*] Molecular Characteristics of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patholog Res Int 2011 Mar 27

Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2010;42:665-667.

Nikorowitsch J (2016): Charakterisierung eines transgenen Mausmodells zur Kooperation zwischen NFATc1 und KrasG12D in der Pankreaskarzinogenese. Philipps-Universität Marburg, Innere Medizin.

Okamura H, Aramburu J, García-Rodríguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell 6: 539-550.*

www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html#ID0EJGAC

Ottenhof NA, de Wilde RF, Maitra A, Hruban RH, Offerhaus GJ. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. Pathology research international 2011;2011:620601.

Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DDClin Cancer Res. 2008 Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2.

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC,Chari ST, BilladeauDD, Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. Clin Cancer Res 2006;

Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD.Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. Cancer Res2005.

pancreatic cancer- a meta-analysis of 36 studies, Br. J. Cancer 92 (2005)

Partensky C. Toward a better understanding of pancreatic ductal adenocarcinoma: glimmers of hope? Pancreas 2013;42:729-39. Published online 2016 Oct 26. doi: 10.18632/oncotarget.12928

Park SH, Fong KW, Mong E, Martin MC, Schiltz GE, Yu J. Going beyond Polycomb: EZH2 functions in prostate cancer. Oncogene. 2021

Patil, S.,T.Forster,V. Ellenrieder, E. Hessman. Et al. Chromatin-Independent Interplay of NFATc1 and EZH2 in Pancreatic Cancer , *10*, 3463. https://doi.org/10.3390/cells10123463 (*Cells* 2021)

Patil S, Steuber B, Kopp W, Kari V, Urbach L, Wang X, Küffer S, Bohnenberger H, Spyropoulou D, Zhang Z, Versemann L, Bösherz MS, Brunner M, Gaedcke J, Ströbel P, Zhang JS,

Neesse A, Ellenrieder V, Singh SK, Johnsen SA, Hessmann E. EZH2 Regulates Pancreatic Cancer Subtype Identity and Tumor Progression via Transcriptional Repression of *GATA6*. Cancer Res. 2020 Nov 1;80(21):4620-4632. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0672. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32907838.

Qiubo Zhang,1 Linjuan Zeng,2 Yinting Chen,3 Guoda Lian,3 Chenchen Qian,3 Shaojie Chen,3 Jiajia Li,3 andKaihong Huang3 Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Managemen, Gaastroenterology Res.Pract.(2016)

R. Huxley, A. Moghaddam, A.B. de Gonzalez, et al., Type II diabetes and

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annual review of immunology 1997;15:707-47.

Rao ZY, Cai MY, Yang GF, He LR, Mai SJ, Hua WF, Liao YJ, Deng HX, Chen YC, Guan XY, Zeng YX, Kung HF, Xie D. EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. Carcinogenesis. 2010 Sep;31(9):1576-83. doi: 10.1093/carcin/bgq150. Epub 2010 Jul 28. PMID: 20668008.

Restricted Heterochromatin Formation Links NFATc2 Repressor Activity With Growth Promotion in Pancreatic Cancer Baumgart et al., 2012; König et al., 2010)

Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mognol GP, Viola JP. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. Molecular and cellular biology 2008;28:7168-81.

Rochefort MM, Ankeny JS, Kadera BE, et al. Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel TNMG Staging System. Annals of surgical oncology 2013.

Sauvageau, Martin, and Guy Sauvageau. 2010. “Polycomb Group Proteins: Multi- Faceted Regulators of Somatic Stem Cells and Cancer.” *Cell Stem Cell* 7

Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. Molecular cancer 2003;2:15.

Schuettengruber, Bernd et al. 2007. “Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins.” *Cell* 128(4): 735–45.

Schuettengruber, Bernd, and Giacomo Cavalli. 2009. “Recruitment of Polycomb Group Complexes and Their Role in the Dynamic Regulation of Cell Fate Choice.” *Development* 136(21): 3531–42.

Schmidt, K Reutlinger,L Augustin,E Hessmann, V Ellenrieder –GSK3ß als Regulator der Chromatinplastizität in der Pankreaskarzinomtherapie, Gastroenterology 2018

Seufferlein T, et . al. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO- ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2012;23 Suppl 7:vii33-40.

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. Science (New York, NY) 1988;241:202-5.

Shaw J, Meerovitch K, Bleackley RC, Paetkau V. Mechanisms regulating the level of IL-2 mRNA in T lymphocytes. J Immunol 1988

Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T.Aberrant glycogen synthase kinase 3beta in the development of pancreatic cancer. J Carcinog 2012;11:15.

Siegel, Miller, Jemal Cancer statistics 2019

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 73(1), 17–48. https://doi.org/10.3322/caac.21763 - DOI -PubMed

Singh SK, Chen N-M, Hessmann E, Siveke J, Lahmann M, Singh G et al. (2015): Antithetical NFATc1-Sox2 and p53-miR200 signaling networks govern pancreatic cancer cell plasticity. In: The EMBO journal. DOI: 10.15252/embj.201489574.

Singh SK, Baumgart S, Singh G, Konig AO, Reutlinger K, Hofbauer LC, et al.Disruption of a nuclear NFATc2 protein stabilization loop confers breast and pancreatic cancer growth suppression by zoledronic acid. J Biol Chem 2011;286:28761–71.

Singh, Rahul, Katie Reindl, and Rick Jansen. 2019. “Epigenomics of Pancreatic Cancer: A Critical Role for Epigenome-Wide Studies.” *Epigenomes* 3(1): 5.

Sitara D, Aliprantis AO (2010) Transcriptional regulation of bone and joint remodelling by NFAT. *Immunological Reviews 233: 286-300.*

Siveke J., Ardito C., Grüner B., et al. EGF Receptor is Required for KRAS-induced Pancreatic Tumorigenesis, Cancer Cell. (2012); 22(3): 304–317.

Siveke JT, Einwachter H, Sipos B, Lubeseder-Martellato C, Kloppel G, Schmid RM. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell.* 2007;12:266–279.

Spalding D, Williamson RCN. Pancreatic cancer. Medicine 2007;35:325-9.

Straining R, Eighmy W. Tazemetostat: EZH2 Inhibitor. J Adv Pract Oncol. 2022

Struhl,K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. 1998 Mar 1;12(5):599-606.

Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R, Viale A, Reinberg D, Wülfing C, Tarakhovsky A, Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling.*Cell. 2005 May 6; 121(3):425-36.*

Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R, Viale A, Reinberg D, Wülfing C, Tarakhovsky A , Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling.

Tan, Jing et al. 2007. “Pharmacologic Disruption of Polycomb-Repressive Complex 2- Mediated Gene Repression Selectively Induces Apoptosis in Cancer Cells.” *Genes and Development* 21(9): 1050–63.

Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, Yeo CJ, Kleer CG, Brody JR, Witkiewicz AK, Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma.*Hum Pathol. 2010*

Toriola, R.Stolzenberg-Solomon,L.Dalidowitz,D.Line- han, andG.Colditz, “Diabetes and pancreatic cancer survival: a prospective cohort-based study,” British Journal of Cancer,vol. 111, no. 1, pp. 181–185, 2014.

Torphy RJ, Fujiwara Y, Schulick RD. Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go. Surg Today. 2020 Oct;50(10):1117-1125. doi: 10.1007/s00595-020-02028-0. Epub 2020

Treviño JG,Pillai,S., Kunigal,S.,Singh,S.et al. Nicotine induces inhibitor of differentiation- 1 in a Src-dependent pathway promoting metastasis and chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma,” Neoplasia,vol.14, no.12, pp.1102–1114, 2012.

Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G EMBO J. The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *1994 Aug 15; 13(16):3822-31.*

V. Rebours, S. Gaujoux, G. d’Assignies, et al., Obesity and fatty pancreatic infiltration are risk factors for pancreatic precancerous lesions(PanIN), Clin. Cancer Res. 21 (2015) 3522–3528.

van Mierlo, G., Gert Jan C. Veenstra, Michiel Vermeulen, and Hendrik Marks. 2019. “The Complexity of PRC2 Subcomplexes.” *Trends in Cell Biology* 29(8): 660–71.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature. 2002

Vogt S (2016): Mechanismus der NFATc1-abhängigen Regulation von Stammzelleigenschaften im Pankreaskarzinom. Philipps-Universität Marburg, Innere Medizin.

Völkel, Pamela, Barbara Dupret, Xuefen Le Bourhis, and Pierre Olivier Angrand. 2015. “Diverse Involvement of EZH2 in Cancer Epigenetics.” *American Journal of Translational Research* 7(2): 175–93.

Wang L, Xie D, Wei D. Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. Methods Mol Biol. 2019;1882:299-308. doi: 10.1007/978-1-4939-8879-2_26. PMID: 30378064.

Wasif N, Ko CY, Farrell J*, et al.* Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? Annals of surgical oncology 2010;17:2312-20.

Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin. 2013 Sep;63(5):318-48. doi: 10.3322/caac.21190. Epub 2013 Jul 15.

www.onkopedia.com/de/onkopedia/archive/guidelines/pankreaskarzinom/version-19092023T095831/@@guideline/html/index.html

Xanthoudakis S., et al. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science.* 1996;**272**:892–895. doi: 10.1126/science.272.5263.892.

Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb- independent. Science 2012;338:1465–1469.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2012;481:157-163.

Zhang Q, Zeng L, et al. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management, Gastroenterol Res Pract. 2016;2016:8962321. doi: 10.1155/2016/8962321. Epub 2016 Jan 28.

Zhang JS, Herreros-Vilanueva M, Koenig A, Deng Z, de Narvajas AA, Gomez TS, et al.Differential activity of GSK-3 isoforms regulates NF-kappaB and TRAIL- or TNFalpha induced apoptosis in pancreatic cancer cells. Cell Death Dis2014;5:e1142.

Zhang JS, Koenig A, Harrison A, Ugolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Couch FJ, et al. Mutant K-Ras increases GSK-3beta gene expression via an ETS-p300 transcriptional complex in pancreatic cancer. Oncogene 2011;30:3705–15.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Teresa Luise Cecilia Christine Forster

(der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen verändert)

Ärztliche Weiterbildung:

2018- 12/2019:	Assistenzärztin in der Inneren Klinik I des Karl-Olga-Krankenhaus Stuttgart, unter der Leitung von Dr. W. Heinz
2020- 2024:	Assistenz- und Fachärztin für Innere Medizin der Medizinischen Klinik des Diakonieklinikums Stuttgart, unter der Leitung von Prof. Dr.med. J. Greiner
04/2024:	Oberärztin der Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie des Diakonieklinikums Stuttgart

Universitätsausbildung

02/2018	Approbation als Ärztin
11/2017	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2016	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2013	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2010	Studium der Humanmedizin
-11/2017	an der Philipps-Universität Marburg

Publikationen:

1. ”*Context-Dependent Epigenetic Regulation of Nuclear Factor of Activated T Cells in Pancreatic Plasticity”* (N.Chen, E.Hessmann, V.Ellenrieder, T.Winter, T.Forster et al.- Gastroenterology Volume 152, Issue 6 2017)
2. ”*NFATc1 cooperation with EZH2 hastens oncogenic activity in pancreatic cancer”* (E.Hessmann,F.Becker, T.Forster, N.Chen,A.Neese, V.Ellenrieder – Pancreatology, Volume 14, Issue 3, 2014)
3. “*Chromatin-Independent Interplay of NFATc1 and EZH2 in Pancreatic cancer”* (S. Patil, T.Forster,K.Reutlinger,W.Kopp,P.Ströbel, S.Singh, V.Ellenrieder, A.Neese, E. Hessmann) – Cells 2021 Dec;10(12)

Schulische Ausbildung

2000-2009:	Evangelisches Heidehofgymnasium Stuttgart
Abschluss:	Abitur

Ort, Datum: Unterschrift:

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Ahrens, Barth, Bartsch, Bauer, Baumann, Becker, Berger,Bösner, Bohlander, Brehm, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dodel, Donner-Banzhoff, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Fendrich, Feuser, Frohme, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geldner, Görg C., Gress, Grimm, Grosse, Grundmann, Haberhausen, Hadji, Hegele, Hertl, Hildebrandt, , Hofmann, Hoyer, Jacob, Jerrentrup, Kalder, Kann,Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klenk, Klose, Kluge, Köhler, König, Kolb-Niemann, Koolman, Kruse, Kühne, Kühnert, Kwee, Leonhardt, Leube, Lill, Löffler, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisch, Meissner, Metzelder, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neese, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Plant, Ramaswamy, Rausch, Renz, Rey del, Richter, Röhm, Röper, Röttgers, Roeßler, Rolfes, Rosenow, Rost, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schoner, Schratt, Schu, Schwarz, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Stiewe, Stiller, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Thieme, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Weiß, Werner, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zettl, Zovko

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder danken, welcher mich bereits bei unserem ersten Gespräch (mit einem mir aufgrund meiner Heimat sehr bekanntem leichtem schwäbischem Akzent) mit seiner Begeisterung an der Forschung am Pankreaskarzinom im positiven Sinne ansteckte. Ich bin dankbar, dass ich im Gebiet der Pankreaskarzinomforschung arbeiten durfte und möchte mich sehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe voller engagierter, lieber Menschen bedanken. Sein Wissen, sowie seine Erfahrung im Betreuen von Doktorarbeiten und vor allem seine motivierende Art ermöglichten nicht nur eine produktive, sondern auch eine richtig schöne Zeit, an die ich mich immer sehr gerne zurückerinnere. Ebenso möchte ich mich von Herzen für die weitere Betreuung selbst nach seinem Ruf nach Göttingen, sowie für das Verständnis für die Verzögerung meiner Dissertation bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Elisabeth Hessmann für ihr großes Engagement sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors bedanken. Dies erachte ich nicht als selbstverständlich und bin daher sehr dankbar, ihr begegnet zu sein. Ohne ihre aufwändigen Vorschläge, ihr offenes Ohr und ihre Zusammenarbeit, wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Sie ist für mich eine Inspiration und Vorbild.

Die Zeit im Labor wurde auch von all den guten Seelen wie Bettina, Kristina und Sarah geprägt, welche immer hilfsbereit waren und mich voller Geduld und Humor begleitet haben. Ebenso möchte ich mich bei all meinen Mitdoktoranden, insbesondere Dr.med. Sophia Vogt für ihre Unterstützung bedanken. Eine besonders wichtige Rolle gilt Thore Winter, welcher nicht nur zur dieser AG, sondern auch zu meiner Familie und Freunden zählt. Ohne ihn hätte ich weder diese Arbeitsgruppe gefunden, noch wäre dies zu einer Art „Arbeitszuhause“ für mich geworden.

Besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde, welche meinen Lebensweg möglich gemacht und mich durch sämtliche Phasen meines Lebens immer liebe-und verständnisvoll begleitet haben.
Vor allem auch Dank an meinen Papa Dr. med. Klaus Forster, welcher mir so manches Mal einen humorvollen Push in Richtung Vollendung meiner Dissertation gab.
Ohne Eurer aller bedingungsloser Unterstützung wäre mir dies nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Thomas Gress für die Zustimmung und Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung an der Universität Marburg.
Abschließend möchte ich mich bei all den Mitarbeitern der Universität Marburg bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt und diese möglich gemacht haben.