

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors CREB für die onkogene Transformation

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn André Steven

geb. am 22.06.1981 in Essen

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Ralph Golbik, Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie und Biotechnologie
2. Prof. Dr. rer. nat. Barbara Seliger, Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Medizinische Immunologie
3. Prof. Dr. med. Carsten Denkert, Charité Berlin, Institut für Pathologie

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.10.2016

Übersicht über die Publikationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen:

1. Recktenwald CV, Leisz S, Steven A, Mimura K, Müller A, Wulfänger J, Kiessling R, Seliger B. HER-2/neu-mediated down-regulation of biglycan associated with altered growth properties. *J Biol Chem.* 2012 Jul 13;287(29):24320-9. doi: 10.1074/jbc.M111.334425. Epub 2012 May 11. PUBMED-ID: 22582394
Umfassendes Kapitel: 3.3
2. Steven A, Leisz S, Massa C, Iezzi M, Lattanzio R, Lamolinara A, Bukur J, Müller A, Hiebl B, Holzhausen HJ, Seliger B. HER-2/neu mediates oncogenic transformation via altered CREB expression and function. *Mol Cancer Res.* 2013 Nov;11(11):1462-77. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0125. Epub 2013 Sep 11. PUBMED-ID: 24025972
Umfassende Kapitel: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4
3. Steven A, Heiduk M, Recktenwald CV, Hiebl B, Wickenhauser C, Massa C, Seliger B. Colorectal Carcinogenesis: Connecting K-RAS-Induced Transformation and CREB Activity In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Res.* 2015 Aug;13(8):1248-62. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0590. Epub 2015 May 1. PUBMED-ID: 25934695
Umfassende Kapitel: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4
4. Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget.* 2016 (a) Jun 7;7(23):35454-65. doi: 10.18632/oncotarget.7721. PMID: 26934558, Review.
Umfassende Kapitel: 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.8
5. Steven A, Leisz S, Sychra K, Hiebl B, Wickenhauser C, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Hypoxia-mediated alterations and their role in the HER-2-neu-regulated CREB status and localization. *Oncotarget.* 2016 (b) Aug 9;7(32):52061-52084. doi: 10.18632/oncotarget.10474. PMID: 27409833.
Umfassende Kapitel: 3.4, 3.5, 4.5
6. Steven A, Leisz S, Wickenhauser C, Rahn J, Schulz, K, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Role of CREB in the HER-2/neu-mediated changes of the metabolism. *Oncotarget* 2016 (c) unter Begutachtung.
Umfassende Kapitel: 3.6, 3.7, 4.6, 4.7
7. Steven A, Mixdorf, T, Stoppe S, Rahn J, Seliger B. „CREB as a putative target in H-Ras and K-Ras mutated cancer.“ (Arbeitstitel) Manuskript in Vorbereitung.
Umfassende Kapitel: 3.1, 3.2, 3.3

„Es gibt eine Theorie, die besagt, wenn jemals irgendwer genau rausfindet, wozu das Universum da ist und warum es da ist, dann verschwindet es auf der Stelle und wird durch etwas noch Bizarrereres und Unbegreiflicheres ersetzt...“

... Es gibt eine andere Theorie, nach der das schon passiert ist.“
Douglas Adams, „Das Restaurant am Ende des Universums“

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die (Proto-)Onkogene Ras und HER-2/neu.....	1
1.1.1 HER-2/neu.....	1
1.1.2 Ras.....	3
1.2 Der Transkriptionsfaktor CREB.....	5
1.3 Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.....	10
2. Methoden.....	11
2.1 Methoden der Zellkultur.....	11
2.1.1 Zellkultivierung und Passagieren.....	11
2.1.2 Zelllinienasservierung durch Kryokonservierung.....	11
2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität.....	12
2.1.4 Kultivierung unter Hypoxie.....	12
2.1.5 Kultivierung auf Matrigel- oder Poly-HEMA-beschichtetem Material.....	12
2.1.6 Transfektion von murinen Fibroblasten.....	12
2.2 Methoden der Mikrobiologie.....	13
2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien.....	13
2.2.2 Transformation und Kultivierung von kompetenten Bakterien.....	14
2.2.3 Asservierung von kompetenten Bakterien.....	14
2.3 Methoden der Molekularbiologie.....	14
2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Material.....	14
2.3.1.1 Isolierung von DNA und RNA aus Zellmaterial.....	14
2.3.1.2 Isolierung von RNA aus Tumormaterial nach Chomczynski und Sacchi (1987).....	15
2.3.1.3 Isolierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus Bakterien.....	15
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	16

2.3.3	Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren.....	16
2.3.4	cDNA-Synthese.....	16
2.3.5	Polymerasekettenreaktion.....	17
2.3.5.1	Taq-Polymerasekettenreaktion.....	17
2.3.5.2	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	17
2.3.6	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	18
2.3.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	18
2.3.8	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	18
2.3.9	Ligation von Nukleinsäuren.....	19
2.3.10	Bestimmung der Matrixmetalloproteinase-2- (MMP-2-) und MMP-9-Promotor-Aktivität.....	19
2.3.11	Ortsspezifische Mutagenese.....	20
2.3.12	Elektrophorese-Mobilitätsshift-Assay (EMSA).....	21
2.3.13	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	22
2.3.14	DNA-Sequenzierung.....	23
2.3.15	Pyrosequenzierung.....	23
2.4	Methoden der Proteinbiochemie.....	23
2.4.1	Präparation von Gesamtzellextrakten.....	23
2.4.2	Präparation von Kernproteinextrakten, Membran- und Zytoplasmaproteinextrakten.....	24
2.4.3	Präparation und Subfraktionierung von Mitochondrien (nach Wieckowski et al., 2009).....	24
2.4.4	Proteinase K-Assay.....	25
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	25
2.4.5.1	Bestimmung mittels Bradford-Methode.....	25
2.4.5.2	Bestimmung mittels BCA-Methode.....	25
2.4.6	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	25
2.4.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.4.6.2	Zymographie zur Aktivitätsbestimmung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	26
2.4.6.3	Blau-native PAGE (nach Schägger und von Jagow, 1991).....	27
2.4.7	Western-Blot (WB) und Immunnachweis von Proteinen.....	27

2.4.8	Zweidimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE).....	29
2.4.8.1	Probenaufarbeitung.....	29
2.4.8.2	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	29
2.4.8.3	Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	30
2.4.9	Gelfärbungen.....	31
2.4.9.1	Kolloidale Coomassie-Färbung (modifiziert nach Neuhoff et al., 1988)...	31
2.4.9.2	Alcianblau-Färbung (modifiziert nach Møller und Poulsen, 2002).....	31
2.4.9.3	Katalase-Färbung (nach Weydert und Cullen, 2010).....	31
2.4.9.4	Mitochondriale In Gel Aktivitäts-Färbungen (nach Robles-Martinez et al., 2013).....	32
2.4.10	Aktiver Ras- <i>Pull-down</i> -Test.....	32
2.4.11	Ubiquitin- <i>Pull-down</i> -Test zum Nachweis von ubiquitinierten CREB.....	32
2.4.12	Immunpräzipitation (IP) von CREB und Nachweis von SUMO-CREB bzw. ubiquitinierten CREB.....	33
2.4.13	Bestimmung der Aktivität der Protein Kinase A (PKA).....	33
2.5	Methoden der Durchflusszytometrie.....	34
2.5.1	Apoptosebestimmung durch AnnexinV-Propidiumiodid-Färbung (Rieger et al., 2011).....	34
2.5.2	Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung.....	34
2.5.3	Bestimmung der Proliferation mittels Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)-Färbung.....	34
2.5.4	Zellzyklusanalyse durch Bestimmung der DNA-Menge.....	35
2.5.5	Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern.....	35
2.5.6	Bestimmung der individuellen CREB-Expression bei Einzelzellen in einer Gesamtkultur.....	36
2.5.7	Analyse des Mitochondrienpotentials.....	36
2.5.8	Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und der mitochondrialen Masse.....	36
2.5.9	Analyse von murinen Blutproben auf den Immunstatus.....	37
2.5.10	Zellsortierung mittels Zellsorter.....	37
2.5.11	Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	37
2.5.12	Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	37

2.6	Methoden der Zellbiologie.....	37
2.6.1	Bestimmung der Zellproliferation.....	37
2.6.2	Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums.....	38
2.6.3	Bestimmung der Focusbildung.....	38
2.6.4	Bestimmung des Migrations- und Invasionspotentials.....	39
2.6.4.1	Bestimmung des Migrationspotentials.....	39
2.6.4.2	Bestimmung des Invasionspotentials (nach Albin et al., 1987).....	39
2.6.5	Bestimmung des Wundheilungsvermögens.....	39
2.6.6	Bestimmung des Matrix-Kontraktionspotentials (nach Pins et al., 2000).....	40
2.6.7	Bestimmung des Matrix-Adhäsionsvermögens (nach Chambers et al., 1993).....	40
2.6.8	Bestimmung des Zell-Zell-Adhäsionsvermögens.....	40
2.6.9	Bestimmung der Glukoseaufnahme (O'Neil et al., 2005).....	40
2.6.10	Bestimmung der Zytotoxizität durch Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung.....	41
2.6.11	Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität.....	41
2.6.12	Bestimmung der <i>in vitro</i> -Angiogenese.....	41
2.6.13	Bestimmung der Zellseneszenz.....	41
2.6.14	Bestimmung der mitochondrialen Atmungskaskade und der Glykolyse.....	42
2.7	Methoden im Tiermodell.....	42
2.7.1	Bestimmung des Tumorstadiums.....	42
2.7.2	Bildgebende Verfahren.....	43
2.7.3	Bestimmung der <i>in vivo</i> Angiogenese-Kapazität durch Matrigel-Plug-Untersuchung.....	43
2.8	Methoden der Histologie und Immunhistochemie.....	43
2.8.1	Fixierung von histologischen Proben und Einbettung in Paraffin.....	43
2.8.2	Histologische Färbungen.....	44
2.8.3	Immunhistochemische Färbungen.....	44
2.9	Methoden der Bioanalytik.....	45
2.9.1	Bestimmung von Metabolismen.....	45
2.9.1.1	Bestimmung von Laktat.....	45

Inhaltsverzeichnis		-V-
2.9.1.2	Bestimmung von Pyruvat.....	45
2.9.1.3	Bestimmung von Citrat.....	46
2.9.1.4	Bestimmung von cAMP.....	46
2.9.2	Identifizierung von Proteinen mittels <i>Peptidmassenfingerprint</i> durch MALDI-TOF-MS.....	46
2.9.3	Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (Grabowski et al., 2012).....	46
2.9.4	Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration (GSH) (Recktenwald, 2009).....	47
2.9.5	Bestimmung der extrazellulären MMP-2-Konzentration.....	47
2.9.6	Bestimmung der extrazellulären Glykosaminoglykankonzentration (nach Frazier et al., 2008).....	48
2.9.7	Bestimmung des extrazellulären Kohlenhydratgehalts	48
2.9.8	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in aus Mäusen entnommenen Matrigel-Plugs.....	48
2.9.9	Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten in Zellen.....	49
2.9.9.1	Bestimmung der PTEN-Aktivität in Zelllysaten (modifiziert nach Das et al., 2003).....	49
2.9.9.2	Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität in Zelllysaten (nach Tietz und Ochoa, 1958).....	49
2.9.9.3	Bestimmung der Aktivität der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette.....	49
2.9.10	Bestimmung der extrazellulären H ₂ O ₂ -Konzentration.....	50
2.9.11	Bestimmung der Prenylierungsmuster der Ras-Proteine (nach Casey et al., 1989).....	50
2.10	Methoden der Fluoreszenzmikroskopie.....	50
2.10.1	Apoptosenachweis durch Acridinorange-Ethidiumbromidfärbung.....	50
2.10.2	Lokalisierung von CREB mittels Immunzytochemie (ICC).....	50
2.10.3	Anfärbung von Mitochondrien in Kombination mit der Immunzytochemie.....	51
2.11	Methoden der klinischen Überlebenszeitanalyse.....	51
2.12	Methoden der statistischen Auswertung.....	51
3.	Ergebnisse.....	52
3.1	Expression und Aktivität von CREB in humanen und murinen Zellen.....	52
3.1.1	Expression und Aktivität von CREB in murinen <i>in vitro</i> Modellsystemen onkogener Transformation.....	52

3.1.2	Expression von CREB in humanen Tumorzelllinien und Tumorerläsionen.....	53
3.2	Einfluss von Signaltransduktions- und RTK-Inhibitoren auf die CREB-Aktivität.....	55
3.2.1	Strategien, um die CREB-Aktivität und Expression zu beeinflussen.....	55
3.2.2	Inhibitoren modulieren die Aktivität von CREB.....	56
3.2.3	Funktionelle Analyse des KID/KIX-Inhibitors KG-501.....	59
3.3	Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in der onkogenen Transformation muriner Zellen.....	61
3.3.1	Etablierung eines CREB- <i>Knock-down</i> Systems.....	61
3.3.2	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die Proliferation der Zelllinien.....	62
3.3.3	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die Überlebensfähigkeit der Zelllinien.....	64
3.3.4	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die Morphologie und die Migration der Zelllinien.....	67
3.3.5	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die Invasivität.....	68
3.3.6	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die Zell-Zell-Interaktion.....	72
3.3.7	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf den <i>Immunescape</i>	76
3.4	Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in <i>in vivo</i> -Experimenten.....	77
3.4.1	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die <i>in vivo</i> -Tumorigenität.....	77
3.4.2	Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf die <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Angiogenese.....	80
3.5	Einfluss des Tumormikromilieus auf die CREB-Aktivität.....	82
3.5.1	Einfluss von Hypoxie auf die CREB-Aktivität.....	82
3.5.2	Einfluss von ROS auf die CREB-Aktivität.....	95
3.6	Untersuchungen des CREB regulierten Proteoms in murinen Onkogen-transformierten Fibroblasten.....	97
3.7	Tumormetabolismus und CREB.....	99
4.	Diskussion.....	103
4.1	Expression und Aktivität von CREB in humanen und murinen Tumorzellen.....	103
4.2	Einfluss von Signaltransduktions- und RTK-Inhibitoren auf die CREB-Aktivität.....	104
4.3	Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in der onkogenen Transformation muriner Zellen.....	109
4.4	Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in <i>in vivo</i> -Experimenten.....	114

4.5 Einfluss des Tumormikromilieus auf die CREB-Aktivität.....	115
4.6 CREB-beeinflusstes Transkriptom und Proteom.....	119
4.7 Rolle des CREB für Tumormetabolismus und seine Folgen.....	122
4.8 CREB als therapeutische Zielstruktur für die Behandlung von Tumoren?.....	123
5. Ausblick.....	128
6. Zusammenfassung.....	129
7. Literaturverzeichnis.....	130
Eigenständigkeitserklärung.....	155
Danksagungen.....	156
Lebenslauf.....	158
Publikationsverzeichnis.....	159
Anhang.....	160
I. Verwendete Materialien.....	160
II. Standardprotokolle.....	178
III. Einzelfärbungen der Immunzytochemie.....	179
IV. Kontrollexperimente mit den <i>Rescue</i> -Klonen.....	180
V. DNA-Bindemotive von bZIP-Transkriptionsfaktoren (JASPAR-Datenbank).....	181
VI. Patientendaten.....	183
VII. Kaplan-Meier-Überlebenskurven (erstellt mit KMplot.com).....	185

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Domänen und Dimerisierung der EGF-Rezeptoren	2
Abbildung 1.2:	EGF-R-Familie kann Ras aktivieren	4
Abbildung 1.3:	Domänenstruktur von CREB.....	7
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der untersuchten murinen MMP-2- und 9-Promotoren.....	20
Abbildung 2.2:	Nukleotidsequenzen der untersuchten MMP-9 Halb-CRE-Elemente.....	21
Abbildung 2.3:	Vergleich der 3' nicht-kodierenden mRNA-Sequenz von murinen CREB-1 mit der daran bindenden shRNA-Sequenz des CREB- <i>Knock-down</i> -Konstruktes und der nicht-targetierbaren Form des shCREB-del2-Konstruktes (<i>Rescue</i>).....	21
Abbildung 2.4:	Flussschema der Mitochondriensubfraktionierung.....	24
Abbildung 2.5:	Darstellung des Weichagarwachstums.....	38
Abbildung 2.6:	Anordnung für die Untersuchung des Migrationspotentials.....	39
Abbildung 3.1:	Expression von CREB in murinen Modellsystemen nach onkogener Transformation.....	52
Abbildung 3.2:	Phosphorylierungsstatus von CREB in Kolonkarzinom- und Brustkrebszelllinien.....	54
Abbildung 3.3:	Korrelation der Expression von CREB mit Onkogenen bei Tumorläsionen aus humanen Patientenproben.....	55
Abbildung 3.4:	Strategien, CREB-Aktivität zu beeinflussen (verändert nach Xiao. et al.)....	56
Abbildung 3.5:	Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die CREB-Aktivität im HER-2/neu-Modellsystem.....	57
Abbildung 3.6:	Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die CREB-Aktivität im Ras-Modellsystem.....	58
Abbildung 3.7:	Hemmung der Interaktion von CREB und CBP durch KG-501.....	60
Abbildung 3.8:	Hemmung der Interaktion von CREB und CBP beeinflusst Wachstumseigenschaften.....	60
Abbildung 3.9:	Etablierung von CREB-defizienten Zelllinien.....	61
Abbildung 3.10:	Unveränderte Expression CREB-verwandter Gene sowie der Onkogene nach CREB- <i>Knock-down</i>	62
Abbildung 3.11:	Verringerte Proliferation und erhöhte Generationszeit nach CREB- <i>Knock-down</i>	63
Abbildung 3.12:	Deregulation des Zellzyklus durch Verlust mehrerer Cycline nach CREB- <i>Knock-down</i>	64

Abbildung 3.13:	Erhöhte Apoptose in murinen Fibroblasten bei CREB- <i>Knock-down</i>	65
Abbildung 3.14:	Apoptoseinduktion durch den Verlust der Expression verschiedener anti-apoptotischer Gene sowie durch Aktivierung von Caspase-3.....	66
Abbildung 3.15:	Revertierung der Morphologie der Onkogen-transformierten Zellen bei CREB- <i>Knock-down</i>	67
Abbildung 3.16:	Eingeschränkte Migration durch CREB- <i>Knock-down</i> in allen Zellen.....	68
Abbildung 3.17:	Verringerte Invasion durch Matrigel bei CREB-defizienten Zellen.....	69
Abbildung 3.18:	Positive Regulation der MMP-mRNA-Expression und MMP-Aktivität (in den Kulturüberständen) durch CREB.....	70
Abbildung 3.19:	Putative CREB-Bindestellen in den Promotorregionen der murinen MMP-2 und 9-Gene.....	71
Abbildung 3.20:	Beeinflussung der Ausbildung der extrazellulären Matrix durch CREB.....	73
Abbildung 3.21:	Steuerung von Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion durch CREB.....	74
Abbildung 3.22:	Begünstigung des Wachstums der Zellen auf Matrices durch CREB.....	75
Abbildung 3.23:	Erhöhte Präsentation von MHC-Klasse I-Komponenten nach CREB- <i>Knock-down</i>	76
Abbildung 3.24:	Verringerte <i>in vivo</i> -Tumorigenität nach CREB- <i>Knock-down</i>	78
Abbildung 3.25:	Verstärkte Apoptose und verringerte Proliferation bei CREB-Mangel im Tumorgewebe.....	79
Abbildung 3.26:	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Organe und des Tumorgewebes.....	80
Abbildung 3.27:	Schlechtere Angiogenese und Auftreten von Hypoxie in Tumorgewebe nach CREB- <i>Knock-down</i>	81
Abbildung 3.28:	Beeinflussung der CREB-Phosphorylierung unter Hypoxie.....	83
Abbildung 3.29:	Hypoxie-verursachte Modifikation von CREB.....	84
Abbildung 3.30:	Hypoxie-vermittelte Ubiquitinierung und SUMOylierung von CREB.....	85
Abbildung 3.31:	Verstärkte mitochondriale Lokalisierung von CREB unter Hypoxie.....	87
Abbildung 3.32:	Nukleäre Herkunft des mitochondrialen CREB.....	87
Abbildung 3.33:	CREB wird unter Hypoxie in die Mitochondrien-Matrix transportiert und beeinflusst dort die Mitochondrien-Aktivität.....	89
Abbildung 3.34:	Verstärkte CREB-Bindung unter Hypoxie an den D-LOOP der mitochondrialen DNA.....	90
Abbildung 3.35:	CREB beeinflusst die mitochondriale Biogenese und den Abbau dysfunktionaler Mitochondrien.....	91

Abbildung 3.36:	Auswirkungen mitochondrialer Dysfunktionen auf das Überleben der Zellen.....	92
Abbildung 3.37:	Mediierte Veränderungen des Tumormikromilieus durch Hypoxie.....	93
Abbildung 3.38:	Gesteigerte Migration und Invasion unter Hypoxie.....	94
Abbildung 3.39:	Induktion von CREB-Aktivität durch H ₂ O ₂ und ROS.....	95
Abbildung 3.40:	Initiierung von Detoxifikationsmechanismen durch CREB.....	96
Abbildung 3.41:	Repräsentatives 2D-Gel mit ausgewählten, differentiell exprimierten Proteinen nach CREB- <i>Knock-down</i>	97
Abbildung 3.42:	Validierung der differenziell regulierten Proteine und ihrer Aktivitäten.....	99
Abbildung 3.43:	Beeinflussung des Zell-Metabolismus nach CREB- <i>Knock-down</i> down.....	100
Abbildung 3.44:	Verändertes Ansprechen von CREB- <i>Knock-down</i> -Zellen auf Serumentzug.	101
Abbildung 3.45:	Verlangsamte Aufnahme von Glukose nach CREB- <i>Knock-down</i>	102
Abbildung 3.46:	Wachstum von murinen Zelllinien in FKS-reduziertem Mangelmedium.....	102
Abbildung 4.1:	Unterschiedliche CREB-ansteuernde Signaltransduktionswege in Onkogen-transformierten Zelllinien.....	105
Abbildung 4.2:	Beeinflussung der Ras-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen....	108
Abbildung 4.3:	Übersicht über die Onkogen-regulierten Merkmale von Tumorzellen am Beispiel der <i>Hallmarks of Cancer</i>	109
Abbildung 4.4:	Beeinflussung von Qualität und Quantität der MHC-Klasse I-Präsentation durch Komponenten der APM.....	114
Abbildung 4.5:	Zusammenfassende Übersicht über die Prozesse von CREB unter Hypoxie.	118
Abbildung 4.6:	Heterodimerisierung von bZIP-Transkriptionsfaktoren und ihre Bindung an DNA-Sequenzmotiven.....	121
Abbildung 4.7:	Zusammenfassende Übersicht über die veränderten metabolischen Prozesse bei CREB-Defizienz und Einflüsse auf das Tumormikromilieu unter Berücksichtigung der Laktat-Sekretion.....	122
Abbildung 4.8:	Regulation der CREB-Expression und Aktivität und Bedeutung von CREB für die Karzinogenese.....	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über die Serinseitenketten in der KID und die bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen.....	8
Tabelle 1.2: Verbreitung einer erhöhten CREB-Expression oder Aktivität in verschiedenen Karzinomen.....	9
Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	26
Tabelle 2.2: Arbeitsschritte der Immundetektion.....	28
Tabelle 2.3: Suchparameter für die MASCOT-Datenbank.....	46
Tabelle 2.4: Arbeitsschritte der Immunzytochemie.....	51
Tabelle 3.1: Blutuntersuchungen zeigen veränderte Immunreaktion bei CREB-Defizienz auf Tumorentwicklung an.....	79
Tabelle 3.2: Beurteilung der histologischen Schnitte in Abb. 3.26B von HER-2/neu ⁺ und CREB-defizienten Tumoren nach der Blutgefäßdichte sowie nekrotischen und hypoxischen Flächen.....	80
Tabelle 3.3: Einfluss des CREB- <i>Knock-down</i> auf Angiogenesemarker und Oberflächenmarker.....	81
Tabelle 3.4: Mehrfach identifizierte, in CREB-defizienten Zellen regulierte Proteine.....	98
Tabelle 3.5: mRNA-Expression von differentiell exprimierten Proteinen nach CREB- <i>Knock-down</i>	99
Tabelle 4.1: Einteilung der in der qPCR untersuchten Gene bzw. der in der 2D-PAGE differentiell exprimiert gefundenen Proteine hinsichtlich der Regulation durch putative CREB-Bindestellen.....	120
Tabelle 4.2: Übersicht über die CREB-regulierten Merkmale von Tumorzellen.....	124
Tabelle 4.3: Einfluss der erhöhten CREB-Expression auf das Überleben von Krebspatienten.....	126

Abkürzungsverzeichnis

2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglukose
A. bidest. /A. dest.	Zweifach destilliertes Wasser / destilliertes Wasser
AIF1	<i>Apoptosis inducing factor 1</i>
AML	Akute Myeloische Leukämie
AnnV	AnnexinV
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF-1	Aktivierender Transkriptionsfaktor 1
BCA	Bicinchoninsäure
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-Carboxyfluorescein
BrdU	Bromo-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	Basischer Leucin-Zipper
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidyl-ester
ChIP	Chromatin-Immünpräzipitation
CRE	<i>cAMP-response-Element</i>
CREB	<i>CyclicAMP-response-Element-Binding Protein</i>
CREM	CRE-Modulator
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEM	<i>Eagle's minimal essential Medium</i>
EMSA	Elektrophorese-Mobilitätsshift-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EZAR	extrazelluläre Ansäuerungsrate
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
FT	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
GAG	Glykosaminoglykane
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gbr2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GDP	Guanidinnukleotiddiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktoren
GGT	Geranylgeranyltransferase
GGTI	Geranylgeranyltransferase-Inhibitor
GSH	Glutathion
GTP	Guanidinnukleotidtriphosphat
HAS	Hyaluronsäuresynthasen
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HER-2/neu	humaner epidermaler (Wachstumsfaktor-)Rezeptor 2 / Neuroblastoma
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H-Ras ^{V12}	Harvey-Ras (G12V-Mutation)

HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (humane Nabelschnurzellen)
ICC	Immunzytochemie
IE	<i>immediate early</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanin-iodid
KID	Kinase-induzierbare Domäne
KIX	KID-interagierenden Domäne
K-Ras ^{V12}	Kirsten-Ras (G12V-Mutation)
LDH	Laktatdehydrogenase
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeitmassenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen/Extrazellulär Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinasen
Min.	Minute(n)
miR	mikroRNA
MSK-1	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase-1
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NC	<i>Nonsense</i> Kontrolle
nHi	nicht Hitze-inaktiviert
n.s.	nicht signifikant ($P > 0,05$)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pCREB	Phosphoryliertes CREB
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PPARGC1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PTMs	posttranslationale Modifikationen
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
Ras	Ratten Sarkom
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Memorial Park Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
Shc	<i>SHC-transforming protein 1</i>
shCREB	<i>short hairpin RNA</i> gegen murines CREB 1
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SOS	<i>Son of sevenless homolog</i>
Std.	Stunde(n)
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related modifier</i>
SVR	Sauerstoffverbrauchsrate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TUBES	<i>Tandem Ubiquitin Binding Entities</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	<i>Western-Blot</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
XTT	Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzensulfonsäure

Nicht übersetzte englischsprachige Begriffe werden *kursiv* dargestellt.

1. Einleitung

1.1 Die (Proto-)Onkogene Ras und HER-2/neu

Krebserkrankungen sind in den westlichen Industrieländern nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache (Destatis, Statistisches Bundesamt, 2015). Risikofaktoren für Tumorerkrankungen, wie die Belastung mit krebserregenden Substanzen, Inhalation von Tabakrauch oder Feinstäuben sowie häufige Exposition mit UV-Strahlung, konnten durch verbesserten Umwelt- bzw. Arbeitsschutz und medizinische Aufklärung eingedämmt werden. Seit den 1980er Jahren wurden vermehrt die molekularen Ursachen der Tumorentstehung beschrieben, die neben den oben angeführten Risikofaktoren auch durch genetische Vorbelastung bedingt werden können. Die Krebsentstehung ist dabei u.a. mit der Aktivierung von Onkogenen bzw. der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gekoppelt. Als (Proto-)Onkogene wurden dabei u.a. der membranständige Rezeptor HER-2/neu und das kleine G-Protein Ras identifiziert.

1.1.1 HER-2/neu

Molekulare Struktur und Aktivität

HER-2/neu (humaner epidermaler Rezeptor 2), auch als erbB2 oder neu (Neuroblastoma) bezeichnet, ist ein 185 kDa großer membranständiger Rezeptor der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R)-Familie. Der Rezeptor geht eine Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit anderen EGF-R-Mitgliedern (HER-1, HER-3, HER-4) ein, welche durch die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne initiiert wird (Rubin und Yarden, 2001). Bislang sind keine Liganden für HER-2/neu bekannt. Im Gegensatz dazu können verschiedene Wachstumsfaktoren, wie u.a. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Heregulin oder der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- α , an HER-1, HER-3 und HER-4 binden, was zur Aktivierung des Rezeptors durch Autophosphorylierung von Tyrosinseitenketten führt. HER-3 ist dabei nicht zur Autophosphorylierung befähigt (Abb. 1.1). Durch das Vorliegen der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität werden die Mitglieder der EGF-R-Familie zu den Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gezählt.

Je nach Kombination der EGF-R-Dimere können dabei verschiedene Signaltransduktionswege induziert werden, die auch unterschiedliche Aktivitäten besitzen und verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen. So induziert der HER-2/HER-3-Heterodimerkomplex zum Beispiel am stärksten die Zellproliferation (Pinkas-Kramarski et al., 1996). Generell gelten Heterodimere mit HER-2 als potenter für die Signalweiterleitung als die Homodimere von HER-1, HER-4 und HER-3, wobei letzteres keine Signale transduziert (Yarden und Sliwkowski, 2001). Die Phosphorylierung von EGF-R kann weitere Faktoren wie *SHC-transforming protein 1* (Shc), *Growth factor receptor-bound protein 2* (Gbr2) und *Son of sevenless homolog* (SOS) rekrutieren. Dadurch kann die EGF-R-Familie u.a. den PI3K-AKT- und den Ras-MEK-ERK-Signalweg steuern.

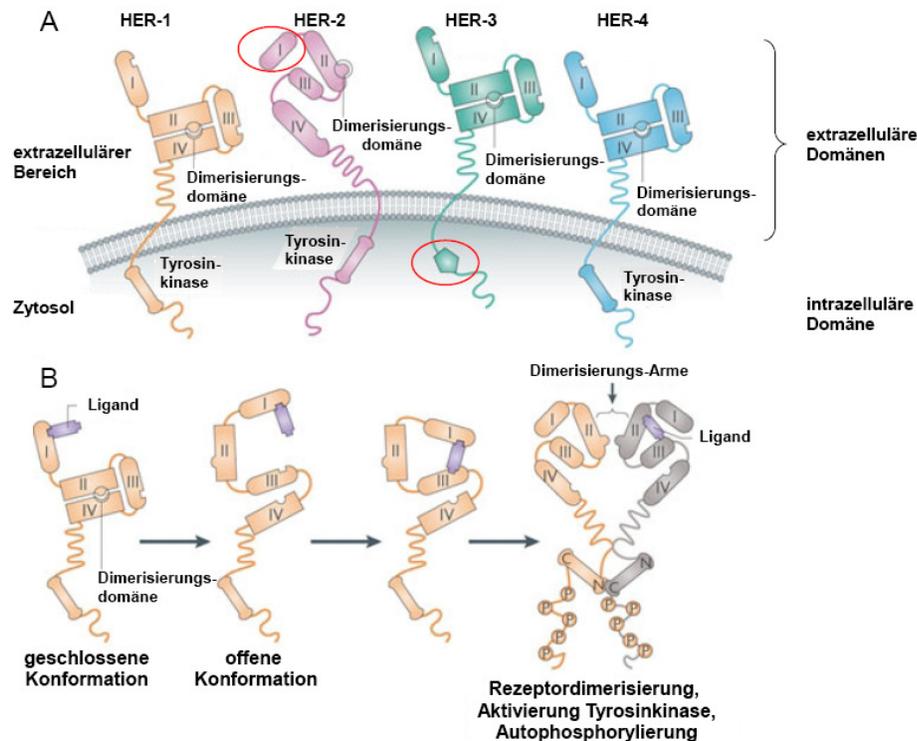


Abbildung 1.1: Domänen und Dimerisierung der EGF-Rezeptoren. A. Die Domänen der HER-Familie sind dargestellt. Extrazelluläre Domänen umfassen die Ligandenbindetasche und die Dimerisierungsstelle, während der zyttoplasmatische Teil die Tyrosinkinasedomäne und die Phosphorylierungsseiten enthält. Bei HER-2/neu fehlt die Ligandenbindetasche, während bei HER-3 keine Tyrosinkinaseaktivität festgestellt werden konnte (rot umkreiste Domänen). B. Im nicht aktiven Zustand liegen die EGF-Rezeptoren (bspw. HER-1) in einer geschlossenen Form vor. Nach Bindung eines Liganden öffnet sich die Form, die Dimerisierungsdomäne wird frei verfügbar und kann mit einem anderen Homomer bzw. Heteromer den dimeren Komplex bilden. Es erfolgt eine Autophosphorylierung der Tyrosinseitenketten, wodurch die Signalweiterleitung initiiert wird (Quelle: verändert nach Baselga und Swain, 2009).

Bedeutung von HER-2/neu für die onkogene Transformation

Amplifikation bzw. Überexpression von HER-2/neu wurden in verschiedenen Tumorerkrankungen gefunden, wobei die Frequenz dieser Alterationen abhängig von der Tumorentität variiert. So wurde beispielhaft in 20 – 30 % der Mammakarzinome (Slamon et al., 1987; Owens et al., 2004), 36 % der Urothelkarzinome (Alexa et al., 2010; Hansel et al., 2008) und 6 % der Kolonkarzinome (Khelwatty et al., 2014; Seo et al., 2014) eine Amplifikation und/oder Überexpression von HER-2/neu beschrieben. Die Überexpression von HER-2/neu korreliert dabei mit der Tumorprogression, die sich in einer schlechteren Prognose und einer verringerten Überlebensrate der Patienten widerspiegelt (Seliger und Kiessling, 2013; Whelan et al., 2013). In *in vitro* Modellen HER-2/neu-vermittelter Transformation von murinen NIH3T3-Fibroblasten wurde eine erhöhte Proliferation, Migration, Invasion, Bildung von Foci als Kennzeichen des mehrlagigen Wachstums, die Fähigkeit, verankerungsunabhängig in Weichagar Kolonien zu formen, sowie Tumorbildung nachgewiesen (di Fiore et al., 1987; Hudziak et al., 1987). HER-2/neu fördert außerdem die Blutgefäßneubildung (Angiogenese) (Beckers et al., 2005), wobei in einem Mausmodell die angiogenese- und tumorfördernde Wirkung von HER-2/neu *in vivo* dargestellt werden konnte (Schiffer et al., 2003).

Des Weiteren ist HER-2/neu an wichtigen physiologischen Prozessen, wie z.B. Differenzierung, Zellzyklus und Überleben der Zellen beteiligt.

HER-2/neu als Therapieziel

Die EGF-R-Familie stellt wegen ihrer Korrelation mit dem Überleben der Patienten ein vielversprechendes Therapieziel dar. Dabei bieten sich im Wesentlichen zwei Therapieansätze an, welche auf die verschiedenen Domänen der Rezeptoren zielen (Baselga und Swain, 2009): Einerseits kann die Bindung eines Liganden oder die Dimerisierung der Rezeptoren untereinander durch spezifische Inhibitoren verhindert werden. Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab bindet bspw. an die Dimerisierungsdomäne von HER-2/neu, unterbindet die Signalweiterleitung und markiert HER-2/neu⁺-Zellen zusätzlich für die Immunantwort (Baselga und Swain, 2009). Trastuzumab ist von den europäischen und amerikanischen Gesundheitsbehörden für die Behandlung von Brustkrebs freigegeben worden und wird als Standardtherapie für die Behandlung von HER-2/neu⁺ metastasierenden Mammakarzinomen sowie post-operativ als adjuvante Therapie dieser Erkrankung eingesetzt (Garrett und Artega, 2011). Pertuzumab unterdrückt ebenfalls die Signalweiterleitung durch Hemmung der Dimerisierung (Zagouri et al., 2013). Pertuzumab befindet sich im Moment in der klinischen Phase III. Andererseits kann die Tyrosinkinase-Aktivität der intrazellulären Domäne gehemmt werden. Dazu wurde der duale RTK-Inhibitor Lapatinib gegen EGF-R und HER-2/neu entwickelt und für die Anwendung bei progredienten Brustkrebs nach Trastuzumab-Therapie freigegeben (Medina und Goodin, 2008; Kim et al., 2008 (a)). Nicht alle Patienten sprechen dabei gut auf die Therapie an: Es sind bei der Anwendung auch Resistenzmechanismen zu beobachten, welche einen Therapieansatz erschweren oder gänzlich unmöglich machen (D'Amato et al., 2015; Lavaud und Andre, 2014). Daher werden weiterhin alternative Ziele für kleine Wirkstoffmoleküle (*small molecule inhibitors*) gesucht, welche in Kombination mit den oben genannten monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab verabreicht werden können (Schroeder et al., 2014).

Auch in *in vitro*-Zellkultur-Modellen zeigten die Inhibitoren eine Wirkung bei HER-2/neu⁺ Zelllinien. So führte die Inkubation von nichtkleinzelligen Lungenkrebszelllinien mit Trastuzumab zu einer gesteigerten Apoptose und erhöhte den oxidativen Stress (Dogan et al., 2011).

1.1.2 Ras

Molekulare Struktur und Aktivität

Ras-Proteine (*Rat sarcoma*) sind eine Familie von kleinen GTP-bindenden Proteinen mit einem Molekulargewicht von 21 kDa und dienen als molekulare Schalter in der Signaltransduktion. Insgesamt sind mehrere Ras-Gene im Menschen identifiziert worden, die u.a. nach den Homologen in murinen Sarkom-Viren auch als H-Ras (Harvey Sarkoma Virus) und K-Ras (Kirsten Sarkoma

Virus) bezeichnet werden (Chang et al., 1982; Parada et al., 1982). Durch alternatives Spleißen entstehen im K-Ras-Gen zwei Proteine: K-Ras4A und K-Ras4B. Sie haben mit den anderen beschriebenen humanen Ras-Proteinen H-Ras und N-Ras eine Homologie von 85 %.

Im aktivierten Zustand liegt Ras in einer Bindung mit GTP vor, das durch intrinsische GTPase-Aktivität des Ras zu GDP umgewandelt werden kann, wodurch Ras inaktiviert wird (Sweet et al., 1984). Eine Aktivierung kann in diesem Zustand durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) erfolgen, zu welchen auch SOS1 gezählt wird. Daher ist auch eine Auswirkung von HER-2/neu auf die Ras-Expression möglich (Abb. 1.2).

Die Inaktivierung von Ras wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) gesteuert, die die intrinsische Aktivität der GTPase um den Faktor 300 erhöhen können (Trahey und McCormick, 1987).

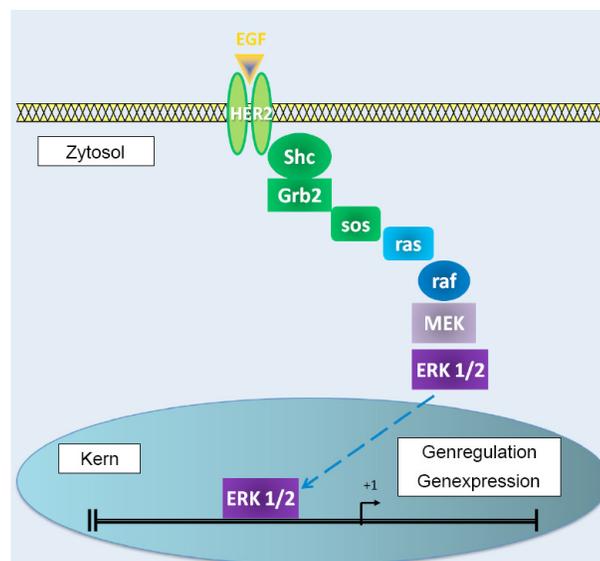


Abbildung 1.2: EGF-R-Familie kann Ras aktivieren. EGF-R werden durch Ligandenbindung aktiviert, welche daraufhin Shc und Grb2 rekrutieren. SOS ist ein GEF, der die GTP-Bindung an Ras steuert. Aktiviertes Ras kann Raf-Kinasen aktivieren und dadurch den MEK-ERK1/2-Signaltransduktionsweg steuern. Ras kann des Weiteren auch den PI3K-AKT-Weg regulieren (Quelle: verändert nach Altieri et al., 2012).

Bedeutung von Ras für die onkogene Transformation

Ras konnte schon in den frühen 1980iger Jahren als Protoonkogen identifiziert werden, da die Expression der Homologe von H-Ras und K-Ras in murinen NIH3T3-Zellen zu einem Onkogen-transformierten Phänotyp führt (Der et al., 1982; Recktenwald et al., 2007; Recktenwald et al., 2008; Voice et al., 1999). Dabei sind hauptsächlich drei Mechanismen beschrieben, die für die transformierenden Eigenschaften von Ras verantwortlich sind:

(i) Es kann durch verstärkte Genamplifikation eine erhöhte Expression der Ras-Proteine auftreten. Überexpression von H-Ras im murinen NIH3T3-System erhöhte bspw. dessen Tumorigenität (Pulciani et al., 1985). Eine Überexpression von K-Ras bei Endometriumkarzinomen korrelierte mit der Ausbildung von Metastasen und einem verringerten Überleben (Birkeland et al., 2012).

(ii) Die GAP können inaktiviert oder deletiert werden. Bei der Neurofibromatose Typ 1 liegt eine Mutation des NF1-Gens vor, bei der die GAP-Aktivität verloren geht und in der Folge durch eine unkontrollierte Ras-Raf-MEK-Kaskade eine gesteigerte Zellproliferation ausgelöst wird, was zu einer Manifestation von Tumoren des Nervensystems führt (Ratner und Miller, 2015).

(iii) Es kann durch Punktmutationen in dem Ras-Gen zu einer dominant positiven Form des Ras-Proteins kommen, die keine intrinsische GTPase-Aktivität mehr aufweist und daher unabhängig von äußeren Signalen aktiv ist. Hierbei ist vor allem ein Aminosäureaustausch an den Positionen 12, 13 und 61 nachweisbar (G12V ist bspw. der Glycin-Valin-Austausch an 12) was in etwa 20 % aller menschlichen Tumore auftritt. Diese Wahrscheinlichkeit ist beim Adenokarzinom der Pankreas, des Kolons und der Lunge sowie bei myeloiden Erkrankungen am höchsten (Bos, 1989). Generell sind Mutationen von K-Ras sehr häufig bei Pankreaskarzinom (57 %), Kolonkarzinom (35 %) und Tumoren des Gallengangs (23 %) verbreitet, während Mutationen von H-Ras weitaus seltener vorkommen und bei Harnblasenkarzinom noch am häufigsten sind (11 %) (COSMIC Datenbank, Forbes et al., 2008). Da das K-Ras Gen für zwei Isoformen mit anderen Eigenschaften kodiert, könnte dies das gehäufte Auftreten von K-Ras-Mutationen bei Tumorerkrankungen erklären (Voice et al., 1999). Es sind jedoch auch inaktivierende Punktmutationen bei K-Ras beschrieben worden (Oliva et al., 2004).

Ras als Therapieziel

Neben der Aktivierung von Ras durch GEF ist auch die Membranlokalisierung von Ras bedeutend für die Signalweiterleitung: Posttranslationale Modifikation mit einem Farnesylrest, welcher durch eine Farnesyltransferase (FT) übertragen werden kann, erlaubt die Verankerung von Ras an der Innenseite der Zytoplasmamembran. Dies ist ein möglicher Angriffspunkt einer Therapie bei verändertem Ras-Status: Inhibitoren der FT können die Verankerung hemmen und so zu einem Abbruch der Signaltransduktionswege führen (Kim et al., 2010). Der Inhibitor Tipifarnib hemmt so durch Inaktivierung der FT1 die Farnesylierung von H-Ras und wird als therapeutischer Ansatz bei Akuter Myeloischer Leukämie (AML) verwendet (Tsimberidou et al., 2010). K-Ras geht nach Verlust der Farnesylierung eine Geranyl-Geranylierung ein, welche ebenfalls die Signalweiterleitung ermöglicht (Whyte et al., 1997), was Inhibitoren von FT bei K-Ras-Mutationen oft sinnlos macht.

1.2 Der Transkriptionsfaktor CREB

Aktivierete Onkogene führen zu Veränderungen von zellphysiologischen Eigenschaften, wie Morphologie, Proliferation, Invasivität und Angiogenese. Bei diesen Prozessen spielen Transkriptionsfaktoren (TF), die extrazelluläre Signale integrieren und Gentranskription regulieren, eine zentrale Rolle (Darnell, 2002). Deshalb stellen diese auch innovative Zielstrukturen für Krebstherapien dar.

Charakteristika des Transkriptionsfaktors CREB

Das *cyclic AMP (cAMP)-response element (CRE) binding protein 1* (CREB-1, im Folgenden als CREB bezeichnet) ist ein 43 kDa Stimulus-induzierter Transkriptionsfaktor, der für die Transkription einer Vielzahl von *immediate early* (IE) Genen benötigt wird. Da die genomweite Kartierung der CREB-Bindungsstellen mehr als 4.000 Gene identifizierte, die putativ mit CREB assoziiert sind, wird davon ausgegangen, dass CREB nicht nur an der Regulation von IE-Genen beteiligt ist (Zhang et al., 2005).

CREB besitzt mehrere Domänen, die die Funktion und Interaktion von CREB ermöglichen (Abb. 1.3) (Shaywitz und Greenberg, 1999). An den Serinseitenketten der Kinase-induzierbaren Domäne (KID) wird CREB durch Kinasen der Signaltransduktionswege phosphoryliert. Besondere Bedeutung hat dabei das Serin an Position 133 (Ser¹³³), welches u.a. durch die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (PKB, im Folgenden als AKT bezeichnet), die Mitogen-aktivierte Kinase (MAPK) und durch die Mitogen- und Stress-regulierte Kinase (MSK1) phosphoryliert werden kann (Johannessen et al., 2004). Weitere mögliche Serinseitenketten wie Ser¹²¹ und Ser¹⁴² können ebenfalls durch spezielle Kinasen phosphoryliert werden (Gonzalez et al., 1989; Johannessen et al., 2004; Johannessen und Moens, 2007) und sind mit ihren bisher beschriebenen Funktionen in Tab. 1.1 zusammen gefasst. Fast alle Arbeiten in Bezug auf CREB beschränken sich jedoch auf die Bedeutung von Ser¹³³, auch weil für manche Seitenketten keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen. Die einzelnen Phosphorylierungsstellen können sich dabei gegenseitig beeinflussen (Fiol et al., 1994). Das phosphorylierte CREB (pCREB) interagiert in dem sich bildenden Transkriptionskomplex mit verschiedenen Transkriptionskoaktivatoren, wie mit dem CREB-Bindungsprotein (CBP), einer Histonacetyltransferase (HAT). Diese Interaktion erfolgt seitens CBP mit der KID-interagierenden Domäne (KIX), die an die phosphorylierte KID des CREB bindet (Thakur et al., 2014). Allerdings können auch andere Transkriptionsfaktoren wie c-jun mit CBP interagieren, die jedoch an unterschiedlichen Stellen der KIX binden (Campbell und Lumb, 2002). CREB kann durch verschiedene Phosphatasen, wie PTEN, inaktiviert werden (Gu et al., 2011), wobei diese Untersuchungen sich ebenfalls nur auf Ser¹³³ beschränken.

Da die DNA-Bindung von CREB durch die basische und Leucin-reiche Domäne am C-Terminus erfolgt, wird CREB zu den basischen Leucinzipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren gezählt (Yun et al., 1990). Das zu bindende DNA-Element wird als cAMP-reaktives Element (CRE) bezeichnet. Dabei wird die in der Erstbeschreibung von CREB ermittelte CRE-Sequenz des Somatostatins TGACGTCA als idealisiertes Bindemotiv angenommen (Montminy und Bilezikjian, 1987). Jedoch sind auch kürzere Halb-CRE-Sequenzen wie TGACG oder Variationen der 8 Bp-Motivs bekannt (Everett et al., 2013). Zur CRE-Sequenz TGACGTCA besteht aber die höchste Bindungsaffinität (Williams et al., 1993). Die Phosphorylierung von CREB kann dabei die Bindungsaffinität zu

verschiedenen CRE-Sequenzen beeinflussen (Nichols et al., 1992). Für die Bindung von CREB sind Mg^{2+} Ionen begünstigend (Schumacher et al., 2000). Der bZIP enthält auch die Kernlokalisierungssequenz (NLS), eine Abfolge von positiv geladenen Aminosäuren, meist Lysinen, und ermöglicht CREB durch Importin- β 1-Bindung den Kernimport (Forwood et al., 2001). Weiterhin sind zwei glutaminreiche Domänen Q1 und Q2 vorhanden, wobei Q2 der Interaktion mit den Bestandteilen der RNA-Polymerase II (u.a. TFIIB und TAF130) dient, die wiederum an eine TATA-Box binden können (Xing et al., 1995). Die Q1-Domäne am N-Terminus reguliert ebenfalls die transkriptionelle Aktivität (Quinn, 1993).

CREB bindet als dimerer Komplex an die CRE-Sequenz, wobei die Dimerisierung über den bZIP erfolgt und nach der Phosphorylierung stattfindet (Yun et al., 1990; Wu et al., 1998). Es können dabei mit CREB selbst Homodimere ausgebildet werden oder mit den verwandten Transkriptionsfaktoren Aktivierender Transkriptionsfaktor 1 (ATF-1) und dem CRE-Modulator (CREM) Heterodimere (Herdegen und Leah, 1998; Vlahopoulos et al., 2008). Die CREB-Homodimere sind wesentlich stabiler als die anderen Kombinationen (Shaywitz und Greenberg, 1999). Da manchen CREM-Isoformen die KID fehlt, sind sie vermutlich an der negativen Regulation von CREB beteiligt (Mouravlev et al., 2007). Die Q1-Domäne fehlt bei ATF-1, was seine geringere transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu CREB erklären könnte.

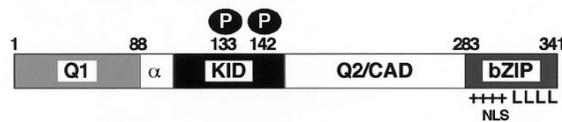


Abbildung 1.3: Domänenstruktur von CREB. Die einzelnen Domänen des größten, 341 Aminosäure-langen CREB-Proteins sind hinsichtlich der Aminosäurepositionen dargestellt. Q1 und Q2 = Glutamin-reiche Domänen, α = Peptid-Exon, welches bei der Δ -Isoform (327 Aminosäuren lang) fehlt, KID = Kinase-induzierbare Domäne, bZIP = basische Leucinzipper-Domäne. Angegeben sind die Positionen der Aminosäurereste und die Serinseitenketten 133 und 142 als mögliche Phosphorylierungsstellen. ++++ kennzeichnet die positiv geladene Region des bZIP, welche der NLS entspricht. LLLL ist die Leucin-reiche Region (Quelle: Shaywitz und Greenberg, 1999).

Der CREB/CBP-Komplex rekrutiert die Transkriptionsmaschinerie an den jeweiligen Genpromotor, um die CREB-abhängige Gentranskription zu initiieren (Shaywitz und Greenberg, 1999). CREB gilt als genereller transkriptioneller Aktivator, wobei der CREB-Komplex die Histon H3- und H4-Methylierungsspiegel hochreguliert, was für die Initiation und Aufrechterhaltung der Zugänglichkeit von Chromatin zum Transkriptionsapparat verantwortlich ist (Wang et al., 2013).

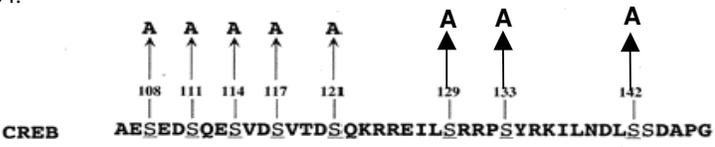
Abhängig von seiner zellulären Lokalisation und dem Zeit-abhängigen Phosphorylierungsmuster, welches durch cAMP (Ser¹³³)- bzw. Ca²⁺ (Ser¹⁴²)-induzierte Aktivierungskaskaden vermittelt wird, kann CREB eine Vielzahl von zellulären Prozessen regulieren (Finkbeiner 2000; Mayr und Montminy 2001; Melnikova et al., 2010; Wen et al., 2010). Dazu gehören Zellproliferation, Zellzyklus, Metabolismus, DNA-Reparatur, Apoptose, Differenzierung, Entzündung, Angiogenese sowie Immunantwort.

Regulation der CREB-Expression und -Funktion

Die Expression und Aktivität von CREB wird über verschiedene Mechanismen kontrolliert. Neben seiner transkriptionellen Kontrolle wurde eine posttranskriptionelle Regulation von CREB über microRNAs (miRs) beschrieben (Huang et al., 2014; Liu et al., 2013; Pigazzi et al., 2013; Tan et al., 2012 (a)). Außerdem wird CREB posttranslational durch verschiedene extrazelluläre Signalwege und das Mikromilieu (Hypoxie, oxidativer Stress) kontrolliert (Ahmed et al., 2013), wobei die bisher am besten untersuchten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von CREB Phosphorylierung und Ubiquitinierung darstellen.

Die Phosphorylierung von CREB kann an verschiedenen Serinseitenketten erfolgen. Dabei wurde bisher die Phosphorylierung an Ser¹³³ und seine funktionellen Konsequenzen am besten untersucht. Diese führt zu Konformationsveränderungen des Proteins, was mit einer veränderten Proteinaktivität, Lokalisation und/oder Stabilität gekoppelt sein kann. Jedoch befinden sich in der KID-Domäne weitere Serinseitenketten, die ebenfalls phosphoryliert werden können. Diese sind in der Literatur aber wenig beschrieben. Eine Zusammenfassung der putativen Seitenketten und den bisherigen Wissenstand befindet sich in Tab. 1.1.

Tabelle 1.1: Übersicht über die Serinseitenketten in der KID und die bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen. Molekulare Assoziation beschreibt, ob diese Seitenkette für die Assoziation mit Ko-Aktivatoren wie CBP bedeutsam ist, und Phosphorylierung, ob diese Seitenkette eine Phosphorylierung anderer Serinseitenketten von CREB induzieren kann. Für Ser142 und 143 sind keine Funktionen bekannt. Eine Übersicht findet sich in Johannessen, et al. 2004.



Serinseitenkette	Molekulare Assoziation	Phosphorylierung	Induzierende Aktivität	Inhibierende Aktivität	Zellwachstum	Zellmotilität	Inhibition der Apoptose	Zelldifferenzierung	Induzierende Transkription	Hemmende Transkription
Ser108	X	X								
Ser111	X	X								X
Ser114	X									
Ser117		X								
Ser121				X						X
Ser129					X				X	
Ser133		X	X		X	X	X	X	X	
Ser142/143										

Hinsichtlich der verantwortlichen Kinasen wird bisher Folgendes beschrieben: CREB-Ser^{108/111} und Ser^{114/117} werden dabei von der CK1B phosphoryliert (Shanware et al., 2009), Ser¹²¹ von der ATM-Kinase/ATR-Kinase (Dodson und Tibbetts 2006) und Ser¹²⁹ durch die GSK3beta (Hansen et al., 2004). Ser¹³³ wird durch diverse Kinasen, wie CaMK4, MAPKSPK2, MSK1, p90RSK oder PKD1 angesteuert (Johannessen et al., 2004).

Eine Ubiquitinierung von CREB wurde ebenfalls nachgewiesen und führt zu seiner Proteasom-abhängigen Degradation, was für die Qualitätskontrolle von CREB von Bedeutung ist. Ebenfalls kann es zu einem *Cross talk* beider PTMs kommen. So führt die Überphosphorylierung von CREB zu einer Ubiquitinierung und damit zu einer Degradation durch das Proteasom (Mu et al., 2011). Die Identifizierung eines alternativen Faktors, der CREB unabhängig von der Phosphorylierung bindet, führt zur Hypothese, dass für einige physiologische Eigenschaften von CREB eine Phosphorylierung nicht essentiell ist. Weiterführende Studien zeigten, dass nicht nur Phosphorylierung und Ubiquitinierung, sondern auch andere PTMs, wie Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung und SUMOylierung die Aktivität und Funktion von CREB beeinflussen können (Angel et al., 2010; Chen et al., 2014; Comerford et al., 2003; Dodson and Tibbetts 2006; Galardo et al., 2013; Johannessen et al., 2004; Kaleem et al., 2011; Lin et al., 2014; Shi et al., 2004; Sun et al., 2013). Dies kann unter anderem funktionelle Konsequenzen aufgrund der Modulation von CREB-regulierter Transkription auf nukleäre und mitochondriale Gene haben, was auch mit Veränderungen der Proteindegradation sowie Proteininteraktionen einher gehen kann.

Relevanz von CREB in Tumoren

Neben seiner physiologischen Rolle ist CREB auch wesentlich an der malignen Transformation von Zellen beteiligt, was auf einer aberranten Aktivierung von Komponenten des cAMP-Signaltransduktionswegs beruht. So ist CREB häufig in soliden Tumoren, wie z.B. Glioblastomen, Mammakarzinomen und Melanomen und in hämatopoetischen Erkrankungen im Vergleich zu normalem Gewebe überexprimiert (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Verbreitung einer erhöhten CREB-Expression oder Aktivität in verschiedenen Karzinomen.

Karzinom	Referenz
Brustkrebs	Chhabra et al., 2007
Glioblastom	Tan et al., 2012 (a); Tan et al., 2012 (b)
Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	Abramovitch et al., 2004
Klarzelliges Nierenkarzinom	Antonescu et al., 2006
Lymphatische Leukämie	Cho et al., 2011
Malignes Melanom	Brauer et al., 2011; Jean und Bar-Eli, 2000 Melnikova et al., 2010
Myeloische Leukämie	Cheng et al., 2008 ; Pigazzi et al., 2013 Zimmer et al., 2010

Die zugrunde liegenden Mechanismen der CREB-Überexpression in Tumoren sind bisher wenig aufgeklärt. Da nur in wenigen Tumoren eine Amplifikation des CREB-Gens nachgewiesen wurde (Tan et al., 2012 (b)), sind strukturelle Alterationen im Wesentlichen nicht für die erhöhte Expression und Funktion von CREB in Tumoren verantwortlich. Auch ist nicht bekannt, welche Signaltransduktionswege CREB in den Tumoren aktivieren und welchen Anteil CREB an der Ausprägung des onkogenen Phänotyps hat.

1.3 Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Da bisher keine Studien eine Verbindung zwischen onkogener Transformation durch HER-2/neu bzw. Ras-Mutationen und CREB-Aktivität bzw. Expression zeigten oder die Bedeutung von CREB für die phänotypischen Veränderungen der onkogenen Transformation aufklärten, sollten die folgenden Fragen behandelt werden:

- Ist CREB in Onkogen-transformierten murinen NIH3T3-Zelllinien hinsichtlich der Phosphorylierung und Expression verändert? Können diese Daten auf humane Krebszelllinien mit den onkogenen Veränderungen bezogen werden? Liegt in Patiententumoren (von z.B. Brustkrebs oder Kolonkarzinom) eine Korrelation zwischen Onkogen und CREB-Aktivität/Expression vor?
- Welche Signaltransduktionswege steuern die CREB-Phosphorylierung in den murinen Zelllinien? Welchen Einfluss zeigt die Blockierung der CREB/CBP-Interaktion?
- Welche Bedeutung hat die CREB-Expression und Phosphorylierung hinsichtlich der physiologischen Veränderungen bei einer onkogenen Transformation?
- Wird die *in vivo* Tumorigenität durch eine Inhibition der CREB-Expression beeinflusst?
- Kann das Tumormikromilieu die CREB-Expression bzw. Aktivität modulieren?
- Welche Proteine sind nach reduzierter CREB-Expression verändert? Haben diese eine Rolle in der onkogenen Transformation?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollen murine Modellsysteme mit HER-2/neu-Überexpression und Ras-Mutationen hinsichtlich der CREB-Expression und Aktivität mit parental Zellen verglichen werden. Weiterhin sollen die Zellen mit Signaltransduktionsinhibitoren und CREB-spezifischen Inhibitoren behandelt werden, was die Aktivierung von CREB beeinflussen könnte. Die Bedeutung von CREB für die onkogene Transformation soll mit shRNA-medierter Herunterregulation von CREB aufgeklärt werden. Die Rolle von CREB auf die Migrationskapazität wird unter Verwendung von *Transwell*-Diffusions-Analysen durchgeführt. Die Apoptoserate wird durch die enzymatische Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7, Annexin V-Färbung und den Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials bestimmt. Da es bisher keine Informationen über den Einfluss der CREB-Aktivierung auf das globale Proteinexpressionsprofil gibt, soll der Einfluss der CREB-Aktivierung durch Proteom-Analysen bestimmt werden. Dabei sollen Gesamtproteinextrakte aus Zellen mit durch shRNA-reprimierter CREB-Expression gewonnen und das Proteinexpressionsmuster mit Onkogen-transformierten Zellen verglichen werden. Differentiell exprimierte, durch CREB kontrollierte Proteine werden durch Massenspektrometrie identifiziert. Die *in vivo*-Tumorigenität soll anhand von Mausexperimenten untersucht werden. Das Tumormikromilieu soll durch veränderte Kultivierungsbedingungen, wie Hypoxie und Azidose, nachgebildet werden.

2. Methoden

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sowie die Zusammensetzung der PUFFER findet sich im Anhang (Kapitel I.).

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Zellkultivierung und Passagieren

Allgemeine Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden murinen Fibroblastenzellen sowie humanen Krebszelllinien wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C unter einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % Luft kultiviert. Die Zellen wurden standardmäßig in 75 cm²-Kulturflaschen mit 10 ml kompletten KULTURMEDIUM oder in 25 cm²-Kulturflaschen mit 5 ml Kulturmedium gehalten. Wurden größere Mengen an Zellen benötigt, wie bspw. für Proteomanalysen und Tierversuche, erfolgte die Kultivierung in 175 cm²-Kulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium bzw. in 100 mm-Schalen mit 20 ml Kulturmedium. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die für die Angiogenese-Versuche verwendeten HUVEC-Zellen wurden in 25 cm²-Kulturflaschen mit 5 ml Kulturmedium gehalten und das Medium alle zwei Tage gewechselt.

Passagieren

Zur Vermeidung von Kontaktinhibition wurden die kultivierten Zellen vor dem Erreichen der vollständigen Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen (halbes Volumen des kompletten Kulturmediums), dann Trypsin/EDTA zugegeben (1/10 Volumen des Kulturmediums) und für fünf Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mittels eines Mikroskops untersucht. Durch Zugabe des dreifachen Volumens an Kulturmedium zu dem Trypsin/EDTA erfolgte das Abstoppen der Reaktion. Die Zellen wurden resuspendiert und dann entsprechend der Verdünnung in Kulturgefäßen ausgesät.

2.1.2 Zelllinienasservierung durch Kryokonservierung

Einfrieren

Zellen möglichst niedriger Passagenzahl wurden für die Stammhaltung kryokonserviert: Dafür wurde eine in logarithmischer Wachstumsphase befindliche vitale Zellkultur in einer 25 cm²-Kulturflasche, wie unter 2.1.1 beschrieben, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Min. bei 280 x g und RT pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 800 µl EINFRIERMEDIUM aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde direkt in 1 ml Kryogefäße überführt, verschlossen und bis zum Einfrieren bei 4°C gelagert. Hierfür kamen mit Isopropanol gefüllte Einfrierbehälter zum Einsatz, welche in einem -80°C-Tiefkühlschrank eine kontrollierte Temperaturabnahme von 1°C/Min. sicherstellten. Die Kryoproben wurden für ca. 24 Std. bei -80°C gelagert und dann bei -150°C dauerhaft asserviert.

Auftauen

Ein der Kryoasservierung entnommenes Röhrchen wurde sofort in einem auf 37°C temperierten Wasserbad inkubiert und der Inhalt nach dem Auftauen direkt in 10 ml Kulturmedium ohne Selektionsantibiotika gegeben. Nach dem Zentrifugieren bei RT für drei Min. bei 280 x g wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Kulturflasche ausgesät. Die Zugabe von Selektionsantibiotika erfolgte 24 Std. später.

2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Für verschiedene Versuche musste eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgesät werden. Vor Beginn des Experiments wurden die Zellzahl und der Anteil der vitalen Zellen eines Aliquots in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit einer TRYPANBLAULÖSUNG verdünnt und die nicht angefärbten Zellen in jeweils vier Großquadraten der Zählkammer ausgezählt.

2.1.4 Kultivierung unter Hypoxie

Die Kultivierung unter Hypoxie erfolgte für den angegebenen Zeitraum in den unter 2.1.1 beschriebenen Kulturmedien jeweils unter 1 % O₂ und 5 % CO₂. Die Verdrängung des Luftsauerstoffs auf 1 % Volumenanteil wurde durch Begasung mit Stickstoff sichergestellt.

2.1.5 Kultivierung auf Matrigel- oder Poly-HEMA-beschichteten Material

Matrigel-Beschichtung

Das bei -20°C gelagerte Matrigel wurde ü.N. im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und 1:1 mit eiskaltem PBS verdünnt. Von dieser Mischung wurden in jede Vertiefung einer 96-Lochplatte 50 µl gegeben und für mehrere Stunden bei 37°C polymerisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Kulturmedium mit 5000 Zellen.

Poly-HEMA-Beschichtung

66 mg Poly-HEMA wurden in 50 ml 96 % (w/v) Ethanol unter Erhitzen bei 56°C im Wasserbad gelöst und davon 50 µl in jede Vertiefung einer 96-Lochplatte gegeben. Nach Verdunsten des Ethanols durch die Lagerung bei RT für 24 Std. wurden Reste des Ethanols durch Spülen mit 100 µl PBS entfernt und 100 µl Kulturmedium mit 5000 Zellen eingesät.

2.1.6 Transfektion von murinen Fibroblasten

Transfektion mit PolyFect

Vor der Transfektion wurden Zellen in 6-Loch-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % kultiviert. Zum Zeitpunkt der Transfektion musste die Kultur sich zudem in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine Vitalität von > 90 % aufweisen.

2 µg endotoxinfreie und linearisierte Plasmid-DNA (shRNA gegen murines CREB-1, im Folgenden shCREB bezeichnet bzw. NC (*non-sense* Kontrolle)-Konstrukte, CREB-1-Überexpressionskonstrukte oder mCherry kodierende-Plasmide) wurde mit Basismedium EMEM (1 x) ohne jegliche Zusätze auf 100 µl aufgefüllt und 10 µl PolyFect zugegeben. Die Mischung wurde vorsichtig durch fünfmaliges Hoch- und Runterpipettieren homogenisiert und dann 15 Min. bei RT zur Bildung von Micellen inkubiert. Danach wurden 0,6 ml Kulturmedium ohne Selektionsantibiotika zugegeben und direkt zu den 1,5 ml Kulturmedium auf den Zellen gegeben. Nach Inkubation für 24 Std. bei 37°C erfolgte ein Mediumwechsel auf Selektionsmedium (500 µg/ml Neomycin bei mCherry- bzw. CREB-Expressionsplasmiden, 5 µg/ml Puromycin bei shCREB- und NC-Konstrukten).

Zur Etablierung stabiler Klone wurde bei shCREB und NC-Konstrukten die Selektion bei 5 µg/ml Puromycin für ein bis zwei Wochen aufrechterhalten und abgestorbene Zellen durch Medienwechsel regelmäßig entfernt. Danach wurden einzelne Puromycin-resistente Zellen aus der Batchkultur mit Hilfe eine Pipettenspitze entnommen und in jeweils eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte gegeben. Die Klone wurden unter einer Puromycinkonzentration von 3 µg/ml hochgezogen und bis auf 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Bei den Neomycin-resistenten CREB-1-Transfektanten wurde analog vorgegangen und mit 500 µg/ml Neomycin selektioniert.

Neomycin-resistente, mCherry-markierte Zellen wurden hinsichtlich ihrer Fluoreszenzstärke wie unter 2.5.10 beschrieben an einem Durchflusszytometer sortiert.

Transfektion mit Effectene

Dieses Transfektionsreagenz wurde bei den Promotoranalysen (siehe 2.3.10) verwendet. 0,5 x 10⁴ Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte in 100 µl Medium eingesät und 24 Std. bei 37°C im Inkubator angezogen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und Transfektionsreagenz zugegeben, die wie folgt hergestellt wurde: 0,3 µg Luziferasereporterplasmid pGl3 (Promega) mit der einklonierten Promotorregion wurden mit 0,016 µg β-Galaktosidase-Plasmid in 30 µl Puffer EC und 1,2 µl *Enhancer* eine Sek. auf einem Tischschüttelgerät vorsichtig gemischt und fünf Min. bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 2,5 µl Effectene wurde erneut für zehn Sek. geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von zehn Min. 100 µl Medium zu dem Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Pipettieren gemischt und zu den Zellen gegeben. Alle Komponenten stammten aus dem *Effectene Transfection reagent kit* (Qiagen).

2.2 Methoden der Mikrobiologie

2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

Die Herstellung der kompetenten Bakterien in 100 ml LB-Medium erfolgte nach einer veränderten Methode von Hanahan (1983): *E. coli* wurden bis zu einer optischen Dichte (OD) von ca. 0,5 inkubiert, die Kultur auf zwei vorgekühlte Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 4°C und 2500 x g für

acht Min. sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem, sterilem TFB I resuspendiert und nach 10 min Inkubation auf Eis erneut pelletiert. Das gewonnene Pellet wurde in 2 ml eiskaltem, sterilem TFB II aufgenommen und Aliquots von 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße bei -80°C weggefroren.

2.2.2 Transformation und Kultivierung von kompetenten Bakterien

Transformation

Ein Aliquot von 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen (Stamm DH5α) wurde mit 1,5 µg Plasmid-DNA vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für exakt 45 Sek. in einem Thermoschüttler. Der Ansatz wurde direkt für zwei Min. auf Eis abgekühlt und 100 µl SOC-MEDIUM zugegeben. Die Bakterien wurden für eine Std. auf einem Thermoschüttler bei 37°C und ca. 800 Upm inkubiert, dann 50 µl der Suspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C invertiert inkubiert.

Kultivierung

Einzelne transformierte Bakterienkolonien wurden von der LB-AGARPLATTE mit einer sterilen Pipettenspitze in 2 ml LB-MEDIUM mit 50 µl/ml Ampicillin übertragen und für acht Std. bei 280 Upm und 37°C kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 50 µl benutzt, um eine 50 ml Übernachtskultur (mit 50 µl/ml Ampicillin) anzuzüpfen. Diese wurde für 12 - 16 Std. wie oben beschrieben inkubiert und die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei $1500 \times g$ für 15 Min. bei 4°C sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.3 Asservierung von kompetenten Bakterien

Ein Aliquot der transformierten Bakterien wurde 1:1 mit sterilem Glycerin vermischt und bei -20°C gelagert.

2.3 Methoden der Molekularbiologie

2.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Material

2.3.1.1 Isolierung von DNA und RNA aus Zellmaterial

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem *NucleoSpin II kit* (Macherey-Nagel). Dafür wurden 1×10^6 Zellen in 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β -Mercaptoethanol lysiert, bei $11.500 \times g$ für eine Min. zentrifugiert und der Überstand mit 350 µl 70 % (v/v) Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf Anionenaustauschersäulchen aufgetragen, durch Zentrifugation bei $11.500 \times g$ für eine Min. die Nukleinsäuren an die Säulen gebunden und die Säule durch Waschen mit 350 µl MDB und anschließender Zentrifugation bei $11.500 \times g$ für eine Min. entsalzt. Zum Verdau von DNA wurden 95 µl einer rDNase I-Lösung (hergestellt aus 10 µl Enzym-Lösung, 90 µl Reaktionspuffer) auf die Mitte des Säulchens gegeben und 30 Min. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 250 µl RA2-Puffer sowie zwei Waschschrift mit 600 µl bzw. 200 µl

RA3-Puffer, wobei zwischendurch jeweils ein Zentrifugationsschritt bei 11.500 x g für zwei Min. durchgeführt wurde. Die RNA wurde durch Zugabe von 40 µl Nuklease-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation (11.500 x g, eine Min.) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die DNA-Isolierung wurden 1×10^6 Zellen in 0,5 ml TE-PUFFER aufgenommen und der Reaktionsansatz nach Zugabe von 2,5 ml PROTEINASE K-PUFFER ü.N. bei 55°C inkubiert. Danach wurden 0,4 Volumina Phenol (pH 8,0) zu dem Reaktionsansatz gegeben, gründlich gemischt, dann 0,4 Volumina Chloroform zugegeben, erneut gründlich gemischt und zentrifugiert (16.000 x g, fünf Min., RT). Der wässrige Überstand wurde abgenommen und 0,8 Volumina Phenol-Chloroform zum wässrigen Überstand dazugegeben, dann erneut extrahiert und zentrifugiert. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit 0,8 Volumina Chloroform wurden 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat und 0,7 Volumina Isopropanol der wässrigen Phase hinzugefügt, zentrifugiert (16.000 x g, zehn Min., RT), der Überstand verworfen und das Pellet mit jeweils 1 ml 70 % (v/v) und 100 % (v/v) Ethanol gewaschen, zwischendurch zentrifugiert (16.000 x g, zwei Min., RT) und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Die DNA wurde in 0,1 ml TE-PUFFER resuspendiert.

2.3.1.2 Isolierung von RNA aus Tumormaterial nach Chomczynski und Sacchi (1987)

Die Isolierung von RNA aus Tumormaterial erfolgte mit dem Trizol-Reagenz (Invitrogen). Für den Gewebeaufschluss wurden ca. 100 mg Tumorprobe mit 1 ml Trizol versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Tumorproben wurden mittels eines Ultra-Turrax in ca. 30 Sek. homogenisiert und dann fünf Min. bei RT inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 13.600 x g für zehn Min. bei RT abgetrennt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform zu dem Überstand und kräftigen Schütteln erfolgte erneut ein Inkubationsschritt für fünf Min. bei RT. Durch Zentrifugation (16.000 x g, 15 Min., 4°C) wurden die beiden Phasen getrennt und aus der oberen Phase die RNA gewonnen.

Für die Isolierung der RNA wurde die obere, wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt, geschüttelt und zehn Min. bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10.000 x g zehn Min., 4°C) wurde das Pellet in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert, fünf Min. bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Das trockene RNA-Pellet wurde in 50 µl Nuklease-freiem Wasser bei 4°C gelöst, dann die RNA-Konzentration (2.3.2) sowie die Integrität der RNA bestimmt (2.3.6) und ein DNase I-Verdau durchgeführt (2.3.3).

2.3.1.3 Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung erfolgte mit dem *EndoFree Plasmid Maxi System* von Qiagen. Das abzentrifugierte Bakterienpellet (s. 2.2.2) wurde in 3 ml S1 resuspendiert, durch alkalische Lyse mit 3 ml S2 aufgeschlossen und nach der Neutralisierung mit 5 ml S3 die freigesetzte Plasmid-DNA über

Anionenaustauschersäulen gemäß den Herstellerangaben (Qiagen) aufgereinigt. Während der Aufarbeitung wurden störende bakterielle Endotoxine durch die Waschlösung entfernt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit 500 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert, die DNA-Konzentration wie unter 2.3.2 beschrieben bestimmt und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung einer wässrigen RNA-Lösung wurde die OD in einem Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen einen Blindwert gemessen. Eine OD von 1 entspricht dabei einer Konzentration von etwa 40 µg/ml. Die Messung erfolgte in Kunststoff-UV-Küvetten mit einer 1:35 verdünnten Probe. Zusätzlich wurde der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt, um die Reinheit der RNA zu ermitteln. Hier waren Werte zwischen 1,7 und 2,1 akzeptabel.

Die DNA-Konzentration wurde vergleichbar wie oben bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

2.3.3 Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

Für die Synthese von cDNA ist eine hohe Reinheit der RNA erforderlich. Daher wurden potentielle Verunreinigungen mit genomischer DNA durch einen Verdau mit DNase I entfernt. Dafür wurden 2 µg verunreinigte RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl 10 x DNaseI-Reaktionspuffer (Invitrogen) und 1 U DNase I (Invitrogen) versetzt und nach einer Inkubationszeit von 20 Min. bei RT 1 µl 25 mM EDTA zugefügt und das Enzym bei 65°C für zehn Min. inaktiviert.

DNA und RNA wurden aus wässrigen Lösungen mittels Phenol-Chloroform-Fällung konzentriert: Zu der wässrigen Lösung wurden 2 Volumina Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, pH 4,5) gegeben. Nach Mischen und Zentrifugation wurde die wässrige Phase (RNA) oder organische Phase (DNA) entnommen. Die Phasen wurden 1:1 mit Ethanol versetzt und nach Zentrifugation das gewonnene Pellet mehrfach mit Ethanol gewaschen. Die Nukleinsäuren wurden in TE-PUFFER aufgenommen.

2.3.4 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurden 2 µg aufgereinigte RNA mittels der reversen Transkriptase (*RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*, Fermentas) umgeschrieben. Dafür wurden 2 µg DNA-freie RNA mit 1 µl oligo-dT₁₈-Primer und Nuklease-freiem Wasser in einem Volumen von 12 µl in einem Thermocycler für fünf Min. bei 70°C zur Denaturierung der RNA erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden 8 µl Reaktionsmix bestehend aus 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs (10 mM) sowie jeweils 1 µl Ribonuklease-Inhibitor und reverse Transkriptase hinzugefügt und die Reaktion für 60 Min. bei 42°C durchgeführt. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz für zehn Min. bei 70°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.3.5 Polymerasekettenreaktion

2.3.5.1 Taq-Polymerasekettenreaktion

Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich, Nukleinsäuren sequenzspezifisch zu amplifizieren. Für jede zu untersuchende mRNA wurden mit Hilfe der Programme Primerblast und Primer3 spezifische Primerpaare abgeleitet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Primer nur an die gewünschten Zielsequenzen binden und die Annealingtemperatur der Primerpaare recht vergleichbar ist.

Für jeden Ansatz wurde in ein Nuklease-freies 0,5 ml Reaktionsgefäß folgender Reaktionsmix vorgelegt: 19,7 µl Nuklease-freies Wasser, 2,5 µl 10 x Taq-Reaktionspuffer (Invitrogen), 0,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,25 µl von jedem Primer (100 µM Stock), 0,3 µl thermostabile Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl; Invitrogen). Nach der Zugabe von 1 µl cDNA wurde gut gemischt und dann die Reaktion in einem Thermocycler (Biometra) mit folgendem Programm durchgeführt:

initiale Denaturierung	95°C für eine Min.	} 30 – 40 Zyklen
Denaturierung	95°C für 30 Sek.	
Primerannealing	T _{anneal} für 30 Sek.	
Elongation	72°C für eine Min.	
finale Elongation	72°C für fünf Min. 4°C für ∞	

T_{anneal} entspricht der jeweils Primer-spezifischen Annealingtemperatur und ist in Tab. A.4 im Anhang aufgeführt.

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt 6:1 mit 6 x DNA-LADEPUFFER versetzt, gemischt und davon 20 µl auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 2.3.6).

2.3.5.2 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Allgemeines

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) basiert auf der Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in den DNA-Doppelstrang während der Amplifikation, der Lichtsignale emittiert, die durch einen Detektor quantifiziert und über eine Software dargestellt werden können. Dabei korreliert die Signalintensität mit der synthetisierten Produktmenge sowie letztlich mit der Menge an genspezifischer cDNA im Zellmaterial. Als Maßstab wird dabei der Zeitpunkt bzw. Zyklus gewählt, an dem das Signal aus dem Hintergrund hervortritt, der ct-Wert. Für die qPCR wurden spezifische Primerpaare so gelegt, dass die entstehenden Produkte eine maximale Länge von 300 Bp sowie die Primer eine Annealingtemperatur von 60°C aufwiesen (Tab. A.5 im Anhang).

qPCR mit SYBR Green I (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* (Invitrogen) verwendet. Pro Reaktion wurde in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß folgender Ansatz vorgelegt: 10 µl *SYBR Green SuperMix* (2 x), 8,5 µl Ampuwa, 0,25 µl von jedem Primer (100 µM Stock), 1 µl cDNA.

Die Reaktion erfolgte in einem Rotorgene 2000 (Corbett), welcher mit einem 470 nm / 510 nm Detektor ausgerüstet war. Die qPCR wurde gemäß folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

initiale Denaturierung	95°C für drei Min.	
Denaturierung	95°C für 15 Sek.	} 40 – 45 Zyklen
Annealing + Extension	60°C für 30 Sek.	
Schmelzkurve	60°C für 90 Sek.	
	Temperatur auf 99°C erhöhen (1°C/Schritt ansteigend), fünf Sek. Wartezeit nach jedem Schritt	

Im Anschluss an die eigentliche Amplifikation wurde zur Analyse der PCR-Produkte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Bildung sekundärer Amplifikate auszuschließen.

Relative Quantifizierung

Die ermittelten ct-Werte des untersuchten Gens wurden in Relation zu den ct-Werten eines Haushaltsgens gesetzt, von dem eine ubiquitäre Expression erwartet wird und das nicht reguliert wird. In dieser Arbeit wurde GAPDH als Referenzgen verwendet.

2.3.6 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Moleküle unterschiedlicher Länge lassen sich in einem Agarosegel gemäß ihrer Größe auftrennen. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller durch die Matrix wandern als größere. Durch Zugabe von Ethidiumbromid lassen sich die Nukleinsäuren sichtbar machen.

Es kamen in dieser Arbeit 1 % (w/v) oder 1,5 % (w/v) Agarosegele zum Einsatz. Die Agarose wurde in 1 x TAE-LAUFPUFFER aufgekocht, pro 100 ml Puffer 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in Wasser) zugegeben und in Gießformen ausgehärtet. Für präparative Anwendungen wurden bis zu 40 µl Nukleinsäure in DNA-LADEPUFFER (6:1 Verdünnung) aufgetragen, zur Analyse von PCR-Produkten 20 µl. Die beladenen Gele wurden in 1 x TAE-LAUFPUFFER bei 90 V für ca. eine Std. laufen gelassen und dann an einer UV-Kamera entwickelt. Kommerziell erhältliche 100 Bp- und 1 kbp-Marker dienen zum Größenvergleich der Banden.

2.3.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Plasmid-DNA und PCR-Produkte größer als 300 Bp wurden nach der Auftrennung aus Agarosegelen mit dem auf Silika-Membranen beruhenden Kit *QIAquick* (Qiagen) eluiert. Dafür wurden auf einem UV-Tisch die Amplifikate mit einem Skalpell ausgeschnitten, dann in QG-Puffer bei 50°C unter Schütteln verflüssigt und nach Zugabe von Isopropanol das Material auf eine Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,5 ml QG-Puffer und 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, um Salz- und Agarosereste zu entfernen und die gereinigte DNA mit 50 µl EB-Puffer eluiert.

2.3.8 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA an enzymespezifischen Nukleotidsequenzen. Diese Enzyme bakterieller Herkunft können genutzt werden, um Plasmide an

bestimmten Stellen zu schneiden und so zu linearisieren, kompatible Enden in PCR-Produkten und Plasmiden einzuführen und beide zu ligieren, sowie durch Mutationen Restriktionsschnittstellen einzufügen bzw. zu deletieren.

Mittels der Datenbank *NEB Cutter V2.0* konnten Restriktionsschnittstellen in Nukleotidsequenzen identifiziert werden. Bei Doppelverdauansätzen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde zudem auf den *NEB Double Digest Finder* zurückgegriffen.

Pro Ansatz wurden 20 µg DNA mit 20 U Restriktionsenzym verdaut. Die für jedes Restriktionsenzym verwendeten Bedingungen hinsichtlich der Inkubationszeit und Temperatur sowie des Inkubationspuffers sind in Tab. A.2 (Anhang) dargestellt. Für die Doppelverdauansätze wurden die in Tab. A.3 (Anhang) angegebenen Kombinationen verwendet.

Der Restriktionsverdau wurde zur Überprüfung der Vollständigkeit und Korrektheit gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend das DNA-Produkt aus dem Gel isoliert.

2.3.9 Ligation von Nukleinsäuren

Bei der Ligation werden 3' und 5'-Enden von zwei DNA-Doppelsträngen miteinander verbunden. Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA wurden 2 µl linearisierter Vektor mit 10 µl DNA-Fragment, 2 µl 10 x DNA-Ligase-Puffer (Gibco) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U; Gibco) in einem Volumen von 20 µl vermischt und für 16 Std. bei 14°C inkubiert. Die Menge an eingesetztem DNA-Fragment wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Menge DNA-Fragment [ng]} = 3 \times \text{Menge Plasmid-DNA [ng]} \times \frac{\text{Länge DNA-Fragment [Bp]}}{\text{Länge Plasmid-DNA [Bp]}}$$

Um eine Selbstligation von geschnittenen Plasmiden mit kompatiblen Enden zu vermeiden, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Dies wurde mit einer Phosphatase nach Herstellerangaben (Roche) durchgeführt. Überhängende 5'-Enden von DNA-Produkten wurden mit einer T4-Polynukleotidkinase (Promega) nach Herstellerangaben phosphoryliert.

2.3.10 Bestimmung der Matrixmetalloproteinase-2- (MMP-2-) und MMP-9-Promotor-Aktivität

Promotor-Konstruktion und Transfektion

Die murinen MMP-2- und MMP-9-Promotorregionen wurden aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert (2.3.5.1) und in den kommerziell erhältlichen Luziferase-Vektor pGL3 (Promega) ligiert (2.3.9). Mutationen in dem MMP-9-Promotor wurden durch ortsspezifische Mutagenese erzeugt (2.3.11). Die Promotor-Fragmente des MMP-2-Promotors wurden nach Doppelverdau mit Restriktionsenzymen gewonnen und in den linearisierten pGL3-Vektor ligiert. Die Transfektion in die murinen Fibroblasten erfolgte, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, mit Effectene.

Abb. 2.1 zeigt die klonierten Promotor-Regionen, die benutzten Restriktionsschnittstellen für den Verdau sowie wichtige Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die über die Software *TFSearch* (Suchmatrix von $\geq 0,75$) identifiziert wurden.

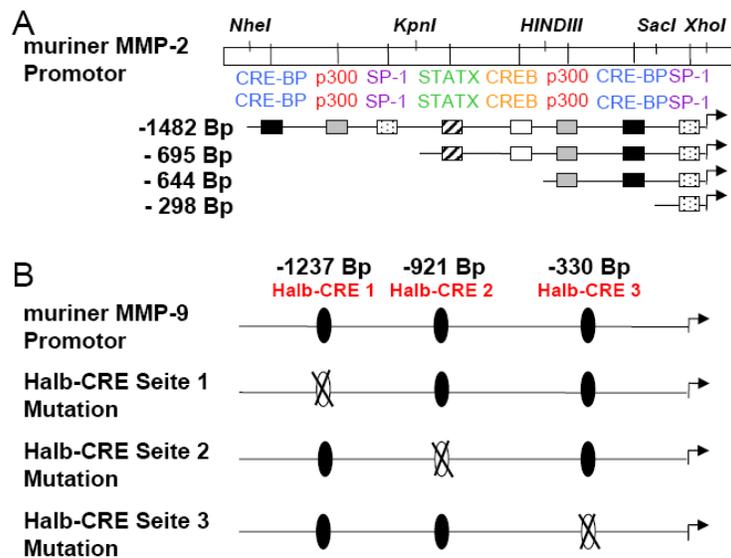


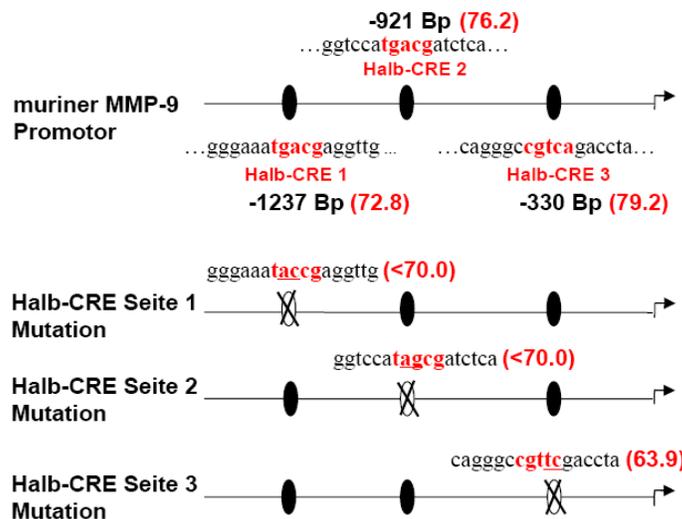
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der untersuchten murinen MMP-2- und 9-Promotoren. **A.** Es wurde im Falle des MMP-2-Promotors eine Analyse des Bereichs -1500 zu 0 Bp auf putative Bindestellen für TF untersucht und durch Restriktionsverdau drei kürzere Varianten erzeugt (-695 Bp, -644 Bp, -298 Bp). Diese Varianten wurden in einen pG13-Vektor kloniert. **B.** Für den MMP-9-Promotor wurden drei Halb-CRE-Elemente gefunden, welche jeweils einzeln mittels Punktmutation ausgeschaltet wurden. Diese wurden ebenfalls in einen pG13-Luziferasevektor kloniert. Die DNA-Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Zelllyse und Detektion

Nach der Transfektion mit den Reporterplasmiden wurden die Zellen für weitere 48 Std. inkubiert und dann zweimal mit 150 μ l PBS pro Loch gewaschen. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 75 μ l Reporter Lyse Puffer (Promega) pro Loch mit anschließender 30-minütiger Inkubation bei RT auf einem Taumelschüttler. Nach Zentrifugation der 96-Lochplatte (260 x g, zwei Min., 4°C) wurden 10 μ l Zelllysate in eine Messplatte pipettiert und an einem Luminometer durch automatisierte Zugabe von 50 μ l Luziferase-Test-Substrat (Promega) und sofortiger Detektion vermessen. Für die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 30 μ l Zelllysate in eine Messplatte überführt und 30 μ l *Beta-Glo* Test Substrat (Promega) zugefügt, dann 30 Sek. gemischt und im Dunklen für 30 Min. bei RT inkubiert. Die Detektion von 40 μ l Ansätzen erfolgte am Luminometer bei 420 nm. Die Luziferase-Aktivität/Loch wird zu der Transfektionseffizienz in Form der β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Als Leerwert wurde die β -Galaktosidase-Aktivität von nicht-transfizierten Zellen verwendet.

2.3.11 Ortsspezifische Mutagenese

Ortsspezifische Mutationen (Punktmutationen ohne Leserasterverschiebungen) wurden mit dem *QuikChange Site-directed Mutagenesis kit* (Stratagene) in das MMP-9-Promotorkonstrukt sowie in das shCREB-del2-Konstrukt eingeführt, wobei die notwendigen Mutageneseprimer mit Hilfe des Programms *PrimerX* erstellt wurden (Modus: *QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit by Stratagene*) (Tab. A.6 Anhang). Um die Bindung von CREB an eine putative CRE-Bindungsstelle zu unterbinden, wurden zwei benachbarte Basen des cis-Elements mutiert und die Bindung von CREB an das mutierte CRE-Element erneut mit dem *TFSearch*-Programm bestimmt. Weiterhin wurden durch die Mutation neue Restriktionsschnittstellen eingefügt bzw. deletiert, so dass die Mutation durch Restriktionsverdau nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.2).



**MMP-9
Wildtyp**

**MMP-9
mutiert**

Abbildung 2.2:
Nukleotidsequenzen der untersuchten MMP-9 Halb-CRE-Elemente. Mittels *TFSearch* gefundene CRE-Elemente sind in rot dargestellt. Durch eingeführte Punktmutationen wurde die Bindung von CREB an die dargestellten CRE-Elemente verhindert. Basenaustausche sind unterstrichen. Die Zahlen in den Klammern bezeichnen die von *TFSearch* beschriebene Suchmatrix. Durch die Punktmutationen wurde die Bindungswahrscheinlichkeit deutlich reduziert. Die DNA-Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Im Falle des shCREB-del2-Konstrukts, ein von shCREB nicht inhibierbarer CREB-1-Expressionsvektor, wurden im nichtkodierenden Bereich Punktmutationen eingeführt, so dass das Protein keinen Aminosäureaustausch aufweist (Abb. 2.3). Das nicht-targetierbare shCREB-del2-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Jürgen Bukur bereitgestellt.

982	1002	mRNA-Sequenz murines CREB-1
...CTTGTCCCTCCGTCGTTCTTACA...		
ACAGGGAGGCAGCAAGAGAAT		Sequenz shCREB-1 Plasmid 2 (knock down)
ATCGAGAGGCCGCCCGAGAAT		nicht-targetierbares Konstrukt (Rescue)
GGAATCTCATTGGATGCATAC		Sequenz NC Plasmid

Abbildung 2.3: Vergleich der 5' nicht-kodierenden mRNA-Sequenz von murinen CREB-1 mit der daran bindenden shRNA-Sequenz des CREB-Knock-down-Konstruktes und der nicht-targetierbaren Form des shCREB-del2-Konstruktes (Rescue). Die mutierten Basen sind unterstrichen. Die DNA-Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die mRNA ist als cDNA dargestellt.

In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden 5 µl Reaktionspuffer (10 x), 10 ng Plasmid-DNA, 125 ng jedes Mutageneseprimers, 1 µl dNTP-Mix, 3 µl QuikSolution Reagenz, 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl) ad 51 µl mit Nuklease-freiem Wasser gemischt und der Ansatz in einem PCR-Cycler wie folgt inkubiert:

initiale Denaturierung	95°C für eine Min.	} 18 Zyklen
Denaturierung	95°C für 50 Sek.	
Primerannealing	60°C für 50 Sek.	
Elongation	68°C für sechs Min.	
finale Elongation	68°C für sieben Min.	

Danach wurde der Reaktionsansatz mit 1 µl *DpnI* (10 U) versetzt, gemischt, kurz zentrifugiert und dann für 75 Min. bei 37°C inkubiert und nachfolgend bei -20°C gelagert.

Durch Restriktionsverdau mit *Bsa*JI, *Nla*III und *Taq*^qI wurde die Mutation der CRE-Bindungsstellen kontrolliert. Die Plasmide wurden wie unter 2.2.2 beschrieben in *E. coli* (Stamm XL 10 Gold) transformiert, kultiviert und anschließend isoliert (2.3.1.3).

2.3.12 Elektrophorese-Mobilitätsshift-Assay (EMSA)

Durch den EMSA kann die Interaktion von Proteinen (im wesentlichen Sinne Transkriptionsfaktoren) mit einem DNA-Fragment *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wird ein

Kernproteinextrakt mit einem doppelsträngigen DNA-Oligomer inkubiert und die Komplexbildung gelelektrophoretisch durch die verlangsamte Migration (*shift*) einzelner Banden nachgewiesen. Des Weiteren kann durch die Zugabe eines Protein-interagierenden Antikörpers die Größe des Komplexes erhöht bzw. die Migration weiter verlangsamt werden (*Super-shift*), was die eindeutige Identifizierung des Proteins erleichtert. Durch Konkurrenz mit einem unmarkierten Oligonukleotid kann zudem die Spezifität nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden doppelsträngige DNA-Oligomere gemäß den Regionen in Abb. 2.2 verwendet, die wie folgt an den 3'-Enden biotinyliert und dimerisiert wurden:

100 pmol jedes Oligonukleotids (Tab. A.7 im Anhang) wurden zusammen mit 10 mM NaCl in 50 µl Nuklease-freiem Wasser in einem 85°C warmen Wasserbad für zehn Min. inkubiert, welches dann ü.N. auf RT abgekühlt wurde. Die Biotinylierung wurde mit dem *Biotin 3' End DNA labeling kit* (Pierce) nach Anleitung durchgeführt.

Kernextrakte aus murinen Zellen wurden, wie unter 2.4.2 beschrieben, isoliert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (2.4.5.1).

In dem EMSA-Reaktionsansatz wurden 2 µg Gesamtkernextrakt eingesetzt und mit folgenden Komponenten (alle Komponenten stammten aus dem *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit*, Thermo Scientific) auf Eis gemischt: 1 µl poly d(I-C), 2,0 µl 5 x Bindepuffer, ad 9 µl mit Nuklease-freiem Wasser. Nach fünf Min. Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 µl Oligodimer (biotinyliert bzw. 1 µl unmarkierte zusätzlich für Kontrolle). Die Reaktionsansätze wurden für 30 Min. bei RT inkubiert und dann auf einem nicht-denaturierenden 6,5 %igem Polyacrylamidgel bei 100 V in 0,5 x TBE aufgetrennt unter Kühlung auf 4°C: 1 ml 5 x TBE, 2,2 ml 30 % Acrylamid-Lösung (19:1), 80 µl 80 % (v/v) Glycerin, 6,62 ml A. bidest., 90 µl 10 % APS, 10 µl TEMED.

Nach dem Lauf wurde das Gel auf eine Nylonmembran geblottet (2.4.7) und die gebundene Probe durch UV-Bestrahlung immobilisiert, dann mit Blockierungslösung für 30 Min. geblockt. Die Detektion erfolgte mit Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP) (Verdünnung 1:300) und Chemilumineszenz durch Luminolumsatz.

2.3.13 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die *in vivo* Bindung von CREB an mitochondriale CRE-Elemente wurde mittels ChIP nachgewiesen, wobei DNA-gebundene Proteine immunpräzipitiert und die daran gebundene DNA nachgewiesen wird (Ryu et al., 2005). Hierfür wurden Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und für 24 Std. unter Normoxie oder Hypoxie gehalten. Das *Crosslinken* von DNA und Protein erfolgte durch Zugabe von 37 %igem Formaldehyd (Endkonzentration: 1 %) zu dem Medium. Nach fünf Min. Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration: 0,125 M) gestoppt und erneut für fünf Min. inkubiert. Nach Entfernen des Mediums und Waschen mit PBS

wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,5 % NP-40 lysiert, das Zelllysate zum Scheren der DNA dreimal 10 Sek. Ultraschall ausgesetzt (70 %ige Intensität), durch Zentrifugation (6000 x g, zehn Min., 4°C) gereinigt und vom Überstand die DNA-Konzentration bestimmt.

10 µg DNA wurden ü.N. bei 4°C mit 4 µg CREB-Antikörper oder 8 µg Kaninchen-IgG in einem Volumen von 400 µl in ChIP1-Puffer unter Rotieren inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 20 µl Agarose A/G-Beads zugegeben und erneut für zwei Std. bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation bei 280 x g wurden die Beads einmal mit 800 µl ChIP1-Puffer und zweimal mit jeweils 800 µl ChIP2-Puffer unter Schütteln gewaschen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden mit 200 µl Elutionspuffer eluiert und das Auseinandertrennen der Komplexe erfolgte durch eine Inkubation für vier Std. bei 65°C. Nach einem Proteinase K-Verdau (s. 2.4.4) wurde die DNA aufgereinigt (s. 2.3.3), in TE-Puffer aufgenommen und für eine qPCR verwendet (s. 2.3.5.2). Das PCR-Produkt (nach 35 Zyklen) wurde zusätzlich auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert. Alle Komponenten und Puffer stammten aus dem *ChIP-IT Express Enzymatic kit* (Active Motif).

2.3.14 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen der mutierten CREB-1-Überexpressionsvektoren für den Aminosäureaustausch und der Promotoren wurden von der Firma Eurofins „Value Read Service“ (Hamburg) durchgeführt.

2.3.15 Pyrosequenzierung

Die Sequenzierung der Zellen und Tumore auf eine K-Ras^{G12V}-Mutation wurde freundlicherweise von Frau Dr. Haak (Institut für Pathologie) an einem PyroMark Q24 (Qiagen) mit dem *PyroMark PCR kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

2.4.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

1 x 10⁶ murine Fibroblasten wurden in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml Kulturmedium eingesät und für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und dann mittels eines Zellschabers in 1 ml PBS überführt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, zentrifugiert (16.000 x g, fünf Min., 4°C), das Zellpellet in 100 µl PBS mit frischen Protease-Inhibitor (Roche) sowie Phosphatase-Inhibitor resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung für zweimal fünf Impulse mit mindestens 70 %iger Intensität lysiert. Anschließend wurde das Lysat fünf Min. auf Eis gelagert, danach erneut zentrifugiert (16.000 x g, 20 Min., 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Aliquot zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt (s. 2.4.5.2), die Probe 3:1 mit reduzierenden LAEMMLI-PUFFER versetzt, drei Min. bei 95°C gekocht und danach bei -20°C weggefroren.

2.4.2 Präparation von Kernproteinextrakten, Membran- und Zytoplasmaproteinextrakten

Zur Fraktionierung von Kernproteinen, Proteinen des Zytoplasmas sowie von Organellen und Membranen wurde ein kommerziell erhältliches Komplettsystem verwendet (*Cell Fractionation kit*, Cell Signaling). Von einem gewaschenen Zellpellet wurde die Zellzahl bestimmt und auf 500 µl mit PBS aufgefüllt. Ein Aliquot von 100 µl wurde aufgeschlossen (s. 2.4.1) und repräsentiert das Gesamtproteinlysate. Die verbliebenen 400 µl wurden zentrifugiert (280 x g, fünf Min., 4°C) und das Pellet gemäß Anleitung weiter verarbeitet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 30 µg Protein in 15 µl PBS zusammen mit 5 µl reduzierenden LAEMMLI-PUFFER auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Western Blot-Analysen (s. 2.4.7) und die Proteinverteilung wurde durch kolloidale Coomassie-Färbung eines Gels bestimmt (s. 2.4.9.1). Als Markerproteine wurden Histone H3 (Kern), *Apoptosis inducing factor* (AIF, Mitochondrium) und MEK1 (Zytoplasma) verwendet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford-Methode bestimmt (s. 2.4.5.1).

2.4.3 Präparation und Subfraktionierung von Mitochondrien (nach Wieckowski et al., 2009)

Zur Isolierung von intakten Mitochondrien wurden ca. 10^7 Zellen in 250 µl PUFFER A aufgenommen, drei Mal 15 Sek. bei 25 % Leistung beschallt und anschließend der Überstand drei Mal zentrifugiert (600 x g, fünf Min., 4°C). Nach der dritten Zentrifugation sollte kein Pellet, welches Zellkerne, Membranfragmente und ER beinhaltet, sichtbar sein. Nach Zentrifugation des Überstandes (7.000 x g, zehn Min., 4°C) enthält das Pellet die aufgereinigten, intakten Mitochondrien.

Durch einen hypotonen Puffer (Puffer B) wurde nun die äußere und innere Mitochondrienmembran durch Schwellen jeweils unabhängig voneinander zerrissen und so die Proteine fraktioniert. Zugabe von isotonem Puffer (Puffer C) stoppte den Vorgang. Die intakten Mitochondrien wurden in 250 µl PUFFER B resuspendiert und 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 250 µl PUFFER C zugefügt und zentrifugiert (10.000 x g, zehn Min., 4°C). Das entstehende Pellet P1 und der Überstand ÜS1 wurden, wie in Abb. 2.4 beschrieben, weiter bearbeitet.

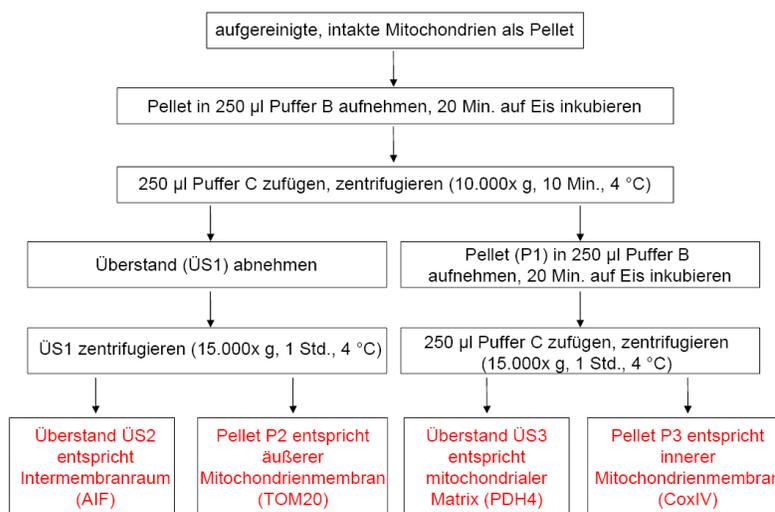


Abbildung 2.4: Flusschema der Mitochondriensubfraktionierung.

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Bei den Fraktionen ist der zugehörige Marker angegeben. Die gewonnenen, aufgereinigten Mitochondrien sind frei von Kernproteinen (Marker: Histone H3) und zytoplasmatischen Proteinen (Marker: MEK1).

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (2.4.5.1) und 50 µg Protein jeder Fraktion auf einem 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt und in einem Western-Blot verwendet. Für die äußere Mitochondrienmembran wurde *Transporter of the outer Membrane* (TOM20), für den Intermembranraum AIF, für die innere Mitochondrienmembran *Cytochrome c oxidase IV* (COX IV) und für die Mitochondrien-Matrix *Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4* (PDK4) als Marker zur Reinheitsbestimmung der Subfraktionen verwendet.

2.4.4 Proteinase K-Assay

Um die Spezifität der CREB-Lokalisation zu bestimmen, wurden die isolierten Mitochondrien ferner mit 1 % (w/v) Triton X-100, 10 U Proteinase K jeweils allein oder in Kombination für 30 Min. bei RT in ISOTONEM PUFFER inkubiert. Die Reaktion wurde für zehn Min. auf 60°C erhitzt und die Integrität/Stabilität von CREB mittels Western-Blot nachgewiesen.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.4.5.1 Bestimmung mittels Bradford-Methode

Bradford-Reagenz wurde 1:4 mit Ampuwa verdünnt, dann 200 µl zu 10 µl Standard oder 1:10 verdünnter Probe gegeben und für zehn Min. bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption an einem ELISA-Reader oder Spektrometer bei 595 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit BSA aus einer 2 mg/ml Stocklösung hergestellt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.4.5.2 Bestimmung mittels BCA-Methode

Bei der BCA-Methode wurden 50 Teile BCA-Reagenz mit 1 Teil CuSO₄-Lösung gemischt (beides im Pierce *BCA Test kit* enthalten) und 200 µl hiervon zu 10 µl Standard oder verdünnter Probe in eine 96-Lochplatte gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm an einem ELISA-Reader gemessen. Auch hier wurden die Standards mit BSA hergestellt.

2.4.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.4.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Allgemeines

Soll die Zusammensetzung einer Proteinlösung und die molekulare Masse der darin enthaltenen Proteine bestimmt werden, so kann die SDS-PAGE verwendet werden. Hierbei werden engporige PA-Gele hergestellt und das Proteingemisch durch Elektrophorese getrennt. Je nach Vernetzungsgrad des PA sind die Trennbereiche verschieden: So bieten 10 %ige Gele eine gute Auftrennung von Proteinen zwischen 120 und 30 kDa, 8 %ige Gele im Bereich 50 – 200 kDa (Rehm, 2006). Die Proben werden vor Beladung auf das Gel mit SDS und β-Mercaptoethanol versetzt. Da SDS an das Protein bindet, wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, d.h. dass die Wanderungstrecke in SDS-behandelten Gelen nur von der relativen molekularen Masse abhängig ist. Das hier verwendete

System entspricht der diskontinuierlichen PAGE nach Laemmli (1970), bei der ein niederprozentiges Sammelgel das Trenngel überschichtet.

Verwendete Gele

Es wurden 8, 10 und 12 %ige Trenngele sowie 4 %ige Sammelgele mit einer Dicke von 1,5 mm angefertigt. Die 30 %ige Monomerlösung wurde gemäß Tab. 2.1 mit A. bidest., Gelpuffer und SDS-Lösung versetzt, die Polymerisation durch Zufügen von APS und TEMED gestartet, kurz durch Schwenken gemischt und luftblasenfrei in die Gelkassetten gegossen. Die polymerisierende Lösung des Trenngels wurde mit Isopropanol überschichtet, das nach dem Polymerisieren des Gels mittels Filterpapier abgesaugt wurde. Eventuelle Reste von Isopropanol wurden durch Waschen mit A. bidest. entfernt und vor Zugabe des Sammelgels getrocknet. In das polymerisierende Sammelgel wurde ein Kamm (zehn bzw. 15 Proben) gesteckt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel. Die rot unterlegten Katalysatoren wurden erst kurz vor dem Gießen zur Lösung hinzugefügt. Für native Gele wurde anstatt des Volumens an SDS-Lösung dasselbe Volumen an A. bidest. verwendet, zusätzlich wurden hier dem Trenngel 1 ml 20 % Sucrose-Lösung zugesetzt.

Trenngel			Sammelgel
8 %	10 %	12 %	4 %
2,7 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacryamid- lösung (37,5:1)	3,3 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacryamid- lösung (37,5:1)	4,0 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacryamid- lösung (37,5:1)	1,3 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacryamidlösung (37,5:1)
4,7 ml A. bidest.	4,1 ml A. bidest.	3,4 ml A. bidest.	6,1 ml A. bidest.
2,5 ml Trenngelpuffer ^a	2,5 ml Trenngelpuffer ^a	2,5 ml Trenngelpuffer ^a	2,5 ml Sammelgelpuffer ^b
0,1 ml 10 %iges SDS	0,1 ml 10 %iges SDS	0,1 ml 10 %iges SDS	0,1 ml 10 %iges SDS
100 µl 10 %iges APS ^c	100 µl 10 %iges APS ^c	100 µl 10 %iges APS ^c	100 µl 10 %iges APS ^c
5 µl TEMED	5 µl TEMED	5 µl TEMED	10 µl TEMED

^a – Trenngelpuffer: 1,5 mM TrisHCl pH 8,8

^b – Sammelgelpuffer: 0,5 mM TrisHCl pH 6,8

^c – möglichst frisch herstellen, Stammlösung bei –20°C lagern

Probenbeladung und Gellauf

Die in LAEMMLI-PUFFER aufgenommenen Proben wurden mit 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol versetzt, bei 95°C für drei Min. aufgekocht, dann abgekühlt und zentrifugiert. Vor der Beladung wurden die Geltaschen mit SDS-LAUFFUFFER ausgespült und 40 – 50 µg Gesamtprotein/ Spur aufgetragen. Als Größenmarker diente der *Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

Das Gel wurde für etwa 50 Min. bei 65 V laufen gelassen, bis die Proteine in das Sammelgel gewandert waren und dann die Spannung auf 125 V erhöht. Der Gellauf wurde nach etwa drei Std. beendet, als die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.4.6.2 Zymographie zur Aktivitätsbestimmung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die Zymographie wird zur Detektion der Aktivität von proteolytischen Enzymen wie MMPs verwendet. Hierfür wurden Kulturüberstände von seruminduzierten und serumreduzierten Kulturen gesammelt und die zellfreien Kulturüberstände bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

Die in der Zymographie verwendeten Gele sind SDS-Gele wie weiter oben beschrieben, enthalten jedoch zusätzlich Gelatine als Substrat (Endkonzentration: 2 mg/ml). Durch die proteolytische

Aktivität von MMPs wird die Gelatine an spezifischen Stellen des Gels abgebaut. Eine Coomassiefärbung identifiziert diese Stellen als farblose Flecken in der ansonsten blau gefärbten Gelatinematrix (Snoek-van-Beurden und von den Hoff, 2005).

Für die Zymographie wurden 7,5 %ige Trenngele gegossen: 2,4 ml Acrylamid/ Bisacrylamid, 2,5 ml 1,5 M TrisHCl pH 8,8, 1 ml Gelatinelösung (200 mg Gelatine auf 10 ml A. bidest. lösen, möglichst frisch ansetzen), 100 µl SDS (10 %), 3,655 ml A. dest., 100 µl APS (10 %), 30 µl TEMED. Die Zusammensetzung des Sammelgels sowie des Laufpuffers entspricht dem der klassischen SDS-PAGE.

Die Proben wurden vor der Beladung nativ gehalten, d.h. sie wurden 3:1 mit Laemmli-Puffer verdünnt, dann jedoch weder erhitzt noch mit β -Mercaptoethanol versetzt. Der Gellauf wurde bei 90 V unter Kühlung auf 4°C für acht Std. durchgeführt, danach das Gel entnommen und dreimal für 20 Min. unter Schütteln bei RT in jeweils 75 ml AKTIVIERUNGSPUFFER gewaschen, um das überschüssige SDS zu entfernen und die MMPs wieder zu renaturieren. Dann wurde das Gel ü.N. für 18 bis 20 Std. bei 37°C unter Schütteln in 50 ml INKUBATIONSPUFFER geschwenkt, wobei der Puffer nach zwölf Std. einmal erneuert wurde. Die Gele wurden für zwei Std. in 100 ml COOMASSIEFÄRBE-LÖSUNG bei RT gefärbt und mehrfach für 20 Min. in ENTFÄRBE-LÖSUNG bis zur gewünschten Intensität entfärbt. Dann wurden die Gele ü.N. in A. dest. gewässert und an einem Scanner dokumentiert.

2.4.6.3 Blau-native PAGE (nach Schägger und von Jagow, 1991)

Mitochondriale Enzymkomplexe und deren Aktivität konnten mittels der Blau-nativen Gelelektrophorese untersucht werden. Hierbei werden die Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen aus den Membranen isoliert und nachfolgend durch Beladung mit Coomassie Blau negativ geladen. Unter nicht denaturierenden Bedingungen werden nun die Protein-Farbkomplexe aufgetrennt und nach der Größe geordnet.

Mitochondrien (siehe 2.4.3) wurden 1:1 mit ACA-PUFFER versetzt und zur Freisetzung von Membranproteinen n-Dodecyl- β -D-maltosid zugegeben (Endkonzentration: 0,45 %). Die Lösung wurde zentrifugiert (16.000 x g, 20 Min., 4°C) und Coomassie Blau zugefügt (Endkonzentration: 0,3 %). Für die Elektrophorese wurden kommerzielle Gradientengele in einem Auftrennungsbereich 4-16 % gewählt, auf die 200 µg der Protein-Coomassie Blau-Komplexe aufgetragen wurden. Die Gele wurden mit BN-KATHODENPUFFER und BN-ANODENPUFFER bei 35 V und 4°C für etwa 16 bis 24 Std. getrennt und danach die mitochondriale Aktivität mittels spezifischer Färbungen bestimmt (2.4.9.4).

2.4.7 Western-Blot (WB) und Immunnachweis von Proteinen

Semidry-Blot-Transfer

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden in einem zweiten Schritt elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wobei das Muster der Proteinverteilung erhalten

bleibt. Das in den Puffern enthaltende Methanol wäscht das SDS aus, wodurch es zu einer teilweisen Renaturierung und Freisetzung von Epitopen kommt, die mittels immunologischer Detektion nachgewiesen werden können.

In dieser Arbeit wurde das Semidry-Blot-Verfahren verwendet: Eine Nitrocellulosemembran sowie neun Stücke Whatman-Papier wurden auf die Größe des Trenngels geschnitten. Zur Aktivierung der Proteinbindekapazität erfolgte eine Inkubation der Membran in Anodenpuffer I für fünf Min. Danach wurde auf der mit A. dest. befeuchteten Kathode Folgendes luftblasenfrei aufeinander aufgebaut:

- 3 x Whatman-Papier (getränkt in KATHODENPUFFER (pH 7,6))
- SDS-Polyacrylamidgel
- Nitrocellulosemembran (fünf Min. inkubiert in ANODENPUFFER I (pH 10,4))
- 3 x Whatman-Papier (getränkt in ANODENPUFFER I (pH 10,4))
- 3 x Whatman-Papier (getränkt in ANODENPUFFER II (pH 10,4))

Die Anode wurde aufgesetzt, mit einem Gewicht beschwert und der Transfer bei 1 mA/cm² Membran für 90 Min. durchgeführt (entspricht ca. 60 mA bei einem Minigel).

Immunodetektion immobilisierter Proteine

Nach dem Blot erfolgte die Bestimmung der Transfereffizienz mittels Poncheau S-Färbung (0,2 % (w/v) Poncheau S in 3 % (w/v) TCA) und Entfärbung in A. dest. bis zur gewünschten Intensität. Die Membran wurde anschließend wie in Tab. 2.2 angeführt gewaschen um restliches Poncheau S zu entfernen, zur Absättigung freier Bindungsstellen mit entfettetem Milchpulver geblockt und mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert (Tab. A.8 im Anhang). Nach gründlichen Waschschritten zur Entfernung nicht spezifisch gebundenen Primärantikörpers wurde mit einem enzymkonjugierten Zweitantikörper inkubiert (Tab. A.9 im Anhang).

Tabelle 2.2: Arbeitsschritte der Immundetektion. Alle Schritte mit Ausnahme der Bindung des 1. AK wurden bei RT durchgeführt. Der erste Wasch- und der Blockierungsschritt erfolgten auf einem Schüttler, die restlichen Schritte in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml oder 25 ml Lösung auf einem Rollmischer.

Arbeitsschritt	Benötigte Lösungen ³	Zeit [Min.]
Waschen	25 ml A. dest. oder TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % Tween)	2 x 5
Blocken	5 % Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % Tween)	60
Waschen	25 ml TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5)	1 x 5
Bindung 1. AK	Primärantikörper in 5 ml Antikörperpuffer bei 4°C ¹	ü.N. ²
Waschen	25 ml TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5)	5 x 5
Bindung 2. AK	5 µl anti-Kaninchen-IgG-HRP bzw. anti-Maus-IgG-HRP in 25 ml Blockpuffer	60 – 90
Waschen	25 ml TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5)	3 x 5
Waschen	25 ml TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5)	5

¹ – Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen sowie die Zusammensetzung des Puffers finden sich in Tab. A.8.

² – Mit dem β -Aktin-Antikörper bzw. GAPDH-Antikörper wurde nur zwei Std. inkubiert.

³ – Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Membran eines Minigels (ca. 8 x 6 cm).

Detektion

Gebundener Sekundärantikörper konnte mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert werden. Zur Detektion wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und in TBS bis zur Detektion gelagert. Hierfür wurde das *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche) verwendet. Die Lösun-

gen A und B wurden 1:1 gemischt und die Blotmembran darin in einer Klarsichtdokumentenhülle inkubiert. Die durch die Umsetzung des Luminols entstehenden Lichtemissionen konnten in einer Dunkelkammer mit CCD-Kamera in Form von distinkten Banden nachgewiesen werden. Dabei musste die Entwicklungszeit je nach Primärantikörper individuell bestimmt werden und konnte zwischen wenigen Sekunden und 30 Min. variieren.

Entfernung der Antikörper von Nitrocellulosemembran (Stripping)

Direkt nach der Detektion wurde die Membran für fünf Min. in TBS geschüttelt und dann für 15 Min. bei RT in kommerziell erhältlicher Stripping-Lösung (*Reblot strong*, Merck) oder in selbst hergestellter „STRIP“-LÖSUNG unter Schütteln inkubiert, nachfolgend in reichlich TBS für 15 Min. gewaschen und dann erneut in Milchpulver geblockt. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben angegeben. Membranen konnten auf diese Weise insgesamt dreimal mit verschiedenen Primärantikörpern inkubiert werden, wobei β -Aktin und ERK-1/2 nicht vollständig entfernt werden konnten.

2.4.8 Zweidimensionale Natriumdodeylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

2.4.8.1 Probenaufarbeitung

Da für die 2D-PAGE große Mengen an Protein benötigt werden, wurden hierfür Zellen von mehreren 150 cm-Zellkulturplatten vereinigt, dreimal mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert.

Die Zellpellets wurden in 200 – 400 μl RABILLOUD-PUFFER (Rabilloud, 1999) resuspendiert, dann für zweimal fünf Zyklen am Ultraschallstab aufgeschlossen und zentrifugiert (16.000 x g, 90 Min., 13°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und davon mittels Bradford-Methode die Proteinkonzentration bestimmt (s. 2.4.5.1).

2.4.8.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Allgemeines

Bei der IEF werden die Proteine einer Probe aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte voneinander getrennt. Proteine sind Amphotere, d.h. das sie positive und negative geladene Gruppen aufweisen. Die Gesamtladung des Proteins ist vom pH-Wert der Umgebung abhängig. Ist ein pH-Wert (der isoelektrische Punkt) erreicht, in dem die Gesamtladung des Proteins Null ist, also die Anzahl der negativen Ladungen gleich den positiven Ladungen, so wandert das Protein in einem elektrischen Feld nicht mehr. Bei diesem Typ der Elektrophorese werden immobilisierte pH-Gradienten in einem PA-Gel verwendet.

Beladung mit den Proteinen

Pro biologisches Replikat wurden mindestens vier technische Replikate durchgeführt. Zunächst wurden 550 μg Gesamtprotein in 340 μl Rabilloud-Puffer aufgenommen und in ein Fokussierschiffchen gegeben. Der IEF-Streifen wurde luftblasenfrei in das Schiffchen eingeführt, so dass das

Proteingemisch entlang des Streifens homogen verteilt war. Nachdem 450 µl Mineralöl auf dem Streifen verteilt war, wurde das Schiffchen verschlossen.

IEF

Die Fokussierungsschiffchen wurden in eine IEF-Einheit eingebracht und ü.N. folgendes Programm bei 20°C und einer Begrenzung der Stromstärke auf 50 µA je IEF-Streifen durchgeführt:

Schritt	Zeit	Spannung
Rehydrieren	zwei Std.	0 V
Schritt 1	zehn Std.	30 V
Schritt 2	eine Std.	500 V (Fokussierung)
Schritt 3	eine Std.	1000 V (Fokussierung)
Schritt 4	eine Std.	5000 V (Fokussierung)
Schritt 5	fünf Std.	8000 V (Gleichgewichtszustand)

Nach etwa 20 Std. Laufzeit wurden zwischen 43.000 und 46.000 Vh erreicht und das Programm automatisch beendet.

Äquilibrierung und Umpufferung

Die Streifen wurden aus den Fokussierungsschiffchen entnommen und für 15 Min. in 12 ml DTT-PUFFER unter leichtem Schwenken bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte eine Umpufferung in 12 ml IODACETAMID-PUFFER für 15 Min. unter leichtem Schwenken bei RT. Die Streifen wurden bis zum Beladen der PA-Gele in SDS-PUFFER gelagert.

2.4.8.3 Zweite Dimension: SDS-PAGE

verwendete Gele

In einer Gießapparatur wurden zwölf 13 %ige PA-Gele (2,5 % C) hergestellt: 520 ml Acrylamid-Lösung (37,5:1), 600 ml Tris-Puffer (242,28 g Tris in ca. 1400 ml A. bidest. lösen, pH mit HCl einstellen ad 2 l), 392 ml A. bidest., 64 ml Glycerin, 8 ml 1 M NaS₂O₃, 16 ml 10 % APS, dann 800 µl TEMED zugeben, um die Polymerisierung zu starten. Die Gele wurden mit 2,5 ml Tris-gesättigtem Butanol überschichtet und ü.N. auspolymerisiert.

Gelbeladung und Lauf

Auf die PA-Gele wurden 7 ml 1%ige AGAROSE-LÖSUNG aufgetragen und schnell der äquilibrierte IEF-Streifen sowie ein Whatman-Papierstück mit Marker eingeführt. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Gele in eine Laufkammer mit 25 l SDS-Laufpuffer eingebaut und unter Kühlung bei 10°C der Lauf gestartet: drei Std. bei 20 V und 18 Std. bei 90 V bis zur Gelfront.

Färbung und Dokumentation

Die Gele wurden über Nacht in einem Gelinkubator mit 2,5 l COOMASSIE-FÄRBE-LÖSUNG bei RT inkubiert und der Hintergrund nachfolgend durch mehrfaches Waschen mit A. dest. entfärbt. Gefärbte Gele wurden mittels eines Gelscanners dokumentiert und bis zum Ausstechen der Spots feucht in eingeschweißten Dokumentenhüllen bei 4°C gelagert.

Auswertung der regulierten Proteinspots

Der Vergleich der unterschiedlich regulierten Proteine wurde durch Auswertung der Gelbilder mittels der Software Delta 2D (Decodon) durchgeführt, indem die Bilder überlagert wurden und die einzelnen Spots miteinander über Vektoren verbunden wurden. Als Parameter für die Identifikation wurden nur Proteinspots mit einem t-Test von >95 % und einer Herunterregulation <0,5 bzw. Heraufregulation >2,0 einbezogen.

2.4.9 Gelfärbungen

2.4.9.1 Kolloidale Coomassie-Färbung (modifiziert nach Neuhoff et al., 1988)

Das SDS-Gel wurde für wenige Sek. in A. bidest. gewaschen, für eine Std. fixiert (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure) und dann über Nacht für mindestens zehn Std. in einer kolloiden Färbelösung auf einem Schüttler geschwenkt. Diese wurde aus 6 ml einer wässrigen 4 %igen Coomassie-Stamm-lösung (3 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 und 1 % (w/v) Coomassie R-250), 4 g 85 %iger ortho-Phosphorsäure, 20 g Ammoniumsulfat und A. bidest. ad 200 ml hergestellt, wobei vier Teile dieser Lösung kurz vor Gebrauch mit einem Teil Methanol versetzt wurden. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurde das gefärbte Gel mehrfach mit A. dest. gewaschen.

2.4.9.2 Alcianblau-Färbung (modifiziert nach Møller und Poulsen, 2002)

Proteoglykane im Kulturüberstand können durch die Alcianblaufärbung in SDS-Gelen nachgewiesen werden. 30 µl Kulturüberstand wurden pro Tasche auf 8 %igen PA-Gelen getrennt und nach dem Lauf wie folgt auf einem Schüttler gefärbt: Die Proteine wurden zunächst für 30 Min. in 12,5 % (w/v) TCA fixiert und danach viermal gründlich mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde für eine Std. mit 1 % (w/v) Periodsäure (in 3 % (v/v) Essigsäure) inkubiert und danach erneut gründlich mit Wasser gewaschen bis das Waschwasser keine Trübung mehr nach der Zugabe von einem Tropfen AgNO₃ aufwies. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 Min. in 1 % (w/v) wässrige Natriummetabisulfit-Lösung und viermaliges Waschen in Wasser. Die Färbung der Proteoglykane wurde in 0,5 % (w/v) Alcianblau (in 3 % (v/v) Essigsäure) für zwölf Std. durchgeführt und dann mit 7 %iger Essigsäure der Hintergrund entfärbt.

2.4.9.3 Katalase-Färbung (nach Weydert und Cullen, 2010)

150 µg Gesamtprotein wurden in nativen Laemmli-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol und SDS) aufgenommen und auf ein natives 8 %iges Gel aufgetragen, welches vorher für eine Std. in TRIS-EDTA-PUFFER bei 4°C und 100 V vorgelaufen wurde. Für drei Std. wurde bei 60 V und 4°C ein Lauf durchgeführt, dann der Puffer gegen TRIS-EDTA-GLYCIN-PUFFER gewechselt und erneut für drei bis vier Std. bei 4°C und 80 V getrennt.

Nach Entnahme des Gels wurde es zweimal mit Wasser gewaschen und dann für 15 Min. in 0,003 % (v/v) Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) bei RT unter Schütteln inkubiert. Es wurde erneut

zweimal kurz für fünf Min. mit A. dest. gewaschen und dann jeweils 10 ml der FÄRBE-LÖSUNGEN A und B direkt zusammen auf dem Gel gemischt. Sobald farblose Banden auf dem blaugrün gefärbten Gel erschienen, wurde die Farblösung sofort abgegossen und das Gel mit A. dest. gewaschen.

2.4.9.4 Mitochondriale In Gel Aktivitäts-Färbungen (nach Robles-Martinez et al., 2013)

Komplex I-Färbung

Ein Blau-natives Gel (2.4.6.3) wurde Licht-geschützt für zwei bis fünf Std. in 20 ml COXI-FÄRBE-LÖSUNG bei RT inkubiert, über Nacht in FIXIERLÖSUNG gelagert und an einem Scanner dokumentiert.

Komplex II-Färbung

Ein Blau-natives Gel (2.4.6.3) wurde Licht-geschützt für zwei Std. in 20 ml COXII-FÄRBE-LÖSUNG bei RT inkubiert, über Nacht in FIXIERLÖSUNG gelagert und an einem Scanner dokumentiert.

Komplex IV-Färbung

Ein Blau-natives Gel (2.4.6.3) wurde Licht-geschützt für vier Std. in 20 ml COXIV-FÄRBE-LÖSUNG bei RT inkubiert, über Nacht in FIXIERLÖSUNG gelagert und an einem Scanner dokumentiert.

Komplex V-Färbung

Ein Blau-natives Gel (2.4.6.3) wurde über Nacht in 50 ml COXV-FÄRBE-LÖSUNG bei 37°C inkubiert und nachfolgend fixiert. Die Dokumentation erfolgte an einem Scanner vor schwarzen Hintergrund.

2.4.10 Aktiver Ras-Pull-down-Test

Der Anteil an GTP-Ras wurde mit dem *Active Ras Pull-Down and Detection kit* (Thermo Scientific) bestimmt.

Dafür wurden 100 µl Glutathion-Agarosematrix auf eine Zentrifugensäule durch Zentrifugation (6000 x g, 30 Sek.) gebunden. 80 µg GST-Raf1-RBD und 750 µg Gesamtprotein wurden auf die Säule gegeben und gemischt. Weitere 50 µg des Gesamtproteins wurden für die Analyse der gesamten Ras-Menge (*Input*) benutzt. Das Säulchen wurde bei 4°C unter leichtem Schütteln für eine Std. inkubiert und dann bei 6000 x g für 30 Sek. zentrifugiert. Das Säulchen wurde dreimal mit 400 µl Waschpuffer behandelt, zwischenzeitlich wie oben beschrieben zentrifugiert. Es wurden 50 µl SDS-Probenpuffer und 2,5 µl β-Mercaptoethanol auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (6000 x g, zwei Min.). Das Eluat wurde für drei Min. auf 95°C erhitzt, und 25 µl auf ein 12 % PA-Gel aufgetragen. Gellauf und Western-Blot wurden wie in 2.4.6.1, 2.4.7 durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der mitgelieferte pan-Ras-Antikörper gemäß Tab. A.8 (Anhang) verwendet.

2.4.11 Ubiquitin-Pull-down-Test zum Nachweis von ubiquitinierten CREB

Ubiquitinierte Proteine wurden mittels *Ubiquitinated Protein Enrichment Kit* (Calbiochem) gefällt und durch Western-Blot-Analyse CREB nachgewiesen.

Ein Zellpellet von $2,5 \times 10^6$ Zellen wurde in 500 μ l LYSISPUFFER resuspendiert und 0,5 mg Gesamtprotein in einem Gesamtvolumen von 500 μ l Lysispuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 40 μ l Ubiquitin-Affinitätskugeln wurde die Suspension ü.N. bei 4°C kontinuierlich durchmischt und nachfolgend zentrifugiert (4°C, 1.000 x g, 30 Sek.). Der Überstand wurde entfernt und die Kugeln viermal mit 1 ml eiskaltem WASCHPUFFER gewaschen. Danach wurde die Matrix in 40 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen, für fünf Min. aufgeköcht und nach einer weiteren Zentrifugation (12.000 x g, fünf Min.) der gesamte Überstand auf einem 8 % PA-Gel getrennt. Der Nachweis von CREB bzw. der Aufkonzentrierung ubiquitiniertes Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Die Verknüpfung der Ubiquitine untereinander wurde mittels Agarose-TUBEs (*Tandem Ubiquitin Binding Entities*) bestimmt. TUBEs1 erkennen nur K63, TUBEs2 binden an K48 und K63-verknüpfte Ubiquitine. Die Probenaufarbeitung, Bindung und Elution erfolgte wie im Handbuch des Herstellers beschrieben (Life Science). Die eluierten Proteine wurden auf einem 8 %iges PA-Gel aufgetrennt und CREB bzw. Ubiquitin mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

2.4.12 Immunpräzipitation (IP) von CREB und Nachweis von SUMO-CREB bzw. ubiquitinierten CREB

Zu 200 μ l Zelllysat mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurden 0,8 μ l CREB-Antikörper oder SUMO-1-Antikörper zugegeben und ü.N. bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 μ l Protein A Agarose-Kugeln zugegeben und weitere zwei Std. bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 16.000 x g, 30 Sek.) wurde der Überstand verworfen und das Sediment fünfmal mit 500 μ l kaltem Waschpuffer (s. 2.4.11) resuspendiert, das Sediment in 20 μ l 3x SDS-Probenpuffer aufgenommen, gemischt und für fünf Min. gekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Proben auf ein 12 %iges PA-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot CREB mit einem CREB-Antikörper oder die Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Antikörper nachgewiesen. SUMO-CREB konnte auch durch Nutzung des *SUMO-Qapture kit* (Enzo) nach Herstellerangaben nachgewiesen werden.

2.4.13 Bestimmung der Aktivität der Protein Kinase A (PKA)

Die Bestimmung der PKA-Aktivität erfolgte mit dem *Pierce PepTag Non-Radioactive Detection of cAMP-Dependent Protein Kinase kit*. Hierbei wird die Nettoladung eines markierten Peptids unter Einfluss von PKA geändert und wandert auf einem Agarosegel in die entgegengesetzte Richtung. Durch die PKA-Aktivität wird dabei das markierte Peptid phosphoryliert, wobei nun eine negative Nettoladung besteht und das Peptid zur Anode wandert. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden Proteinfraktionierungen und Totallysate für die Reaktion verwendet, welche aus hypoxischen und normoxischen Zellen gewonnen wurden. Das Reaktionsprodukt wurde auf einem Agarosegel in TrisHCl-Puffer aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert.

2.5 Methoden der Durchflusszytometrie

2.5.1 Apoptosebestimmung durch AnnexinV-Propidiumiodid-Färbung (Rieger et al., 2011)

Mit Hilfe der AnnexinV(AnnV)-Propidiumiodid(PI)-Färbung wurde die Apoptose- und Nekroserate einer Zellkultur bestimmt. Das erste Anzeichen einer Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserinen auf die Außenseite der Zytoplasmamembran. Zellen in dieser frühen Phase der Apoptose binden AnnV, das unter Ca^{2+} selektiv an Phosphatidylserine bindet. In späteren Phasen der Apoptose sowie bei Nekrose geht die Membranintegrität verloren, wodurch die Kerne dieser Zellen mit PI angefärbt werden können. Die Doppelfärbung kann also vitale Zellen (AnnV/PI) von früh- (AnnV⁺/PI) und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen (AnnV⁺/PI⁺) Zellen unterscheiden.

Eine Zellsuspension von 1×10^5 Fibroblasten wurde einmal mit 500 μl AnnV-Bindepuffer (BD) gewaschen und in 250 μl AnnV-Bindepuffer aufgenommen, der zusätzlich 2,5 μl AnnV-Fluoresceinisothiocyanat (AnnV-FITC) und 0,1 μl PI (Stockkonzentration 2 mg/ml) enthält. Alternativ erfolgte die Färbung auch mit dem *AnnexinV FITC Apoptosis detection kit* (MBL). Die Zellen wurden für zehn Sek. gemischt, dann zehn Min. dunkel inkubiert und an einem FACSCalibur mit Hilfe der Software *CellQuest Pro* vermessen.

Dabei wurde zunächst die Hauptpopulation im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert und das Gerät anhand von ungefärbten sowie einfach gefärbten Zellen hinsichtlich der Fl-1- und Fl-2-Kanäle eingestellt. Es wurden mindestens 5000 Zellen der Hauptpopulation untersucht und die Zellzahl in den einzelnen Quadranten quantifiziert.

2.5.2 Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung

Die Aktivierung der Caspase-3 als wichtigste Effektor-Caspase durch Abspaltung eines Peptids wurde mittels spezifischer Antikörperfärbung am Durchflusszytometer analysiert.

1×10^6 Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann in 0,5 ml Cytofix/Cytoperm resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 20 Min. auf Eis. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (280 x g, fünf Min., RT) pelletiert, der Überstand abgesaugt und zweimal mit 1 ml 1x Perm/Wash gewaschen. Die Zellen wurden in 100 μl 1 x Perm/Wash mit 10 μl Antikörper aufgenommen, wenige Sek. gemischt und 30 Min. im Dunkeln inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 280 x g, fünf Min., RT wurde einmal mit 1 ml 1 x Perm/Wash gewaschen und die Zellen in 500 μl 1 x Perm/Wash aufgenommen. Alle Komponenten stammten aus dem *Caspase 3 active Form kit* (BD). Die Detektion erfolgte, wie in 2.5.1 beschrieben, auf dem Fl-1-Kanal. 5000 Zellen wurden gezählt.

2.5.3 Bestimmung der Proliferation mittels Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)-Färbung

Soll die Proliferation einer Kultur hinsichtlich der einzelnen Zellen beurteilt werden, so bietet sich die CFSE-Färbung an. Hierbei werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE-AM gefärbt

und dieser Farbstoff bei Proliferation an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch ein Verdünnungseffekt im Histogramm sichtbar ist.

$0,5 \times 10^6$ Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 500 μ l PBS mit 1 % (v/v) FKS und 5 μ l CFSE-Stocklösung (5 mM in wasserfreiem DMSO) resuspendiert und für zehn Min. bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden zwei bis drei Volumina kaltes Kulturmedium zugegeben, die Zellen fünf Min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (280 x g, fünf Min, 4°C). Eine Gelbfärbung des Pellets deutete auf eine erfolgreiche Färbung hin. Das Pellet wurde zweimal mit 37°C warmen Kulturmedium gewaschen und dann in 1 ml Kulturmedium in eine 24-Lochplatte ausgesät.

Nach dem Ernten der Zellen wurden diese in 0,2 ml PBS aufgenommen und 5000 Zellen am FACSCalibur gemessen (Fl-1-Kanal). Die Histogramme der parentalen Zellen wurden mit denen der shCREB-Zellen mittels *overlay*-Befehl der *CellQuest*-Software übereinander gelegt.

2.5.4 Zellzyklusanalyse durch Bestimmung der DNA-Menge

Für die Zellzyklusanalyse wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen durch mehrfaches Waschen mit PBS von anhaftendem FKS befreit und in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml 0,5 % FKS-haltigen Kulturmedium für 48 Std. bei 37°C durch Aushungern synchronisiert. Danach wurden die Zellen für 0, 12, 16 und 24 Std. auf 10 ml Kulturmedium mit 10 % FKS gesetzt und nach dem Ernten wie folgt fixiert und gefärbt: Die Zellen wurden durch Zentrifugation (280 x g, zwei Min., 4°C) sedimentiert, dann zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und ü.N. resuspendiert in 2 ml 70 % (v/v) Ethanol bei 4°C fixiert. Es wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen, dann die RNA durch Inkubation mit 100 μ l RNase (30 μ g/ml RNaseA in PBS mit 1 % (w/v) Saponin) für 30 Min. bei RT abgebaut und durch Zugabe von 200 μ l 7-AAD (Stockkonzentration: 2 mg/ml in PBS) 60 Min. bei 4°C die DNA gefärbt. Die Zellsuspension wurde durchflusszytometrisch analysiert (FACSCalibur). Die Histogramme (Fl-3-Kanal) wurden mit der *Mod-Fit LT* Software auf den DNA-Gehalt untersucht und die Zellzyklusphasen quantifiziert.

2.5.5 Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern

Für die Messung von Zellmembran-gebundenen HER-2/neu oder der MHC-Klasse I-Präsentation auf der Zelloberfläche wurde die zu untersuchende Kultur in zwei Aliquots mit jeweils 250.000 Zellen aufgeteilt: 5 μ l direkt markierte Antikörper gegen HER-2/neu (HER-2/neu-PE) und MHC-Klasse I (H-2L^d-FITC) wurden zu einem Aliquot in 1 ml PBS gegeben und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde für drei Min. bei 2400 x g und RT zentrifugiert und 2-mal mit PBS gewaschen. Das andere Aliquot wurde mit 5 μ l Isotypkontrolle (IgG1 Maus-PE bzw. IgG2a Maus-FITC) in 1 ml PBS gleich behandelt. Für die Auswertung am FACSCalibur wurden 10.000 Zellen beider Aliquots vermessen und die mittleren Fluoreszenzintensitäten des Kanals (Fl-1 oder Fl-2) verglichen.

Zum Nachweis von E-Cadherin wurden unmarkierte Antikörper verwendet, die mittels eines Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert werden konnten. 1×10^6 Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und 81 μ l 37 %iges Formaldehyd zugegeben (Endkonzentration: 3 %). Die Zellen wurden für 10 Min. bei 37°C inkubiert, dann eine Min. auf Eis gelagert und zweimal mit 2 ml INKUBATIONSPUFFER gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 μ l Inkubationspuffer resuspendiert, 10 Min. bei RT inkubiert, dann 0,5 μ l E-Cadherin-Antikörper zugegeben und unter gelegentlichem Mischen eine Std. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (8.000 x g, fünf Min., RT), das Zellpellet zweimal mit 100 μ l Inkubationspuffer gewaschen und dann mit 100 μ l anti-Kaninchen-Alexa 488 Sekundärantikörper (1:1000-Verdünnung) für 30 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 μ l Inkubationspuffer. Die Zellen wurden in 500 μ l PBS resuspendiert und an einem FACSScan (Fl-1-Kanal) gemessen.

2.5.6 Bestimmung der individuellen CREB-Expression bei Einzelzellen in einer Gesamtkultur

Mit dieser Methode sollte die CREB-Expression von einzelnen Zellen in einer Kultur untersucht werden. Die Zellen (1×10^6) wurden zunächst in 1 ml 4 % (w/v) Paraformaldehyd für zehn Min. bei 37°C fixiert und dann weiter wie bei der E-Cadherin-Färbung beschrieben verfahren. Die Inkubation mit dem 1:200-verdünnten CREB-Antikörper wurde jedoch bei 4°C ü.N. durchgeführt und der anti-Kaninchen-Alexa 488-gekoppelte Antikörper in einer 1:500-Verdünnung eingesetzt.

2.5.7 Analyse des Mitochondrienpotentials

Für die Analyse des Mitochondrienpotentials wurde das *JC-1 Kit* (Invitrogen) verwendet. In gesunden Zellen bildet der Farbstoff JC-1 im negativ geladenen Mitochondrium rot fluoreszierende Komplexe (sichtbar im Fl-2-Kanal), während er in Zellen mit verringertem Mitochondrienpotential als grün fluoreszierendes Monomer im Zytoplasma verbleibt (detektierbar im Fl-1-Kanal).

Die abgelösten Zellen (etwa 50.000 Zellen pro Ansatz) wurden zweimal mit 500 μ l warmen PBS gewaschen und mit 2 μ M JC-1 in 100 μ l PBS versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Min. bei 37°C wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und an einem FACSCalibur untersucht. Für die Kontrollproben wurden 2 μ M des Entkopplers CCCP vor der Färbung zugegeben.

2.5.8 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und der mitochondrialen Masse

Für diese Untersuchungen wurden die Zellen mit spezifischen Farbstoffen angefärbt und im Durchflusssystem quantifiziert. Der Farbstoff *MitoTracker Red CMXRos* wird durch die mitochondriale Atmung zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt und kann daher für die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität verwendet werden. *MitoTracker Green* färbt die Mitochondrienmembran spezifisch an und kann somit zur Abschätzung der "mitochondrialen Masse" benutzt werden. Die Kombination dieser beiden Farbstoffe als Doppelfärbung kann zur Messung der dysfunktionalen Mitochondrien angewandt werden (Tal et al., 2009).

Die Farbstoffe wurden in einer Endkonzentration von jeweils 100 nM in PBS zu den abtrypsinierten Zellen (ca. 1×10^5) gegeben und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte direkt die Messung an einem Durchflusszytometer (*MitoTracker Green* im Fl-1-Kanal, *MitoTracker Red* im Fl-2-Kanal).

2.5.9 Analyse von murinen Blutproben auf den Immunstatus

Die Analyse der Blutproben wurde freundlicherweise von Frau Dr. Chiara Massa (Institut für Medizinische Immunologie) durchgeführt. Mäuseblut wurde durch Herzpunktion mit heparinisierten Spritzen entnommen und in EDTA-beschichteten Säulchen bis zur Analyse auf Eis gelagert. Die Erythrozyten der Proben wurden mit Erythrozytenlysepuffer entfernt und mit anti Maus-CD16/32 geblockt. Die verschiedenen Immunpopulationen wurden mit spezifischen Antikörpern bestimmt (CD4, CD8, CD11). Für den Ausschluss der toten Zellen wurden diese mit PI gefärbt.

2.5.10 Zellsortierung mittels Zellsorter

Die Sortierung der mCherry-markierten Zellen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Dagmar Riemann (Institut für Medizinische Immunologie) durchgeführt. 5×10^6 Zellen wurden in 4 ml HBSS resuspendiert und an einem FACSaria in steriles HBSS und 10 % (v/v) FKS gemäß ihrer Fluoreszenzstärke sortiert. Es wurden 50.000 Zellen unter sterilen Bedingungen gesammelt.

2.5.11 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Eine Einzelzellsuspension (ca. 5×10^4 Zellen) wurde in 250 μl Medium mit 10 μM Fura2 resuspendiert und für 15 Min. bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte am FACSCalibur (Fl-1-Kanal).

2.5.12 Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Ein Zellpellet (ca. 5×10^4 Zellen) wurde mit 10 μM 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (2,7-DCF) für 30 Min. bei 37°C inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer (Fl-1-Kanal).

2.6 Methoden der Zellbiologie

2.6.1 Bestimmung der Zellproliferation

Bestimmung der Proliferation durch XTT-Umsatz

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde durch die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzensulfonsäure) (*Cell Proliferation kit II*, Roche) untersucht. Da nur vitale Zellen die für den Umsatz benötigte mitochondriale Succinatdehydrogenase-Aktivität aufweisen, kann hierdurch auch auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden.

Die Durchführung erfolgte in 96-Lochplatten, wobei pro Vertiefung 5000 Zellen in 100 μl Phenolrot-freies Medium eingesät wurden. Für jeden Messpunkt über vier Tage wurde eine separate Platte angesetzt. Es wurden pro Loch 50 μl XTT-Lösung (hergestellt aus einem Teil PMS und

50 Teilen XTT-Reagenz) zugegeben und für vier Std. bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte an einem ELISA-Reader bei 490 nm (Em)/630 nm (Ex).

Bestimmung der Proliferation durch Einbau von 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU)

Da die mitochondriale Aktivität und somit die Glykolyse das Ergebnis des XTT-Assays beeinflusst, wurde die Proliferation noch mit einem Metabolismus-unabhängigen Test bestimmt. Der Einbau von BrdU erfolgte mittels *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* Komplettsystem (Roche) nach Anleitung. Die Auswertung erfolgte an einem ELISA-Reader bei 405 nm (Em)/490 nm (Ex).

2.6.2 Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums

Tumorzellen weisen die Fähigkeit auf, verankerungsunabhängig zu wachsen. Diese Eigenschaft wurde im sog. Weich-Agar-Test untersucht. Hierbei wurden zunächst 6 ml einer 0,6 %igen UNTERSCHICHT in 3,5 cm-Zellkulturschalen gefüllt und nach deren Aushärten mit 6 ml einer 0,3 %igen DECKSCHICHT und 20.000 darin vereinzelt Zellen überschichtet. Auf der Deckschicht wurden 500 µl Medium verteilt. Die Weichagarkulturen wurden für drei Wochen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, alle fünf Tage 500 µl Medium (und eventuell Inhibitoren) nachgefüllt (Abb. 2.5) und die Anzahl der Weichagarkolonien bestimmt.

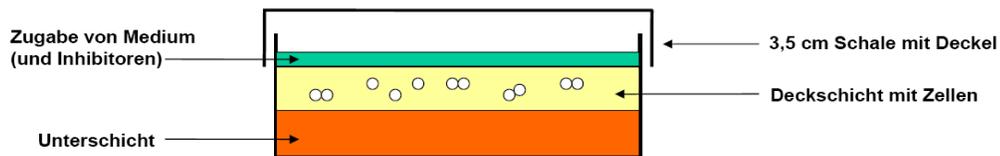


Abbildung 2.5: Darstellung des Weichagarwachstums. Auf die Oberfläche der Deckschicht wurde einmal wöchentlich etwa 500 µl Medium nachgefüllt. Bei Versuchen mit Inhibitoren wurden diese in der Endkonzentration zu dem Medium gegeben und dann auf den Weichagar pipettiert.

Zur Dokumentation wurden 500 µl Iodnitrotetrazoliumchloridlösung (5 mg/ml) auf die Deckschicht pipettiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die gefärbten Platten wurden am nächsten Tag eingescannt.

2.6.3 Bestimmung der Focusbildung

Die Fähigkeit von Tumorzellen in serumreduzierten Medium Kolonien zu bilden wurde mittels "Focusbildungs"-Tests untersucht. 1×10^6 Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 10 ml Medium eingesät und für 48 Std. bei 37°C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel auf 10 ml serumreduziertes Medium (mit 1 x Insulin-Transferrin-Selenium, 5 % (w/v) FKS) wurden die Zellen weitere drei Wochen inkubiert, wobei das Medium alle 5 Tage erneuert wurde. Nach Ablauf der Zeit wurden die Platten einmal mit 10 ml PBS gewaschen und dann für 20 Min. mit 10 ml eiskaltem Methanol auf Eis fixiert, mit 10 ml Methylenblau (1 % (w/v) in PBS) bei RT für 15 Min. gefärbt. Es wurde so lange mit Wasser entfärbt, bis das Waschwasser keine Farbe mehr aufwies und die Platten wurden invertiert ü.N. getrocknet. Die Dokumentation erfolgte an einem Scanner (Microtek).

2.6.4 Bestimmung des Migrations- und Invasionspotentials

2.6.4.1 Bestimmung des Migrationspotentials

Gesteigerte Migration und Invasion sind Kennzeichen von Tumorzellen. Es wurden Migrations-Einsätze (8 µm Porendurchmesser; Corning) für 24-Lochplatten verwendet. Der Boden einer 24-Lochkavität wurde mit 200 µl BESCHICHTUNGSLÖSUNG als Chemoattraktant bedeckt und für mind. 24 Std. bei 37°C inkubiert, dann einmal mit PBS gewaschen und 600 µl Medium mit 10 % (v/v) FKS eingefüllt. Ein wurde eingesetzt und in die obere Kammer 200 µl Kulturmedium mit 0,5 % (v/v) FKS und 50.000 Einzelzellen eingefüllt (Abb. 2.6). Den Zellen wurde für 20 Std. bei 37°C die Möglichkeit zur Migration gegeben, danach beide Medien abgesaugt, mit einem Wattestäbchen vorsichtig die nicht migrierten Zellen auf der Membranoberseite entfernt und der Einsatz zurück geführt. In die obere Kammer des Migrations-Einsatzes wurden 100 µl *CellTiter Glo* (Promega) gegeben, zwei Min. orbital geschwenkt und zehn Min. bei RT dunkel inkubiert. Die Dokumentation erfolgte an einem Luminometer: 50 µl Lysat wurden in eine weiße Messplatte überführt und die Lumineszenz vermessen. Die Migrationsansätze wurden auf die gesamte Anzahl an eingesäten Zellen normiert (Ansätze ohne Migrations-Einsätze, „Einsäekontrolle“).

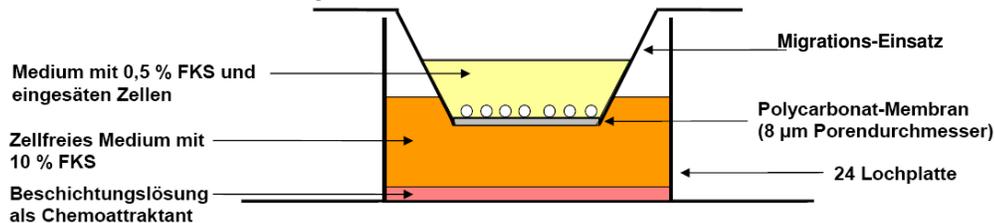


Abbildung 2.6: Anordnung für die Untersuchung des Migrationspotentials. Der kurzfristige Serumgradient soll die Migration der Zellen fördern. Durch die Beschichtung der Polycarbonatmembran mit Matrigel vor dem Beginn des Versuches konnte die Invasivität der Zellen bestimmt werden.

2.6.4.2 Bestimmung des Invasionspotentials (nach Albini et al., 1987)

Soll das Invasionspotential von Zellen bestimmt werden, so kamen Matrigel-beschichtete Migrationseinsätze zum Einsatz. Sekretieren Zellen ausreichende Mengen an extrazellulären Proteasen, so können sie das aus einem murinen Sarkom isolierte Matrigel, was überwiegend aus Strukturproteinen wie Laminin und Kollagen besteht, abbauen und durch die Matrix migrieren.

Der Versuch wurde wie in 2.6.4.1 beschrieben durchgeführt, die Migrations-Einsätze vor Beginn des Versuchs jedoch mit 50 µl unverdünntem Matrigel beschichtet, das für zwei Std. bei 37°C polymerisiert wurde. Das serumreduzierte Medium mit den Zellen wurde direkt auf das auspolymerisierte Matrigel gegeben. Bei Versuchsende wurden das Matrigel sowie darin anhaftende Zellen durch das Wattestäbchen komplett entfernt.

2.6.5 Bestimmung des Wundheilungsvermögens

Eine weitere Beurteilung der Migrationsfähigkeit wird durch *in vitro*-Wundheilungsversuche ermöglicht. Im Gegensatz zu den Migrations-Einsätzen, wo die Zellen durch eine engporige Membran wandern, wird hierbei die Fähigkeit untersucht zweidimensional zu wandern.

Dazu wurden Zellen in eine 24-Lochplatte mit 1 ml Medium eingesät und bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Die Zellen wurden für 24 Std. in serumreduzierten (0,5 % FKS) Medium gehalten, um Effekte der Proliferation zu umgehen und dann mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze eine gerade Wunde in den Zellrasen verursacht. Der Zellrasen wurde einmal mit PBS gewaschen und 1 ml serumreduziertes Medium eingefüllt. Direkt nach Verursachen der Wunde sowie nach verschiedenen Zeitabständen wurde die Wundfläche fotografiert. Die Wundfläche wurde mit dem Programm MetaVue 5.0r6 berechnet.

2.6.6 Bestimmung des Matrix-Kontraktionspotentials (nach Pins et al., 2000)

Die Kontraktilität des Zytoskeletts, welches einerseits die Morphologie der Zellen beeinflusst (s. u.a. Focibildung), andererseits auch auf die Migration Auswirkung hat, wurde nach der Methode von Pins, et al. untersucht, die die Fähigkeit der Zellen Gelmatrizes zu kontrahieren beschreibt.

Hierfür wurden Zellen mit DMEM (20 % FKS) und Kollagen Typ I auf Eis so gemischt, das die Zellanzahl bei $0,85 \times 10^5$ Zellen je ml und die Kollagenkonzentration bei 1 mg/ml lag. 2 ml hiervon wurden in 6-Lochplatten gefüllt und bei 37°C auspolymerisiert. Zu den festen Gelmatrizes wurden 3 ml DMEM-Medium gegeben und diese vorsichtig abgelöst, so dass sie frei schwammen. Über die Kultivierung bei 37°C hinweg wurde die Änderung der Größe der Gelmatrizes dokumentiert.

2.6.7 Bestimmung des Matrix-Adhäsionsvermögens (nach Chambers et al., 1993)

Die Adhäsionsfähigkeit von Zellen in Suspension zu verschiedenen Matrizes wurde hinsichtlich ihrer zeitlichen Abhängigkeit bestimmt. Hierfür wurden 96-Lochplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fibronectin sowie BSA und unbehandelte Kavitäten als Kontrollen für 24 Std. behandelt und danach 100 µl Kulturmedium mit 5000 Zellen eingesät. Die Zellen wurden 90 Min. bei 37°C inkubiert und dann mehrfach mit PBS gespült, um alle nicht-adhärenen Zellen zu entfernen. Die Zellzählung wurde mit *CellTiter Glo* wie unter 2.6.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.6.8 Bestimmung des Zell-Zell-Adhäsionsvermögens

1×10^5 mit Calcein AM-markierte Zellen (1 µM) wurden auf einen konfluenten Zellrasen von unmarkierten NIH3T3-Zellen in 100 µl Medium pro 96-Loch ausgesät und nach 90 Min. die nicht-adhärenen Zellen abgewaschen. Die verbleibenden Zellen wurden durch Trypsin abgelöst und gemessen. Als Eichgerade wurden Calcein AM-markierte Zellen mit bekannter Zellzahl verwendet.

2.6.9 Bestimmung der Glukoseaufnahmerate (O'Neil et al., 2005)

1×10^5 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte mit schwarzen Wänden und klarem Boden in 100 µl farbloses DMEM eingesät und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit 100 µl PBS gewaschen und mit 50 µl 2-NBDG (0,1 mM in PBS) für 20 Min. inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen, die Zellen mit PBS überschichtet, dann direkt bei RT in einem Fluoreszenzlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer

Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen. Als Kontrolle diente die gleichzeitige Zugabe und Inkubation von 50 μ M Apigenin, welches die Glukoseaufnahme hemmt.

2.6.10 Bestimmung der Zytotoxizität durch Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung

Die zytotoxische Wirkung einer Testsubstanz auf Zellen wurde durch die Freisetzung von LDH durch das *Cytotox 96 Nonradioactive Assay kit* (Promega) bestimmt. Pro Kavität einer 96-Lochplatte wurden 5000 Zellen in 100 μ l Phenolrot-freiem und serumreduzieren (0,5 % (v/v) FKS) Medium eingesät. Vier Std. danach wurde die Testsubstanz in mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und danach für acht Std. oder 24 Std. bei 37°C inkubiert. 50 μ l zellfreier Kulturüberstand wurden entnommen, in eine neue 96-Lochplatte überführt, 50 μ l LDH Substrat Mix zugegeben und 30 Min. inkubiert. Nach der Zugabe von 50 μ l Stopplösung wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte Zellen sowie Medium ohne Zellen als Leerwert. Die ermittelten Werte wurden auf die LDH-Gesamtaktivität in den eingesäten Zellen normiert, welche durch totale Zelllyse mit einem Lysepuffer (im *Kit* enthalten) erreicht wurde.

2.6.11 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität

In eine 96-Lochplatte mit schwarzen Wänden und klarem Boden wurden 5.000 Zellen in 100 μ l EMEM eingesät und 24 Std. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 100 μ l Substratreagenz (Bestehend aus einem Teil Caspase-3/7-Substrat auf 100 Teile Puffer; Promega) zugegeben. Die Platte wurde für zwei Std. bei RT lichtgeschützt auf einem Taumelschüttler inkubiert und dann die Fluoreszenz an einem Fluoreszenzlesegerät bei 499 nm Anregung und 521 nm Emission gemessen.

2.6.12 Bestimmung der *in vitro*-Angiogenese

Für die Bestimmung der *in vitro*-Angiogenese wurden pro 96-Lochkavität 30 μ l kaltes endotoxin-freies, wachstumsfaktorfreies Matrigel in eine 96-Lochplatte mit schwarzen Wänden gegeben und eine Std. bei 37°C polymerisiert. Pro Loch wurden nun 5000 HUVEC-Zellen in 100 μ l RPMI 1640 (mit 0,2 % (v/v) FKS) zugegeben, sowie 100 μ l konditioniertes, zellfreies Fibroblasten-Kulturmedium, oder als Kontrolle 100 μ l PBS. Die Zellen wurden für 18 Std. bei 37°C inkubiert und dann Bilder erstellt. Die Bilder wurden hinsichtlich geschlossener, Kapillar-ähnlicher Ringstrukturen und der Anzahl der Verzweigungspunkte gemäß den Kriterien von Zhang et al. (2013) beurteilt.

2.6.13 Bestimmung der Zellseneszenz

Die adhären Zellen wurden in 2 % (v/v) Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd für 15 Min. bei RT fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann in FÄRBE LÖSUNG bei 37°C über Nacht gefärbt. Die gefärbten Platten wurden am Mikroskop untersucht und fotografiert. Blau-grüngefärbte Zellen wiesen eine verstärkte Expression von β -Galaktosidase auf, welche symptomatisch für Seneszenz ist.

2.6.14 Bestimmung der mitochondrialen Atmungskaskade und der Glykolyse

Diese Experimente wurden von Frau Sandra Leisz (Medizinische Immunologie Halle) in der Arbeitsgruppe für translationale Tumor- und Transplantationsimmunologie (Universität Erlangen) an einem *XF Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience) durchgeführt. Für den Versuch wurden die Komplettsätze *XF Cell Mito Stress kit* und *XF Glyco Stress kit* nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (SVR) bzw. die extrazelluläre Ansäuerungsrate (EZAR) unter Normbedingungen und nach Zugabe von Inhibitoren gemessen. Aus den Daten der Kinetiken wurden die Reservekapazität der Atmung ((SVR nach Entkopplerzugabe/basale Respiration)*100) bzw. die glykolytische Kapazität ((EZAR nach Oligomycin-Zugabe/nicht-glykolytische Ansäuerung)*100), die Glykolyse ((EZAR nach Glukose-Zugabe/nicht-glykolytische Ansäuerung)*100) und die glykolytische Reserve (glykolytische Kapazität – Glykolyse) berechnet.

2.7 Methoden im Tiermodell

Zur Übertragung der *in vitro* Daten auf *in vivo* Daten wurde der Mausstamm DBA-1 sowie zur Bestimmung des Einflusses des Immunsystems die athymischen Nacktmäuse Fox-1^{nu} verwendet. Max. 5 Tiere/ Käfig wurden in einzelbelüfteten Käfigen auf Streu bei einer RT von 23°C, einer Humidität von 65 % und einem zwölf Std. Tag-Nachtwechsel gehalten. Jedes Tier hatte freien Zugang zu Wasser und Nahrungspellets *ad libitum*. Einmal wöchentlich wurden die Tiere auf neue Käfige umgesetzt. Die Tierversuche wurden behördlich durch den Stab Tierschutz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (Aktenzeichen 42502-2-1068MLU), gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes vorgenommen und vom Tierschutzbeauftragten überwacht.

2.7.1 Bestimmung des Tumorwachstums

Die Injektion der Tumorzellen sowie die Terminierung der Versuche wurden von Herrn PD Dr. vet. Bernhard Hiebl (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung) durchgeführt. Dabei wurden pro Tier 1×10^6 Zellen in 200 µl PBS in die rechte Rückenflanke der Tiere injiziert, sowie 200 µl PBS ohne Zellen in die linke Flanke als Kontrolle. Die Injektion wurde dabei unter Narkose der Tiere mit 1,5 Vol% Isofluran in Luft durchgeführt. Für die Versuche wurden pro Gruppe zehn Tiere beider Geschlechter mit einem Alter von zwei bis vier Monaten verwendet.

Über die nächsten 35 bis 42 Tage wurde dreimal wöchentlich das Gewicht der Tiere bestimmt sowie notiert, wann ein Tier einen Tumor gebildet hatte. Das Volumen des Tumors wurde mit Hilfe einer Schiebelehre bestimmt. Dabei wurde die größte Länge und die größte Höhe des Tumors gemessen und das sichtbare Tumolvolumen gemäß folgender Formel abgeschätzt:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = (\text{Länge des Tumors} \times \text{Höhe des Tumors}^2) \times 0,5$$

Des Weiteren wurden der Allgemeinzustand und das Verhalten der Tiere gemäß den Angaben von Morton und Griffiths (1985) beurteilt und ggf. betroffene Tiere aus dem Versuch genommen.

Die Tierversuche wurden nach etwa fünf Wochen beendet. Nach der Betäubung der Tiere mit 1,5 Vol% Isofluran in Luft wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Das Blut der Tiere wurde mittels einer heparinisierten Kanüle durch Herzpunktion entnommen und in Heparinlösung (25.000 U/ml) bei 4°C bis zur Messung gelagert (2.5.9). Die Organe wurden freigelegt und auf pathologische Abweichungen untersucht. Lunge, Niere, Leber wurden entnommen und für die Histologie aufgearbeitet (2.8.1). Der Tumor wurde als Ganzes entnommen, das Endvolumen bestimmt und das Aussehen dokumentiert. Teile des Tumors wurden für die RNA-Isolierung (2.3.1.2), für immunhistochemische (2.8.3) sowie immunologische Untersuchungen eingesetzt (2.5.9).

2.7.2 Bildgebende Verfahren

Nach Injektion von mCherry-markierten Zellen konnte das Tumorwachstum in den DBA-1-Mäusen mittels einer nicht invasiven *in vivo* Bilddarstellung nachvollzogen werden. Die Tiere wurden einmal wöchentlich in einem Kleintierimager unter Isofluranbetäubung untersucht (in Kooperation mit Frau Miriam Widder, Klinik für Innere Medizin IV). Als Filtereinstellungen wurde ein Grünfiltersatz gewählt (Anregungsfilter: 503 – 555 nm, Emissionsfilter: 580 nm LP, Aufnahmebedingungen: 550 – 800 nm, 10 nm Schritte). Das System ist in der Dissertation von Frau H. Caysa genau beschrieben worden (Caysa, 2013).

2.7.3 Bestimmung der *in vivo*-Angiogenese-Kapazität durch Matrigel-Plug-Untersuchung

Jedem Tier (DBA-1) wurden unter Narkose 500 µl eiskaltes Matrigel, das entweder mit 1×10^6 Zellen oder mit 100 µl PBS als Kontrolle versetzt war, in die rechte bzw. linke Flanke injiziert. Die Versuche wurden nach sieben Tagen durch Genickbruch der Tiere beendet, die Matrigel-Plugs entfernt, fotografiert, dann ein Teil für die histologische Untersuchung in 4,5 % (w/v) säurefreiem, phosphatgepufferten Formaldehyd (Roth) fixiert, während der andere Teil nach Gewichtsbestimmung in 1 ml PBS aufgenommen und am selben Tag eine Hämoglobinbestimmung (2.9.8) durchgeführt wurde.

2.8 Methoden der Histologie und Immunhistochemie

2.8.1 Fixierung von histologischen Proben und Einbettung in Paraffin

Die Organe und das Tumorgewebe wurden direkt nach der Entnahme unter einem Stereo-Dissektionsmikroskop von Fremdgewebe befreit und für max. 72 Std. in 15 ml 4,5 % (w/v) neutralgepuffertes Formaldehyd (Roth) gelagert. Dann wurden die Gewebe einmal mit PBS gewaschen und auf die Größe von Einbett-Kassetten zurechtgeschnitten. In diesen Kassetten erfolgte auch die Konservierung durch Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zur Aufnahme in Xylol in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica). Die Proben wurden in flüssigen Paraffin eingebettet und ü.N. ausgehärtet. An einem manuellen Mikrotom (Leica) wurden 5 µm

Schnitte angefertigt und jeweils drei Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Die Anheftung wurde bei Inkubation ü.N. in einem 37°C Inkubator durchgeführt.

Die Einbettung der Gewebeproben und das Anfertigen der Schnitte wurde freundlicherweise von Frau Bettina Ernst (Institut für Pathologie, Universität Halle) durchgeführt.

2.8.2 Histologische Färbungen

Für alle Färbungen wurden die Schnitte zunächst in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in destilliertem Wasser gespült (Xylol zweimal drei Min., 95 % Ethanol zweimal drei Min., 70 % Ethanol zweimal drei Min., zwei Min. H₂O). Es wurden unterschiedliche Färbeprotokolle eingesetzt, die an dem Institut für Pathologie in Halle durchgeführt wurden.

Azan-Färbung nach Heidenhain (Azan)

Diese Färbung stellt Zellkerne tief rot dar, das Zytoplasma erscheint rosa. Kollagenes und retikuläres Bindegewebe präsentiert sich tief blau, elastische Fasern sind hingegen ungefärbt oder rötlich-orange. Muskelgewebe zeigt sich je nach Fixierung rötlich bis orange. Die einzelnen Färbeschritte finden sich in Tab. A.10 im Anhang (Kapitel II.).

Giemsa-Färbung (GS)

Die Giemsa-Färbung wird zur differenzierten Darstellung von Blutbestandteilen verwendet. Die Präparate wurden fünf Min. in Methanol fixiert, getrocknet und dann mit Giemsa-Färbelösung für 15 Min. bei RT gefärbt. Anschließend wurde zweimal eine Min. mit Puffer gespült und getrocknet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE dient als Übersichtsfärbung. Sie färbt Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rot. Die Präparate wurden fünf Min. in Hämatoxylin (saurer Hämalaun nach Mayer) gefärbt, zwei Min. mit A. dest. gespült, in Leitungswasser zehn Min. lang gebläut. Es wurde fünf Min. in 0,1 % (w/v) Eosin gefärbt und danach zwei Min. in A. dest. gewaschen.

Masson-Goldner-Färbung (MG)

Durch diese Färbung werden verschiedene Strukturen des Bindegewebes differenziert dargestellt. Muskulatur und Zytoplasma erscheinen rot, Erythrozyten orange, Bindegewebe grün-blau, Zellkerne braunschwarz. Die Färbung wurde wie in Tab. A.11 (Anhang) beschrieben durchgeführt.

Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS)

Basalmembranen und andere kohlenhydrathaltigen Strukturen (Glykoproteine) werden rot-violett angefärbt. Die Durchführung gibt Tab. A.12 im Anhang (Kapitel II.) wieder.

2.8.3 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie (IHC) wurde eingesetzt, um Antigene in Gewebeschnitten zu lokalisieren. Dazu wurden die Gewebeschnitte mit einem primären Antikörper inkubiert, welcher von einem

HRP-markierten sekundären Antikörper erkannt wurde. Die HRP setzt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in ein braunes Produkt um, das nachgewiesen werden kann.

Die Schnitte wurden zweimal für jeweils fünf Min. in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Epitop-demaskierung für zehn Min. durch Aufkochen der Schnitte in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 und nachfolgend die Behandlung mit Blockierungspuffer (5 % (v/v) Ziegen Serum in PBS und 0,1 % (v/v) Tween 20) für eine Std. bei RT. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. A.8 im Anhang) wurde ü.N. bei 4°C durchgeführt. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS für jeweils fünf Min. gewaschen und für 30 Min. mit einem entsprechenden IHC-Sekundärantikörper inkubiert (*IHC Detection Reagent*, Cell Signaling). Nach drei Waschschritten in PBS wurden die Schnitte 30 Min. in der DAB-Lösung gefärbt und die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Intensität durch zweimaliges Waschen für jeweils fünf Min. in PBS gestoppt. Anschließend wurden die Gewebe mit 0,5 % (w/v) Methyleneblau, welches die Zellkerne spezifisch anfärbt, für zwei Min. gegengefärbt und die Schnitte mit einem Deckgläschen verschlossen.

Zum Nachweis der Apoptose im Gewebe wurde das *ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit* nach Herstellerangaben verwendet (Merck).

2.9 Methoden der Bioanalytik

2.9.1 Bestimmung von Metabolismusprodukten

2.9.1.1 Bestimmung von Laktat

Phenolrot-freie Kulturüberstände wurden gesammelt, durch Zentrifugation Zellfragmente abgetrennt und durch eine 10 kDa-Membran zur Eliminierung von Proteinen zentrifugiert. Die aufgearbeiteten Kulturüberstände wurden bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Laktatkonzentration in aufgearbeiteten Kulturüberständen wurde das *Lactate Assay kit* (Biovision) verwendet. Die Proben wurden 1:10 mit Lactat-Test-Puffer verdünnt und 50 µl davon in eine Kavität einer 96-Lochplatte gefüllt. Nach der Zugabe von 48 µl Lactat-Test-Puffer, 1 µl Lactat-Substrat und 1 µl Lactat Enzym-Mix wurde für 150 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert und an einem ELISA-Reader bei 570 nm die Extinktion vermessen. Mit einer Eichgerade wurde die Konzentration bestimmt. Für die intrazelluläre Laktat-Bestimmung wurde ein Zellpellet (2×10^6 Zellen) in 200 µl Lactat-Test-Puffer lysiert und wie oben beschrieben verarbeitet.

2.9.1.2 Bestimmung von Pyruvat

Ein Pellet von 1×10^6 Zellen wurde in 200 µl Pyruvat-Test-Puffer lysiert (*Pyruvate Assay kit*, Biovision) und 25 µl davon zu 25 µl Pyruvat-Test-Puffer in eine 96 Lochkavität gegeben. Pro Loch wurden nun 48 µl Pyruvat-Test-Puffer, 1 µl Pyruvat-Probe und 1 µl Pyruvat-Enzym-Mix zugegeben und für 30 Min. bei RT dunkel inkubiert. Die Messung erfolgte bei 570 nm gegen eine Eichgerade.

2.9.1.3 Bestimmung von Citrat

Ein Pellet von 2×10^6 Zellen wurde in 100 μl Citrat-Test-Puffer lysiert, zentrifugiert ($11.500 \times g$, 15 min) und 25 μl vom Überstand zu 25 μl Citrat-Test-Puffer in eine 96 Lochkavität gegeben. Pro Loch wurde ein Mix aus 47 μl Citrat-Test-Puffer, 1 μl Citrat-Enzym-Mix, 1 μl Entwickler und 1 μl Citrat-Probe zugefügt und 30 Min. bei RT dunkel inkubiert. Die Messung erfolgte bei 570 nm gegen eine Eichgerade. Alle Komponenten stammen aus dem *Citrate Assay kit* (Biovision).

2.9.1.4 Bestimmung von cAMP

Zur Bestimmung der cAMP-Konzentration wurden 5000 Zellen in eine 96 Lochplatte mit weißen Wänden und klarem Boden eingesät und 24 Std. in 100 μl Phenolrot-freiem DMEM kultiviert. Nach Entfernen des Kulturüberstandes wurden 20 μl PBS zugefügt und weiter nach Anleitung des *cAMP Glo Assay kits* (Promega) verfahren. Die Messung erfolgte an einem Luminometer.

2.9.2 Identifizierung von Proteinen mittels *Peptidmassenfingerprint* durch MALDI-TOF-MS

Zu analysierende Proteinspots wurden aus 2D-Gelen mittels eines *SpotHunters* (Herolab) ausgeschnitten (Durchmesser der Stanzstucke: $\sim 1,5$ mm) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Ausgeschnittene Banden wurden gereinigt, mittels Trypsin verdaut und auf entsprechende Träger aufgetragen (Stehle et al., 2015). Das Standardprotokoll findet sich im Anhang (Kapitel II.). Die Aufnahmen der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Frau Kristin Schulz und Frau Sandra Leisz (Institut für Medizinische Immunologie) an einem UltrafleXtreme Flugzeitmassenspektrometer (Bruker) bei einer Spannung von 25.000 V durchgeführt.

Die Massenspektren der differentiell exprimierten Proteine wurden mittels einer Internetdatenbank (MASCOT) analysiert. Parameter, welche in die Suchmaske eingetragen wurden, finden sich in Tab. 2.3. Für eine hohe Güte der Identifizierung muss dabei die Bewertung (*Score*) der Datenbank 57 oder mehr betragen.

Tabelle 2.3: Suchparameter für die MASCOT-Datenbank.

Parameter	Einstellung
Database	SwissProt [†]
Taxonomy	<i>Mus musculus</i> (house mouse)
Enzyme	Trypsin
Fixed Modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifications	Oxidation (M)
Allow up to	1 missed cleavage
Peptide tolerance	± 100 ppm
Mass values	MH ⁺
Peptide charge	1+, 2+ and 3+

[†] – öffentliche Datenbank.

2.9.3 Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (Grabowski et al., 2012)

Für die Bestimmung des intrazelluläre pH-Wert (pHi) wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-Carboxyfluorescein) angefärbt, der je nach pH-Wert seine maximale Emissionswellenlänge verändert, was Rückschlüsse auf den pHi zulässt.

1×10^6 Zellen in HBSS wurden mit $0,1 \mu\text{M}$ BCECF für 30 Min. bei 4°C gefärbt und zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden in 96-Lochplatten eingesät (1×10^4 Zellen/Loch), dann 24 Std. bei 37°C inkubiert (Normoxie oder Hypoxie) und dann direkt an einem Fluoreszenzlesegerät bei 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm vermessen. Über eine Std. bei RT und Normoxie wurde die Regeneration der pH-Werte nach Hypoxie untersucht. Für den Standard wurden 1×10^4 BCECF-markierte Zellen/96 Lochkavität in $100 \mu\text{l}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer mit bekannten pH-Werten sowie $25 \mu\text{M}$ Nigericin und 125mM KCl inkubiert.

2.9.4 Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration (GSH) (Recktenwald, 2009)

Für die Bestimmung der GSH-Konzentration wurde das GSH/GSSG-Komplettsystem von Merck verwendet. In einer 150 mm-Zellkulturschale wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 20 ml Medium ausgesät und 48 Std. bei 37°C und 5 % CO_2 -Partialdruck inkubiert. Der Zellrasen wurde zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen, dann die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt, in 1 ml PBS aufgenommen und bei $280 \times g$ sowie 4°C sedimentiert. Nach Resuspension der Zellen in jeweils $100 \mu\text{l}$ eiskalten PBS erfolgte die Zellyse durch Einfrieren bei -80°C für mehrere Stunden. Nach Auftauen der Zellen wurden $900 \mu\text{l}$ 5 % (w/v) meta-Phosphorsäure hinzupipettiert und der Ansatz für ca. 20 Sek. auf einem Tischschüttelgerät bei 2000 Upm gemischt. Zellrümpfer wurden mit $1000 \times g$ für fünf Min. abzentrifugiert, dann $50 \mu\text{l}$ Überstand entnommen und 1:30 mit Reaktionspuffer auf Eis verdünnt. Zur Bestimmung der Reaktionsrate wurden $200 \mu\text{l}$ verdünnte Probe mit $200 \mu\text{l}$ DTNB und $200 \mu\text{l}$ Glutathionreduktase in einer Halbmikroküvette gemischt, die Reaktion durch die Zugabe von $200 \mu\text{l}$ NADPH gestartet und die Zunahme der Absorption bei 412 nm über drei Min. an einem Spektralphotometer verfolgt. Parallel wurden Glutathionlösungen mit bekannter Konzentration (0, 1,5 und $3,0 \mu\text{M}$) auf die gleiche Weise analysiert und durch die Erstellung einer Kalibriergeraden die Nettoreaktionsrate für Glutathion bestimmt. Hiermit war die Berechnung der GSH in den einzelnen Proben mit folgender Formel möglich:

$$\text{GSH} = \frac{(\text{Nettoreaktionsrate GSH} - \text{Startabsorption Analytgerade}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Reaktionsrate Analytprobe}} \quad [\mu\text{M}]$$

2.9.5 Bestimmung der extrazellulären MMP-2-Konzentration

$100 \mu\text{l}$ Kulturüberstand bzw. Standard wurden pro Kavität einer 96-Lochplatte (mit anti-Maus-MMP-2 benetzt) pipettiert und 150 Min. auf einen Schüttler bei RT inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und viermal mit $300 \mu\text{l}$ Waschpuffer gewaschen. Danach wurden pro Kavität $100 \mu\text{l}$ biotinylierte Antikörper zugegeben und eine Std. bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde verworfen und wie vorher gewaschen. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ Streptavidin-Lösung zugegeben, 45 Min. schüttelnd bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Nach Zugabe von $100 \mu\text{l}$ TMB wurde bei RT für 30 Min. dunkel geschüttelt, $50 \mu\text{l}$ Stopp-Lösung zugegeben und bei 450 nm gegen einen Standard gemessen. Alle Komponenten stammten aus dem *Mus MMP-2-ELISA kit* (Raybio).

2.9.6 Bestimmung der extrazellulären Glykosaminoglykankonzentration (nach Frazier et al., 2008)

Nachweis mit Carbazol zur Bestimmung von Uronsäure-haltigen Glykosaminoglykanen (GAGs)

40 µl Probe, Standard oder Wasser als Blank wurden mit 200 µl 0,025 M Di-Natriumtetraborat in H₂SO₄ versetzt, gemischt und 15 Min. bei 99°C erhitzt, dann auf 4°C runtergekühlt. Es wurden 8 µl CARBAZOL-LÖSUNG zugegeben, gemischt und 15 Min. bei 99°C erhitzt. Es wurde erneut gemischt, dann 200 µl auf eine 96-Lochplatte gegeben und bei 530 nm vermessen. Als Standard wurde Heparin verwendet.

Nachweis mit Alcianblau zur Bestimmung Schwefel-haltiger GAGs

10 µl Probe, Standard oder Wasser wurden mit 100 µl ALCIANBLAU-LÖSUNG A vermischt, dann 10 µl ALCIANBLAU-LÖSUNG B zugeben, gemischt, fünf Min. bei RT inkubiert und zentrifugiert (11.600 x g, zehn Min., 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 350 µl 8 M Guanidin HCl gelöst. Nach Zentrifugation (11.600 x g, drei Min., RT) wurde der Überstand bei 600 nm gegen einen Heparinstandard vermessen.

Nachweis von Hyaluronsäure

Hyaluronsäure in den Kulturüberständen wurde mit einem ELISA nach Herstellerangaben (Echelon) quantifiziert. Es wurden 100 µl Kulturüberstand für jede Vertiefung verwendet.

2.9.7 Bestimmung des extrazellulären Kohlenhydratgehalts

Die reduzierenden Halbacetalgruppen von Kohlenhydraten lassen sich durch 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) nachweisen, welche zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert wird. Der die Reduktion begleitende Farbumschlag von gelb zu rot kann spektrophotometrisch bei 530 nm verfolgt werden. Zunächst ist es erforderlich, die vorhandenen Polysaccharide durch säurekatalysierte Hydrolyse in Mono- und Oligosaccharide zu spalten. Dazu wurden 100 µl Probe mit 1 Vol. 1 M HCl versetzt und 15 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht und abgekühlt. 50 µl hydrolysierte Probe wurde nachfolgend mit 100 µl DNSA-REAGENZ gemischt, fünf Min. in kochenden Wasser erhitzt, dann sofort auf Eis heruntergekühlt und gegen 530 nm vermessen. Als Eichsubstanz wurde Glukose verwendet.

2.9.8 Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in aus Mäusen entnommenen Matrigel-Plugs

Die entnommenen und in 1 ml PBS aufgenommenen *Plugs* wurden bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert. Die *Plugs* wurden mittels eines Ultra-Turrax gründlich homogenisiert, dann die nichtlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (fünf Min., 6.100 x g), 50 µl Überstand entnommen und mit 950 µl DRABKIN-REAGENZ gemischt. Nach Inkubation bei RT für 25 Min. wurden 100 µl entnommen und bei 570 nm vermessen. Als Eichsubstanz wurde Kontrollblut mit bekannter Hämoglobinkonzentration verwendet.

2.9.9 Bestimmung von enzymatischen Aktivitäten in Zellen

2.9.9.1 Bestimmung der PTEN-Aktivität in Zelllysaten (modifiziert nach Das et al., 2003)

Die Phosphatase-Aktivität von PTEN wurde untersucht, indem die Menge an umgesetzten Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP₃) in einer *in vitro* Reaktion bestimmt wurde. Dabei wurde freigesetztes Phosphat, welches Malachitgrün unter Einwirkung von Ammoniummolybdat umsetzt, analysiert. Der gebildete Molybdat-Malachitgrün-Phosphatkomplex kann spektrometrisch bei 630 nm bestimmt werden.

Etwa 100.000 Zellen wurden einmal mit HEPES-Puffer gewaschen und in 300 µl PHOSPHATFREIEM PTEN-PUFFER aufgenommen, dann für zweimal fünf Sek. beschallt und zentrifugiert (fünf Min., 6.100 x g). Das Zelllysate (der Überstand) wurde in PTEN-Puffer bis zu einer Proteinkonzentration von 0,1 µg/ml verdünnt und hiervon 10 µl mit 10 µl 0,1 mM PIP₃ (zur Liposomenbildung vorher in 500 µM 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-phosphoethanolamin, 20 mM HEPES und 1 mM EGTA für 30 Min. auf Eis in Glasröhrchen beschallen) in einer 96-Lochplatte gemischt. Nach Inkubation bei 37°C für 15 Min. wurden 100 µl AMM-LÖSUNG zugesetzt und bis zur Komplexbildung 15 Min. gewartet. Als Standard wurden bekannte Konzentrationen von KH₂PO₄ verwendet.

2.9.9.2 Bestimmung der Pyruvatkinase-Aktivität in Zelllysaten (nach Tietz und Ochoa, 1958)

In einer UV-Küvette wurden die folgenden Komponenten gemischt: 1 ml 0,06 M TrisHCl pH 7,5, 100 µl 0,12 M MgCl₂, 100 µl 2,25 M KCl, 100 µl 0,006 M ADP, 100 µl 0,043 M PEP (Phosphoenolpyruvat) und 100 µl 0,006 M NADH. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der Nullwert bei 340 nm bestimmt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µg Gesamtprotein gestartet. Die Änderung der Absorption bei 340 nm wurde für fünf Min. verfolgt.

2.9.9.3 Bestimmung der Aktivität der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette

Komplex I-Aktivität

50 µg mitochondriale Proteine wurden mit 1 ml NADH-PUFFER gemischt und die NADH-Oxidation bei 340 nm an einem UV-Spektrometer für eine Min. aufgenommen. Danach wurden 5 µl 10 mM Ubichinon-10 zugefügt und die Oxidationsrate für weitere zwei Min. verfolgt. Die Berechnung der Oxidationsrate erfolgte aus der Abnahme der Absorption über die Zeit bezogen auf den Extinktionskoeffizienten ϵ von NADH ($6,21 \text{ l} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 340 nm).

Komplex II-Aktivität

Succinat:Ubichinonoxidoreduktase-Aktivität wurde durch die Absorptionsänderung bei der Reduktion von Ubichinon-2 und Oxidation von Dichlorophenolindophenol (DCPIP) bestimmt. Dazu wurden 25 µg mitochondriale Proteine in 1 ml REAKTIONSPUFFER bei 600 nm für 30 Min. bei RT bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ϵ von DCPIP ist $21 \text{ l} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 600 nm. Succinatdehydrogenase-Aktivität wurde mittels MTT-Umsatz bestimmt: 50 µl 8,4 mM MTT und

50 µl 33,2 mM PMS wurden mit 100 µl Probe und 800 µl TrisHCl pH 8,2 versetzt und die Absorption bei 570 nm untersucht.

2.9.10 Bestimmung der extrazellulären H₂O₂-Konzentration

Die H₂O₂-Konzentration in Kulturmedien wurde mit der Methode nach Gay et al. (1999) bestimmt. Peroxide oxidieren unter sauren Bedingungen Fe²⁺ zu Fe³⁺, welches mit Xylenolorange einen farbigen Komplex bildet. 20 µl Probe oder H₂O₂-Standard wurden in einer 96-Lochplatte mit 200 µl DETEKTIONSLÖSUNG versetzt und 30 Min. bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 560 nm.

2.9.11 Bestimmung der Prenylierungsmuster der Ras-Proteine (nach Casey et al., 1989)

Proteinlysate wurden über Nacht bei -20°C mit 1 Vol. Aceton gefällt. Nach Zentrifugation (1500 x g, fünf Min.) wurde das Sediment zweimal für jeweils etwa sechs Std. bei 4°C mit 1 Vol. Aceton gewaschen und anschließend zur Entfernung von Lipiden zweimal mit 1 Vol. CHCl₃:MeOH (1:2) für jeweils mindestens zwölf Std. bei 4°C behandelt. Die Proteine wurden luftgetrocknet, dann in 600 µl 0,5 % Ameisensäure aufgenommen und die Spaltungsreaktion durch Zugabe von 100 µl Methyljodid gestartet. Es wurde 24 – 48 Std. bei 37°C unter Schütteln dunkel inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30 µl 2 mM Na₂CO₃ gequentscht. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit jeweils 400 µl CHCl₃:MeOH (9:1) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen getrocknet. Die trockene Probe wurde in 200 µl LÖSUNGSMITTEL A aufgenommen und auf eine HPLC-Säule (LiChrospher 100 RP-18, Durchmesser: 7 µm, Maße: 125 x 4 mm) injiziert. In einem linearen Gradienten (Volumen 40 ml) bis 100 % LÖSUNGSMITTEL B wurden die Isoprenoide aufgetrennt. Als Standard wurden die Reinsubstanzen Farnesol und Geranylgeraniol injiziert und aufgetrennt.

2.10 Methoden der Fluoreszenzmikroskopie

2.10.1 Apoptosenachweis durch Acridinorange-Ethidiumbromidfärbung

5000 Zellen wurden in eine 96-Lochplatte eingesät und für 24 Std. bei 37°C inkubiert. Es wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml und Acridinorange mit 15 µg/ml in PBS zugegeben und fünf Min. gefärbt. Die Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IRB) mit Grün-Rot-Filter.

2.10.2 Lokalisierung von CREB mittels Immunzytochemie (ICC)

Die Expression und Lokalisation von CREB auf Einzelzellebene wurde immunzytochemisch in 96-Lochplatten analysiert. Zu analysierende, adhärent wachsende Zellen wurden mit 100 µl Medium pro Loch unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert und nach Absaugen des Mediums wie in Tab. 2.4 beschrieben behandelt. Die Präparate wurden licht- und fluoreszenz-mikroskopisch (Leica DM IRB) unter Verwendung von Grün- bzw. Blau-Filtern analysiert und dokumentiert.

Tabelle 2.4: Arbeitsschritte der Immunzytochemie. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Vertiefung der 96-Lochplatte (mit schwarzen Wänden und klarem Boden). Ab Zugabe des Sekundärantikörpers wurde lichtgeschützt gearbeitet. Nach der Kernfärbung konnten die Zellen direkt untersucht werden.

Arbeitsschritt	Benötigte Lösungen	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]
Waschen	100 µl PBS	RT	1 x 0,5
Fixieren	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 200 µl HBSS	4	20
Waschen	200 µl HBSS	RT	1 x 0,5
Permeabilisieren	0,5 % (v/v) Triton X-100 in 200 µl HBSS (HBSS-T)	4	20
Blocken	1 % (w/v) BSA in 100 µl HBSS-T	RT	3 x 10
Bindung 1. AK	Primärantikörper ¹ in 50 µl HBSS-T	4	ü.N.
Waschen	200 µl HBSS-T	RT	4 x 1
Bindung 2. AK	0,1 µl anti-Kaninchen-IgG-Alexa 488 in 100 µl HBSS-T	RT	25
Waschen	200 µl HBSS-T	RT	3 x 1
Waschen	200 µl HBSS	RT	3 x 1
Kernfärbung	100 µl PBS und 0,1 µl DAPI (300 nM)	RT	1

¹ – Die Verdünnung des primären Antikörpers ist in Tab. A.8 im Anhang aufgeführt.

2.10.3 Anfärbung von Mitochondrien in Kombination mit der Immunzytochemie

Zellen wurden in 96-Lochplatten (schwarze Wände, klare Böden) eingesät (etwa 5000 Zellen pro Vertiefung) und für 24 Std. unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Für die Mitochondrienfärbung wurde der spezifische Farbstoff *MitoTracker Red CMXRos* verwendet, welcher zu lebenden Zellen in einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben wurde. Nach Inkubation bei 37°C für 30 Min. wurde mit 100 µl PBS gewaschen und die so gefärbten Zellen für die ICC verwendet. Dazu wurde nach dem Färben mit *MitoTracker Red CMXRos* direkt mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und weiter wie unter Tab. 2.4 ab Arbeitsschritt „Permeabilisieren“ beschrieben verfahren. Die Dokumentation erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit Rotfilter (BD Pathway 855).

2.11 Methoden der klinischen Überlebenszeitanalyse

Das Überleben von Patienten wurde durch die Datenbank KMplot.com abgeschätzt (Györfly et al., 2010; Györfly et al., 2013). Bei den aufgenommenen Kaplan-Meier-Kurven wurde die CREB-1-Expression mit bestimmten molekularen, histologischen oder patientenbezogenen Charakteristika (bspw. HER-2/neu-Expression, Differenzierungsgrad oder Geschlecht) in Korrelation zum Gesamtüberleben, Metastasen-freien oder Progressions-freien Überleben gesetzt. Die Daten wurden für Mamma-, Bronchial-, Ovarial- und Gastro-Karzinom für mindestens 25 Patienten ausgewertet.

2.12 Methoden der statistischen Auswertung

Alle Experimente wurden, wenn keine weiteren Angaben erfolgen, mit mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Für Versuche in 96-Lochplatten wurden zusätzlich pro biologischen Replikat drei technische Replikate durchgeführt. Bei den Proteomuntersuchungen wurden mindestens drei technische Replikate pro Experiment miteinander verglichen. Es sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Durchgänge angegeben. Für die statistische Auswertung wurden die Daten einem zweiseitigen t-Test unterzogen. Als statistisch signifikant wird dabei ein $P < 0,05$ angenommen (*) bzw. $P < 0,01$ als stark signifikant (**).

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Aktivität von CREB in humanen und murinen Zellen

3.1.1 Expression und Aktivität von CREB in murinen *in vitro* Modellsystemen onkogener Transformation

Um die Bedeutung von CREB für neoplastische Prozesse zu charakterisieren, wurde als erstes die mRNA- und Protein-Expression von CREB-1 in murinen NIH3T3-Zellen sowie Onkogen-transformierten Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit HER-2/neu bzw. mutiertem Ras (H-Ras^{G12V} oder K-Ras^{G12V}) transfizierte murine Fibroblasten eine stärkere Expression von CREB-1-mRNA im Vergleich zu nicht Onkogen-transformierten parentalen Zellen aufwiesen (Abb. 3.1A), die zwischen 1,9-fach (H-Ras^{G12V}) und 1,6 (K-Ras^{G12V}) bzw. 1,4-fach (HER-2/neu⁺) erhöht war. Das Vorliegen der onkogenen Transformation wurde in den K-Ras-Transfektanten durch Pyrosequenzierung, in HER-2/neu-überexprimierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (beide Daten nicht gezeigt) und in der H-Ras^{G12V}-Zelllinie durch Western-Blot bestätigt (Abb. 3.1C).

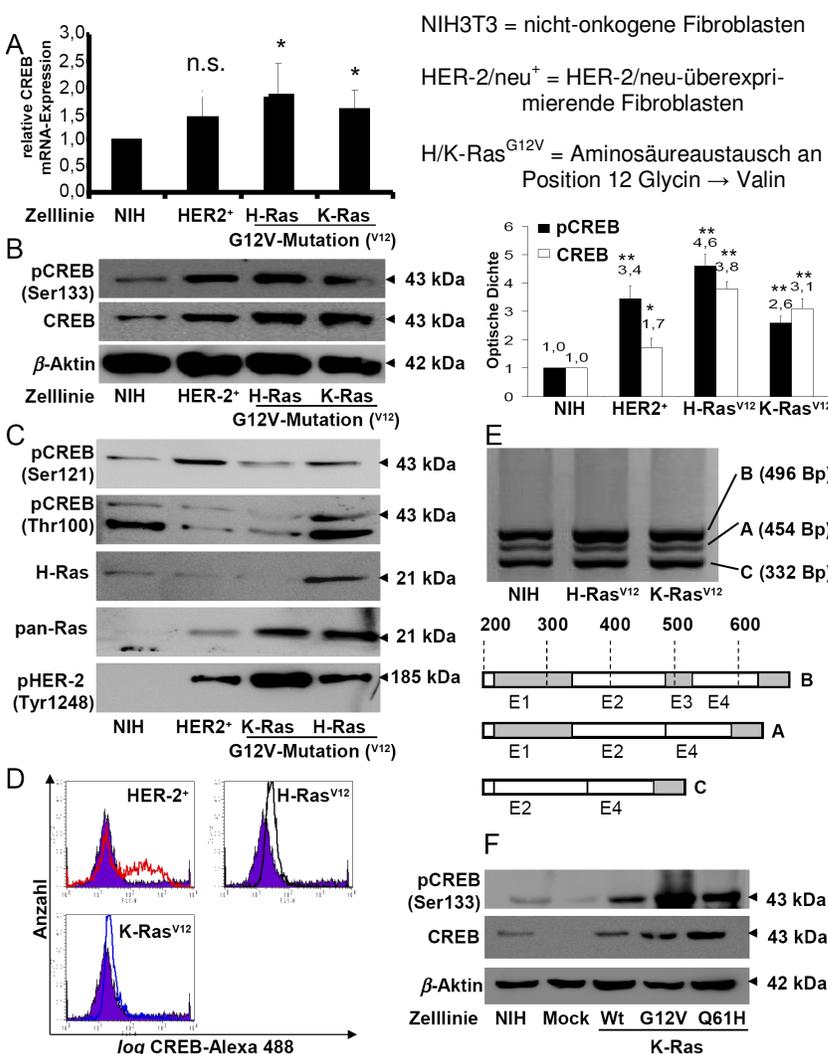


Abbildung 3.1: Expression von CREB in murinen Modellsystemen nach onkogener Transformation.

A. Die Expression von CREB-mRNA wurde in murinen Fibroblasten und den onkogenen Transformanten bestimmt. Die Daten zeigen drei Replikate. **B.** Die Proteinexpression und Aktivität von CREB wurde in parentalen und Onkogen-transformierten Zellen untersucht. Links, repräsentative Immunfärbung; Rechts, Quantifizierung des Verhältnisses (p)CREB/β-Aktin (n = 3). β-Aktin diente als Ladekontrolle. **C.** Die Expression von H-Ras, pan-Ras sowie die HER-2/neu und CREB-Phosphorylierung wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Ladekontrolle siehe B. **D.** Für die Variation der CREB-Expression in den Zellkulturen wurden die Zellen mit CREB-Antikörper behandelt und durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden insgesamt 5.000 Zellen pro Ansatz gemessen. violette Fläche = NIH3T3, rot = HER-2/neu⁺, blau = K-Ras^{V12}, schwarz = H-Ras^{V12}. **E.** Oben, Spleißvarianten der CREB-mRNA wurden mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert und auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht. Unten, Exon-Struktur des CREB-Gens. **F.** Die CREB-Expression und Aktivierung wurde in der Vektorkontrolle (Mock), mit K-Ras-Wildtyp-Überexpression (Wt) und den Mutanten G12V und Q61H sowie mit murinen Fibroblasten (NIH) verglichen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Analog zur Transkription war die Protein-Expression und Phosphorylierung von CREB-1 in den onkogenen Transfektanten erhöht. Die Zelllinie HER-2/neu⁺ wies eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung und Expression um 3,4- bzw. 1,7-fach im Vergleich zur Zelllinie NIH3T3 auf ebenso die Zelllinie K-Ras^{G12V} mit 2,6 bzw. 3,1-fach. Am stärksten war die Zunahme bei H-Ras^{G12V}-Zellen mit 4,6- / 3,8-fach (Abb. 3.1B). Dies wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt und mit Ausnahme bei den HER-2/neu⁺ eine homogene CREB-Verteilung nachgewiesen (Abb. 3.1D).

Die Analyse der CREB-1-mRNA identifizierte mindestens drei verschiedene Spleißvarianten, der verwendete CREB-Antikörper erkennt jedoch nur eine Form bei 43 kDa (Abb. 3.1E, WB siehe 3.1B). Um zu untersuchen, ob CREB allein durch die verstärkte Expression von K-Ras aktiviert wird oder die dominant positive Mutation für die Steigerung verantwortlich ist, wurde die Expression von CREB zusätzlich mit anderen K-Ras-Mutationen verglichen: Eine Expression von nicht mutierten K-Ras allein erhöhte die Expression von CREB nur um ca. 30 %. Im Gegensatz dazu führte die Mutation von K-Ras^{Q61H} zu einer deutlichen Zunahme von ca. 80 % (Abb. 3.1F).

Die Resultate zeigen, dass CREB bei der onkogenen Transformation von H-Ras^{G12V} (folgend H-Ras^{V12} bezeichnet) oder K-Ras^{G12V} (folgend K-Ras^{V12} bezeichnet) sowie HER-2/neu-Überexpression (HER-2/neu⁺) aktiver vorliegt.

3.1.2 Expression von CREB in humanen Tumorzelllinien und Tumorerläsionen

Expression von CREB in Kolonkarzinomzelllinien

Humane Kolonkarzinomzelllinien, insbesondere RKO, SW403 und SW480 zeigten im Vergleich zur normalen Kolonepithelzelllinie CoN eine stärkere Expression und/oder Phosphorylierung von CREB (Abb. 3.2A). Die Zelllinien SW403 und SW480 besitzen eine Punktmutation im K-Ras (G12V), während in der RKO-Zelllinie eine BRAF-Mutation (V600E) nachgewiesen wurde. Obwohl die Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 weder eine Ras- noch eine BRAF-Mutation trägt, zeigte diese Zelllinie eine starke CREB-Phosphorylierung. Diese Zelllinie besitzt jedoch eine Mutation im SMAD4-Gen, was auch mit einer veränderten CREB-Expression assoziiert wurde (Zhang et al., 2004) und welche stark mit der Entstehung von Kolonkarzinom gekoppelt ist. Bei den anderen getesteten Zelllinien war entweder die Phosphorylierung oder die Gesamtmenge von CREB im Vergleich zur Zelllinie CoN deutlich erhöht.

Die vorliegenden Daten zeigen somit, dass Überexpression bzw. Aktivierung von CREB mit verschiedenen onkogenen Prozessen in Kolonkarzinomen einhergeht.

Expression von CREB in HER-2/neu⁺ Brustkrebszelllinien

Um eine Korrelation von CREB mit HER-2/neu in humanen Tumorzellen nachzuweisen, wurde die Expression und Aktivität von CREB in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht. Diese Zelllinie wies eine deutlich sichtbare Expression von CREB und eine hohe Aktivität in Form von pCREB-Ser¹³³ auf (Abb. 3.2B). Eine Herunterregulation der HER-2/neu-Präsentation auf der

Zelloberfläche mittels shRNA-Konstrukten führte Dosis-abhängig zu einer Suppression der CREB-Expression. Eine Reduktion der HER-2/neu-Expression um 30 % führte zu einer leichten, eine Reduktion von HER-2/neu um 65 % zu einer starken Abnahme der CREB-Expression. Die Expression der Gesamt-CREB-Proteinmenge änderte sich ebenso wenig wie die Aktivität der 38 kDa-Bande, was nach Herstellerangaben dem Transkriptionsfaktor ATF-1 entspricht (Cell Signaling). Es konnte somit verdeutlicht werden, dass eine erhöhte Expression von HER-2/neu in humanen Tumorzellen mit einer verstärkten Phosphorylierung von CREB einhergehen kann.

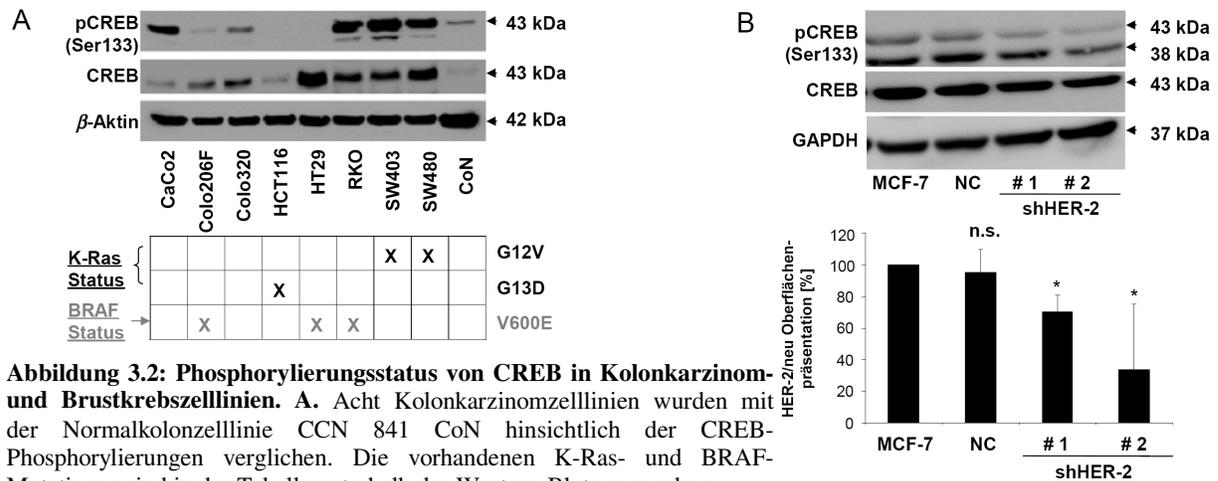


Abbildung 3.2: Phosphorylierungsstatus von CREB in Kolonkarzinom- und Brustkrebszelllinien. A. Acht Kolonkarzinomzelllinien wurden mit der Normalkolonzelllinie CCN 841 CoN hinsichtlich der CREB-Phosphorylierungen verglichen. Die vorhandenen K-Ras- und BRAF-Mutationen sind in der Tabelle unterhalb des Western-Blots angegeben.

B. Oben, Die Phosphorylierung von CREB wurde bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit den HER-2/neu-defizienten shHER-2-Zellen verglichen. Unten, Die durchflusszytometrisch nachgewiesene Expression von HER-2/neu verdeutlicht die Herunterregulation von HER-2/neu in den shHER-2 Klonen. #1 = Klon 1, #2 = Klon 2. MCF-7 stellen 100 % dar.

in situ Aktivität von CREB

Um die Zellmodelle mit klinischen Befunden abzugleichen, wurden vom Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg und dem Zentrum für Altersforschung in Chieti (Italien) immunohistochemische Untersuchungen an Tumorkläsionen von Brust- und Kolonkrebs durchgeführt, welche freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. An einem Panel von zwölf Brustkrebspatienten konnte dabei gezeigt werden, dass hierbei die Intensität der HER-2/neu-Färbung mit der pCREB-Ser¹³³-Färbung korrelierte, wobei die meisten Proben eine moderate HER-2/neu-Phosphorylierung in Kombination mit einer mäßigen pCREB-Färbung (+2/+2) aufwiesen (Abb. 3.3A). Unabhängig des HER-2/neu-Status zeigten von den 112 getesteten Tumorkläsionen aus Mammakarzinomen etwa 70 % eine schwache (+1) oder moderate (+2) Expression von CREB. Da nur 17 % der Tumore eine HER-2/neu-Überexpression aufwiesen, sind hierbei andere Faktoren zu suchen. Die Daten sind mit $p = 0,037$ signifikant. Die Patientendaten finden sich im Anhang (Kapitel VI.). Für die Untersuchungen bei Kolonkarzinom standen 23 Tumorkläsionen mit bekanntem K-Ras-Status zur Verfügung, bei denen die Expression von CREB und pCREB-Ser¹³³ untersucht wurde. Bei K-Ras^{V12}-mutierten Tumoren wiesen neun von 13 Schnitten (69 %) den höchsten Wert zwölf auf, im Gegensatz von sechs von zehn (60 %) bei den K-Ras Wildtypen (Wt)-Läsionen (Abb. 3.3B). Die Intensität der pCREB-Färbung erreichte hingegen nicht den höchsten Wert. Hier wiesen

40 % der Ras Wt-Läsionen einen Score von größer als 2 auf, bei den Ras^{V12} waren es 46 %. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant. Allerdings zeigten manche Tumorschnitte eine deutliche Abgrenzung von stark aktiven CREB-Bereichen und Bereichen mit negativer Färbung.

Es konnte somit verdeutlicht werden, dass eine erhöhte Expression von HER-2/neu mit einer verstärkten Phosphorylierung von CREB im Gewebe einhergeht.

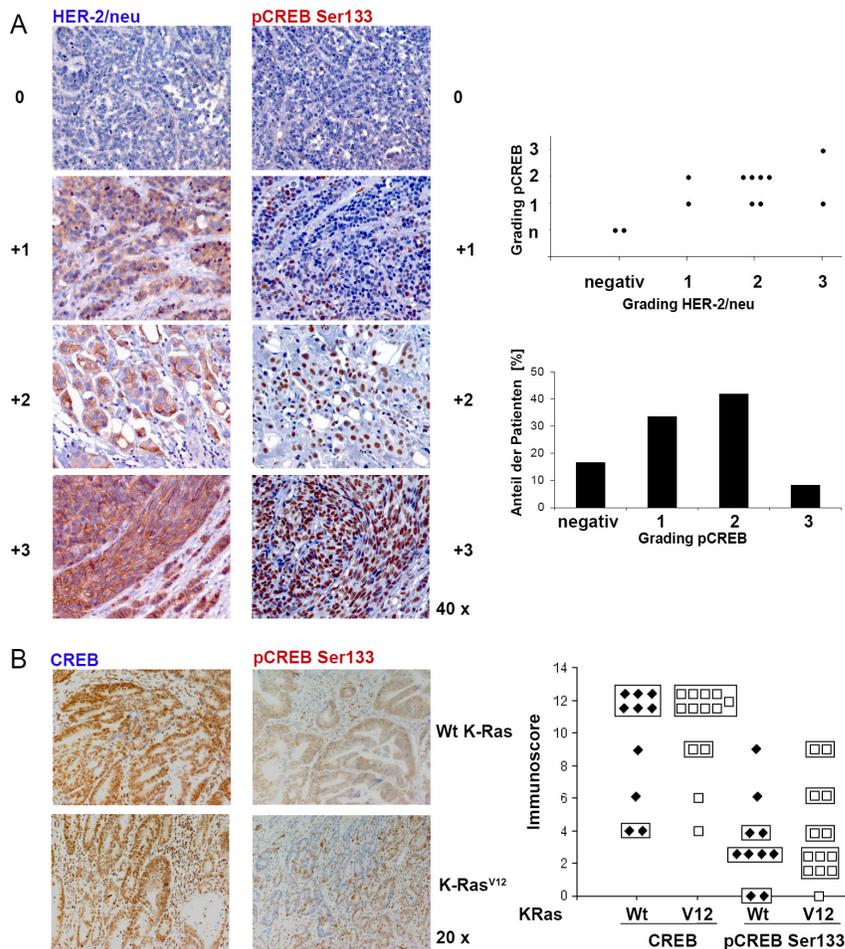


Abbildung 3.3: Korrelation der Expression von CREB mit Onkogenen bei Tumorerkrankungen aus humanen Patientenproben. A. Links, Beispielbilder von HER-2/neu und pCREB-Ser¹³³-Immunfärbung an histologischen Schnitten von Brustkrebsgewebe. Die Zahlen repräsentieren die Einteilung der Färbekraft in ein vierstufiges System (*Scoring*): 0 = keine Färbung, +1 = schwache Färbung, +2 = moderate Färbung, +3 = starke Färbung. Rechts, Darstellung von zwölf Patienten hinsichtlich der Einstufung HER-2/neu- und pCREB-Scoring. B. Links, Immunfärbung von Kolonkarzinomgewebe mit pCREB-Ser¹³³ und CREB. Angegeben ist der K-Ras-Status. Rechts, Darstellung von 23 Patienten hinsichtlich der Immunoscores CREB und pCREB unter Berücksichtigung des K-Ras-Status.

3.2 Einfluss von Signaltransduktions- und RTK-Inhibitoren auf die CREB-Aktivität

3.2.1 Strategien, um die CREB-Aktivität und Expression zu beeinflussen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die CREB-Aktivität für die Vermittlung der onkogenen Transformation von Bedeutung ist, wurden mögliche Strategien untersucht, in welchen CREB als therapeutische Zielstruktur dienen könnte. Es wurde hierbei auf die bisher beschriebenen Ansätze von Xiao et al. (2010) Bezug genommen (Abb. 3.4): Zunächst ist es möglich, mit Rezeptor-modulierenden Inhibitoren, wie Rezeptortyrosinkinase(RTK)-Inhibitoren (z.B. Lapatinib oder Sorafenib) die Initiation durch extrazelluläre Signale zu unterbinden. Diese Strategie scheint vor allem für Untersuchungen im Zusammenhang mit der HER-2/neu-Überexpression und CREB sinnvoll zu sein. Außerdem kann die Weiterleitung der Signale über verschiedene Signalwege unterbunden werden, wobei die nachfolgenden Ansätze wegen der Vielzahl von Signaltransduktionswegen

beispielhaft zu verstehen sind: Ein möglicher Weg ist die Aktivierung der PI3K mit anschließender Aktivierung von CREB über den AKT-Weg. Hierbei ist die Nutzung von Inhibitoren wie LY294002 und Wortmannin in der Zellkultur möglich. Bei dominanten Ras-Mutationen ist der MAPK-Weg stark in die CREB-Aktivierung involviert, und kann durch Trametinib inhibiert werden. Der cAMP-PKA-Weg ist vor allem in neuronalen Strukturen aktiv und in der Zellkultur durch z.B. Forskolin stimulierbar. Ionenkanäle für z.B. Ca^{2+} -Ionen können die PKC aktivieren.

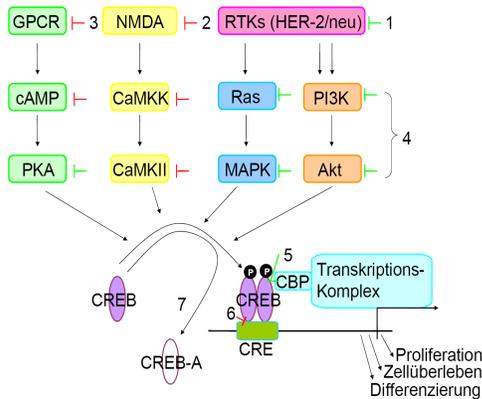


Abbildung 3.4: Strategien, CREB-Aktivität zu beeinflussen (verändert nach Xiao et al.). Inhibitoren der Gruppe 1 zielen auf die Hemmung von RTK wie HER-2/neu ab (Beispiel: Lapatinib), während die Gruppe 2 Ionenkanäle wie NMDA hemmt (Beispiel: Ketamin). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können mit Substanzen der Gruppe 3 (Beispiel: Betablocker) inhibiert werden. Signaltransduktionsinhibitoren (Gruppe 4) umfassen Inhibitoren für die intrazellulären Kinasen und G-Proteine (Beispiele: PI3K-Inhibitor LY294002, MAPK-Inhibitor Trametinib). Der Inhibitor KG501 kann die Interaktion zwischen CREB und dem CBP stören (Gruppe 5), während Surfenhydrat die DNA-Bindung von CREB unterbinden soll (Gruppe 6). Durch künstliche CRE-Elemente bzw. KID können die Signale abgefangen werden (Gruppe 7). In Grün sind die in dieser Arbeit verwendeten Zielstrukturen gekennzeichnet.

Ebenso kann versucht werden, die transkriptionelle Aktivität von CREB in den Zelllinien durch Unterdrückung der CREB-Bindung an das CRE-Motiv zu minimieren. Die in der Literatur dargestellten Möglichkeiten umfassen das Abfangen mit künstlichen CRE-Elementen (*decoy*) oder die Inkubation mit der Chemikalie Surfenhydrat (Xiao et al., 2010), wobei dieser experimentelle Ansatz in der Arbeit nicht verwendet wurde. Zuletzt kann auch verhindert werden, dass CREB mit seinen Ko-Aktivatoren, wie p300 oder CBP, interagiert. Naphthol-AS-E-phosphat (KG-501) wurde als geeignete Struktur identifiziert (Best et al., 2004) und wirkt als Inhibitor zwischen der KID von CREB und der KIX von CBP (Li und Xiao, 1999). Tabelle A.1 im Anhang fasst die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren nach Zielstruktur, Konzentrationen und Inkubationszeiten zusammen.

3.2.2 Inhibitoren modulieren die Aktivität von CREB

HER-2/neu-Modellsystem

In dem vorhandenen murinen HER-2/neu-Überexpressionssystem wurde der Einfluss von Inhibitoren, die die vier wesentlichen Signalwege (cAMP-PKA-Weg, Ras-MAPK-Weg, PI3K-AKT-Weg und PKC-Weg) blockieren, auf die CREB-Aktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in diesem Modellsystem die Aktivität von CREB v.a. durch den PKC-Inhibitor Ro-31-8220 und dem PI3K-Inhibitor LY294002 negativ beeinflusst wird (Abb. 3.5A). Die nicht transformierte NIH3T3 Zelllinie zeigte nur eine sehr schwache basale Aktivität von CREB, ERK und AKT, weshalb die verwendeten Inhibitoren keine Wirkung erzeugten (Daten nicht gezeigt). Das Abschalten des cAMP-PKA-Weges durch H89 und des MAPK-Weges durch PD98059 zeigte kaum Veränderungen. Daraus wird geschlossen, dass nach HER-2/neu-Überexpression die Aktivierung von CREB v.a. durch den PKC und PI3K/AKT-Weg verursacht wird. Daher wurden nachfolgend weitere

Inhibitoren, die diese Signalwege blockieren, verwendet. Um zu testen, ob die HER-2/neu-Überexpression direkt mit der CREB-Aktivierung assoziiert ist, wurden die HER-2/neu⁺-Zellen mit dem HER-2/neu-Inhibitor Lapatinib behandelt. Es wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der CREB-Aktivität nachgewiesen, wobei schon eine Behandlung der Zellen mit 2,5 μM Lapatinib für 24 Std. die Phosphorylierung von CREB vollständig inhibierte (Abb. 3.5B). Des Weiteren wurden verschiedene Chemotherapeutika, vorwiegend RTK-Inhibitoren eingesetzt (Abb. 3.5C). Sunitinib und Sorafenib inhibierten die CREB-Phosphorylierung komplett, während Doxorubicin-Behandlung nur eine schwache Hemmung der CREB-Aktivität zeigte. Alle Inhibitoren verursachten eine geringe Schädigung der Zellen in Form zunehmender Apoptose (Daten nicht gezeigt). Da v.a. der PI3K/AKT-Weg in den HER-2/neu⁺ für die CREB-Aktivierung eine Rolle spielt, wurde die Expression der Phosphatase PTEN untersucht. Dabei war die PTEN-Expression in den HER-2/neu⁺-Zellen leicht verringert (Abb. 3.5D), was auch die PTEN-Aktivität beeinflusste (Abb. 3.5E). Dies bedingte die starke Aktivität des PI3K/AKT-Weges. Ca²⁺ zeigte ebenfalls einen Einfluss (Abb. 3.5F), was auf die Wirkung von Calcium-regulierten Kinasen (PKC) auf pCREB hindeutet.

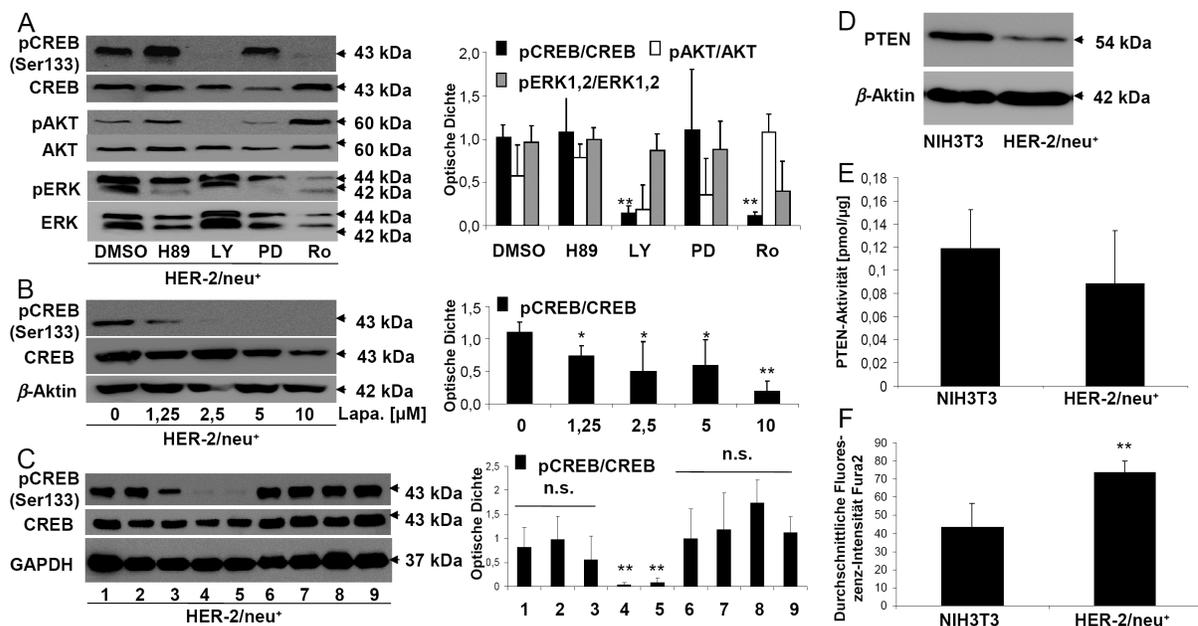


Abbildung 3.5: Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die CREB-Aktivität im HER-2/neu-Modellsystem. **A.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für 24 Std. mit verschiedenen Signaltransduktionsinhibitoren inkubiert (10 μM H89, 5 μM LY294002, 10 μM PD98059, 5 μM Ro31-8220) und die Phosphorylierung von CREB, AKT und ERK untersucht. Rechts, optische Dichte von drei unterschiedlichen Experimenten. Angegeben ist das Verhältnis pCREB/CREB, pAKT/AKT und pERK/ERK. **B.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für 24 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lapatinib (EGF-R/HER-2/neu-Inhibitor) behandelt und die CREB-Phosphorylierung untersucht. Rechts, optische Dichte von drei unterschiedlichen Experimenten. Angegeben ist das Verhältnis pCREB/CREB. **C.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für 24 Std. mit verschiedenen (RTK-)Inhibitoren behandelt. Spur 1, Paclitaxel (10 μM); Spur 2, Epoxomicin (10 μM); Spur 3, Doxorubicin (10 μM); Spur 4, Sunitinib (10 μM); Spur 5, Sorafenib (10 μM); Spur 6, Pazopanib (10 μM); Spur 7, RAD001 (5 μM); Spur 8, Axitinib (10 μM); Spur 9, DMSO. Links, repräsentative Immunfärbung; Rechts, Quantifizierung des Verhältnisses pCREB/CREB (n = 3). **D.** WB zur Bestimmung der PTEN-Expression. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **E.** Bestimmung der PTEN-Aktivität in HER-2/neu⁺ und NIH3T3-Zellen mittels Malachitgrün-Test. Die Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration bezogen und entspricht der Freisetzung von Phosphat (gemessen am Standard in pmol) in 1 Min. Reaktionszeit (n = 2). **F.** Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration mittels Fura-2-AM. Es wurden 10.000 Zellen mittels Durchflusszytometrie vermessen (n = 2).

RAS-Modellsysteme

Da in den K-Ras^{V12}- und H-Ras^{V12}-Zelllinien eine dominant positive Mutation vorliegt, wurden diese Zellen vorwiegend mit Inhibitoren behandelt, die die Aktivität von Ras hemmen. Bei den vier Hauptwegen der CREB-Aktivierung wurde mit dem PKC-Inhibitor ebenfalls der stärkste Effekt verursacht, jedoch war der PI3K-Inhibitor LY294002 hierbei weniger wirksam als in dem HER-2/neu-System (Abb. 3.6A; H-Ras^{V12} Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war der Effekt des MEK-Inhibitors PD98059 deutlich stärker, wobei die verwendete Konzentration nicht für eine komplette Stilllegung von CREB ausreichte. H89 zeigte auch hier die schwächste Wirkung der getesteten Signaltransduktionsinhibitoren.

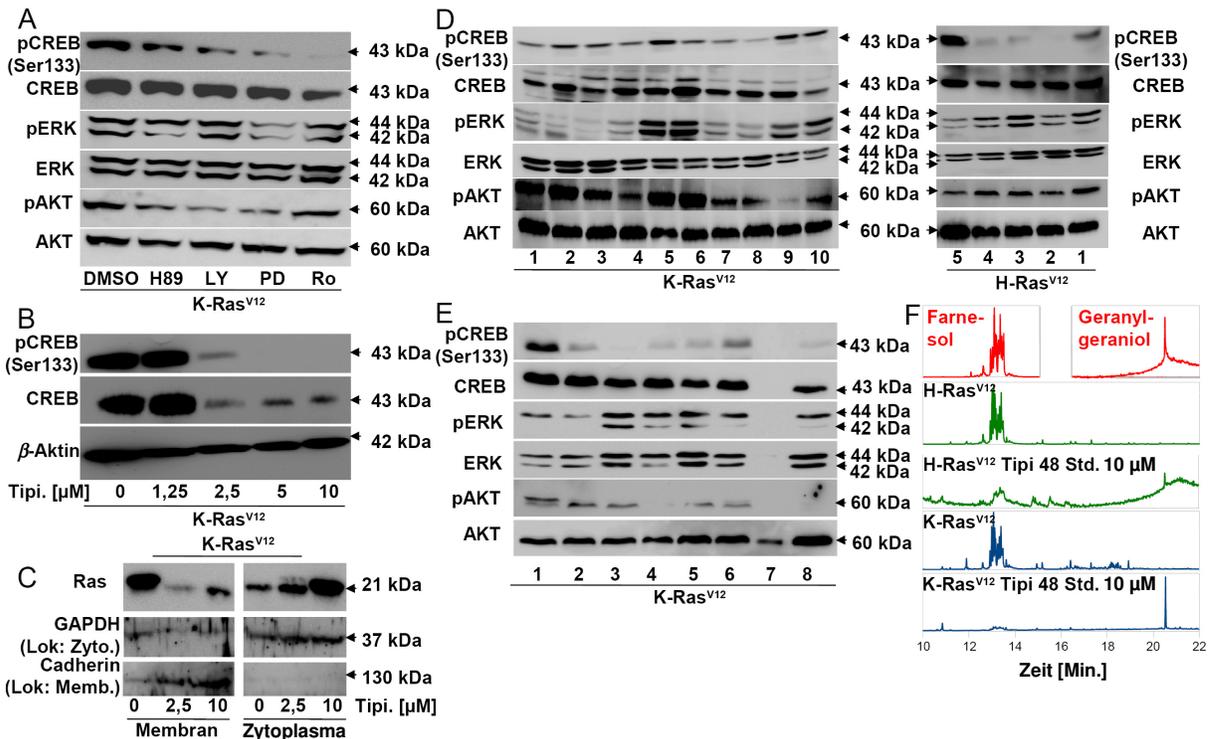


Abbildung 3.6: Einfluss von verschiedenen Inhibitoren auf die CREB-Aktivität im Ras-Modellsystem. **A.** K-Ras^{V12}-Zellen wurden für 24 Std. mit verschiedenen Signaltransduktionsinhibitoren inkubiert (10 µM H89, 5 µM LY294002, 10 µM PD98059, 5 µM Ro31-8220) und die Phosphorylierung von CREB, AKT und ERK untersucht. **B.** K-Ras^{V12}-Zellen wurden für 24 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen des FT-Inhibitors Tipifarnib behandelt. Die Phosphorylierung von CREB wurde mit spezifischen Antikörpern untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **C.** Fraktionierung der Proteine in Zytoplasma und Membran nach 24 Std. Tipifarnib-Behandlung. Cadherin dient als Membranmarker. **D.** H-Ras^{V12}- und K-Ras^{V12}-Zellen wurden für 48 Std. mit den folgenden Inhibitoren behandelt: 1 = Tipifarnib, 2 = Manumycin A, 3 = FPT III, 4 = FT-Inhibitor, 5 = DMSO, 6 = SN50, 7 = PD98059, 8 = Trametinib, 9 = Lapatinib, 10 = SB203580 (Konzentrationen s. Anhang). **E.** K-Ras^{V12}-Zellen wurden für 48 Std. mit den folgenden Inhibitoren behandelt: 1 = DMSO, 2 = Staurosporin, 3 = Ro31-8220, 4 = Wortmannin, 5 = LY294002, 6 = KG-501, 7 = Genistein, 8 = AKT-Inhibitor (Konzentrationen s. Anhang). **F.** HPLC-Analysen der organischen Extrakte nach Abspaltung der Prenylreste durch Methylierung. Es sind Ausschnitte aus dem zeitlichen Verlauf der chromatischen Analysen angegeben. Die Standards Farnesol und Geranylgeraniol sind rot dargestellt, H-Ras^{V12} grün und K-Ras^{V12} blau. Das Chromatogramm zeigt den Ausschnitt zwischen Minute zehn und Minute 22.

Da Ras durch einen Prenylrest an die Zellmembran gebunden wird und erst dann die Signale weitergeben kann, wurde der Einfluss des Farnesyltransferase-Inhibitors (FTI) Tipifarnib auf die K-Ras^{V12}-Zelllinie überprüft. Die Behandlung der Ras-Transformanten mit Tipifarnib für 24 Std. zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der CREB-Aktivität (Abb. 3.6B, H-Ras^{V12} Daten

nicht gezeigt). Durch Proteinfractionierung konnte nachgewiesen werden, dass K-Ras^{V12} unter kurzzeitiger Inkubation mit Tipifarnib seine Membranverankerung verliert, diese bei längerer Inkubation jedoch wieder erlangt (Abb. 3.6C, Daten nicht gezeigt). Nach 48 Std. war die CREB-Phosphorylierung im Falle der H-Ras^{V12}-Zelllinie bei allen Konzentrationen nicht mehr nachweisbar, während sie bei der K-Ras^{V12}-Zelllinie wieder auf dem Niveau der unbehandelten Zellen war (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher untersucht, ob die Zelllinien ihr Prenylierungsmuster ändern können. Unter normalen Kultivierungsbedingungen lagen beide Ras-Formen farnesyliert an der Membran vor und waren nicht stark im Zytoplasma lokalisiert. Die Behandlung mit Tipifarnib für 24 Std. veränderte das Prenylierungsmuster in beiden Zelllinien deutlich: Die Zelllinie H-Ras^{V12} zeigte nach Tipifarnib-Behandlung keine Prenylierung mehr und H-Ras war nun auch nicht mehr an der Membran assoziiert (Daten nicht gezeigt), was zur kompletten Blockierung der Signalweiterleitung führte. Die K-Ras^{V12}-Zellen zeigten eine deutliche Reduktion der Farnesylierung, jedoch waren größere Mengen an K-Ras-Protein im Zytoplasma vorhanden. Nach 48 Std. Behandlung war bei den H-Ras^{V12}-Zellen kein prenyliertes Ras mehr nachweisbar (Abb. 3.6F) und die CREB-Aktivität war auf dem Niveau der NIH3T3-Zellen. Hingegen kann bei den K-Ras^{V12}-Zellen nachgewiesen werden, dass die Prenylierung hier einer Geranyl-Geranylierung entsprach und das Ras wieder mit der Zytoplasmamembran assoziiert vorlag (Abb. 3.6F, Daten nicht gezeigt).

Es wurde ebenfalls getestet, ob Inhibitoren *downstream* von Ras Effekte auf CREB auslösen. Dazu wurden einerseits FTI und MEK/ERK-Inhibitoren verwendet (Abb. 3.6D), andererseits Inhibitoren der PKC und AKT (Abb. 3.6E). Alle Inhibitoren der zweiten Gruppe zeigten eine Abnahme der CREB-Phosphorylierung, FTI außer Tipifarnib waren bei K-Ras^{V12} kaum wirksam, bei den H-Ras^{V12} reduzierten alle FTI die CREB-Phosphorylierung deutlich. Von den ERK-Inhibitoren war Trametinib am effizientesten, während p38 und HER-2/neu-Inhibitoren keine Wirkung zeigten.

3.2.3 Funktionelle Analyse des KID/KIX-Inhibitors KG-501

Am Beispiel der Zelllinie HER-2/neu⁺ wurde der Einfluss von KG-501 auf die CREB-Aktivität untersucht. Der Inhibitor hatte im getesteten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB (Abb. 3.7A), während die mRNA-Expression von CBP nach 48 Std. Behandlung mit 10 µM KG-501 deutlich abnahm und nach 72 Std. verschwunden war (Abb. 3.7B). Die Expression anti-apoptotischer Gene, die durch CREB reguliert werden, wie bcl-xL oder bcl-2, wurde analog zur CREB-Transkription auch nicht beeinflusst oder stabilisierte sich schnell wieder (bcl-2) (Abb. 3.7B). Folglich war die Apoptose in den behandelten Zelllinien nur um ca. 25 % erhöht und blieb bei höheren Konzentrationen unverändert (Abb. 3.7C). Die Behandlung mit hohen KG-501-Konzentrationen hatte auf die Morphologie und die Foci-Bildung keinen Einfluss (Abb. 3.7D). Im Gegensatz dazu hemmte Lapatinib die Foci-Bildung von HER-2/neu⁺-Zellen, während die Expression von HER-2/neu unverändert war (Abb. 3.7E).

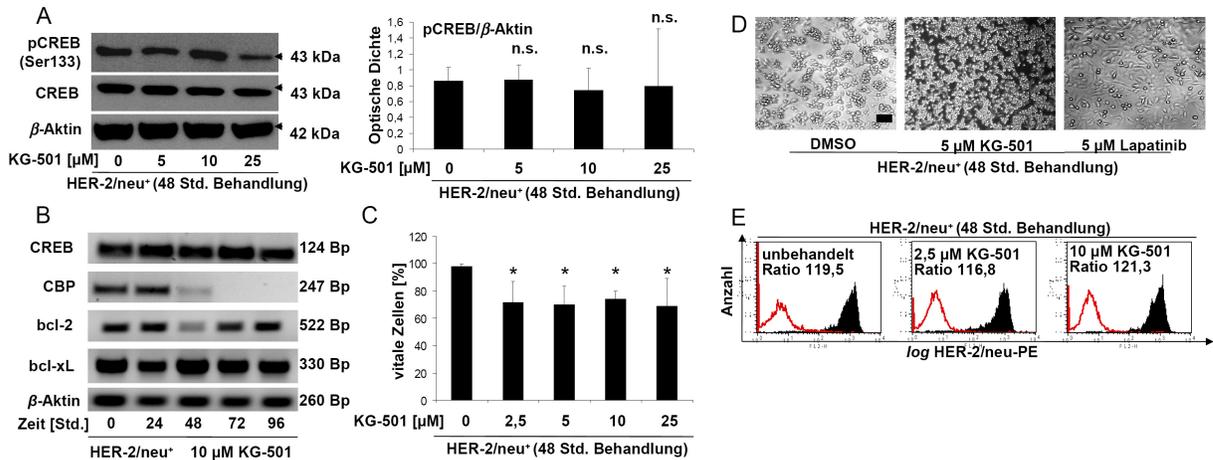


Abbildung 3.7: Hemmung der Interaktion von CREB und CBP durch KG-501. **A.** Der Einfluss von ansteigenden Konzentrationen an KG-501 auf die Phosphorylierung von CREB wurde mittels Western-Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Rechts, optische Dichte von drei unterschiedlichen Replikaten (pCREB/ β -Aktin). **B.** Die RNA-Expression von CREB, CBP und der anti-apoptotischen Gene bcl-2 und bcl-xL in KG-501 behandelten Zellen wurde mittels RT-PCR bestimmt und das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Bilder zeigen ein repräsentatives Ergebnis. β -Aktin diente als Haushaltsgen. **C.** Die Vitalität von HER-2/neu⁺-Zellen unter KG-501-Behandlung wurde durchflusszytometrisch an AnnexinV/PI-gefärbten Zellen bestimmt. Als vitale Zellen wurden nicht gefärbte Zellen bewertet. Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Replikaten. **D.** Mikroskopische Aufnahmen von HER-2/neu⁺-Zellen unter Behandlung mit KG-501 und Lapatinib sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Der Maßstab entspricht 80 μ m. **E.** Histogramme von mit unterschiedlichen Konzentrationen an KG-501 behandelten HER-2/neu⁺-Zellen sind hinsichtlich der Oberflächenexpression von HER-2/neu dargestellt. Die schwarze Fläche entspricht HER-2/neu und die rot abgegrenzte Fläche der Isotypkontrolle. Es wurden jeweils 5.000 Zellen gemessen. Das Verhältnis HER-2 : Isotypkontrolle ist angegeben.

In Konzentrationen > 2,5 μ M inhibierte KG-501 die Proliferation, (Abb 3.8A) und schränkte das Migrations- und Invasionspotential der Zellen ein (Abb. 3.8B). Die Fähigkeit der Zellen in Weichagar zu wachsen, konnte durch KG-501 deutlich reduziert werden und ist effektiver als Lapatinib (Abb. 3.8C).

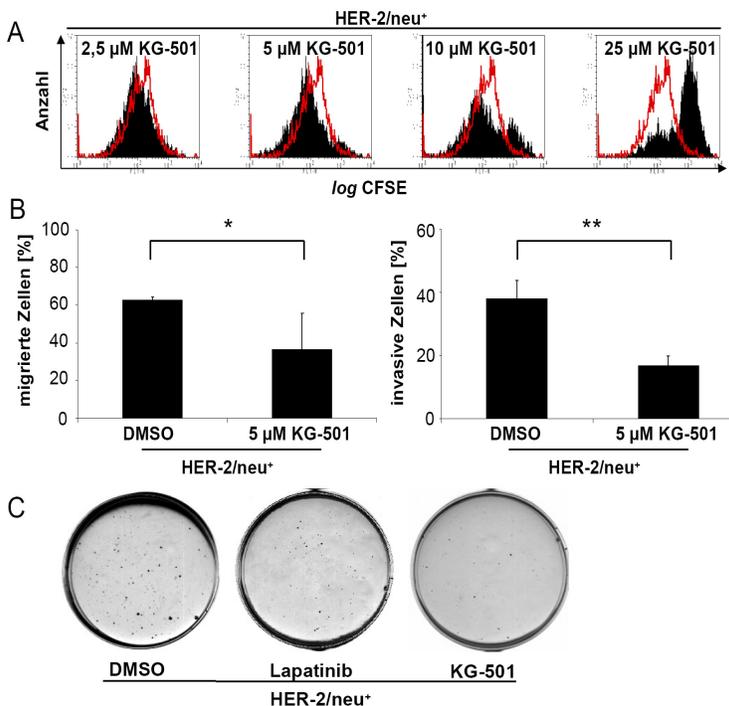


Abbildung 3.8: Hemmung der Interaktion von CREB und CBP beeinflusst Wachstumseigenschaften. **A.** Die Proliferation von KG-501 behandelten HER-2/neu⁺-Zellen wurde mittels CFSE-Verdünnungstest mit unbehandelten Zellen verglichen. In den Histogrammen repräsentieren die schwarzen Flächen die behandelten Zellen, während die unbehandelten Zellen von der rot begrenzten Fläche dargestellt werden. Die Zellen wurden für 96 Std. behandelt. **B.** Zellen wurden für 24 Std. mit 5 μ M KG-501 vorbehandelt und dann die Migrations- und Invasionsleistung nach Inhibitorbehandlung bestimmt. Diese wurde mit einer Lösungsmittelkontrolle verglichen (DMSO) (n = 3). **C.** Das verankerungsunabhängige Wachstum auf Weichagar wurde über drei Wochen unter dem Einfluss von 1,25 μ M KG-501 und 5 μ M Lapatinib mit unbehandelten Zellen (DMSO) verglichen.

3.3 Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in der onkogenen Transformation muriner Zellen

3.3.1 Etablierung eines CREB-Knock-down Systems

Um die Bedeutung von CREB in der onkogenen Transformation zu bestimmen, wurde in den Onkogen-transformierten Zelllinien und der Kontrollzelllinie NIH3T3 ein shRNA-vermittelter CREB-Knock-down (shCREB) durchgeführt. Hierdurch wurde die CREB-1-mRNA um bis zu 80 % reduziert, (Abb. 3.9A) und es zeigte sich auch eine reduzierte CREB-Protein-Expression (Abb. 3.9B), die in der Kultur homogen verteilt war (Abb. 3.9C). Als Kontrolle wurde ein *non-sense*-Konstrukt (NC) verwendet, das weder einen Einfluss auf die CREB-Expression und Aktivität besaß.

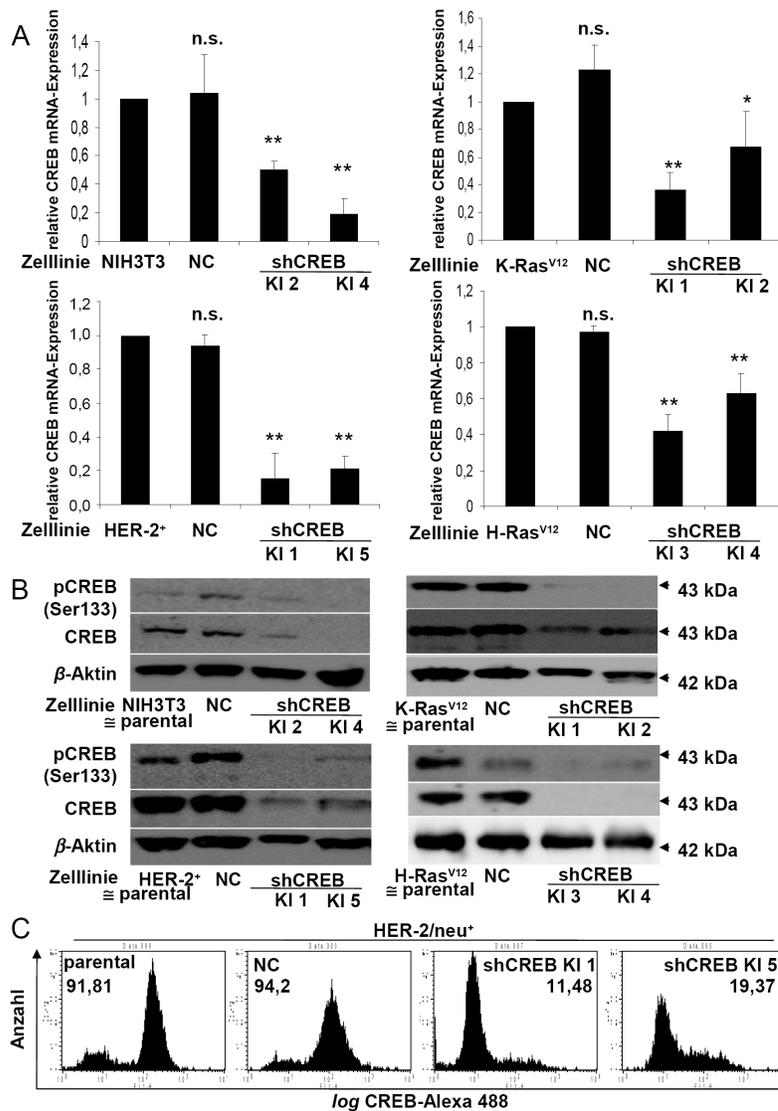


Abbildung 3.9: Etablierung von CREB-defizienten Zelllinien. **A.** Die mRNA-Expression von CREB-1 wurde in den parental Zelllinien sowie in NC und CREB-defizienten Zellen mittels qPCR untersucht und auf GAPDH normiert. Dargestellt sind zwei unabhängige Klone und die Kontrolle NC mit der jeweiligen parental Zelllinie. Die parental Zellen wurden auf „1“ normiert. **B.** Gesamtlysate der Zelllinien wurden mit Immunfärbung auf CREB-Expression und Aktivität untersucht. (n = 3). β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die untransfizierten Zelllinien NIH, HER-2/neu⁺, H-Ras^{V12} und K-Ras^{V12} werden folgend auch als „parentale“ Zellen bezeichnet. **C.** Durch Durchflusszytometrie wurde die CREB-Expression der einzelnen Zellen untersucht und als Histogramme dargestellt, um die Verteilung der CREB-Expression in der Kultur zu beurteilen. Der Mittelwert der Fluoreszenzen ist angegeben.

Um die Spezifität des CREB-Knock-downs zu überprüfen, wurde die Expression der CREB-ähnlichen Gene ATF-1 und CREM sowie der Onkogene analysiert. Es konnte weder eine signifikante Änderung der Transkription von ATF-1 und CREM (Abb. 3.10A, HER-2/neu⁺, H-Ras und K-Ras^{V12} Daten nicht gezeigt) noch von den Onkogenen nachgewiesen werden. Sowohl die

Expression von HER-2/neu auf der Zelloberfläche im Vergleich zur IgG-Kontrolle war unverändert (Abb. 3.10B), als auch die Menge an aktiven Ras (GTP-gebundenes Ras) war nicht wesentlich verändert (Abb. 3.10C), wobei die Ras-Mutation in den Zelllinien nachweisbar war (Abb. 3.10D).

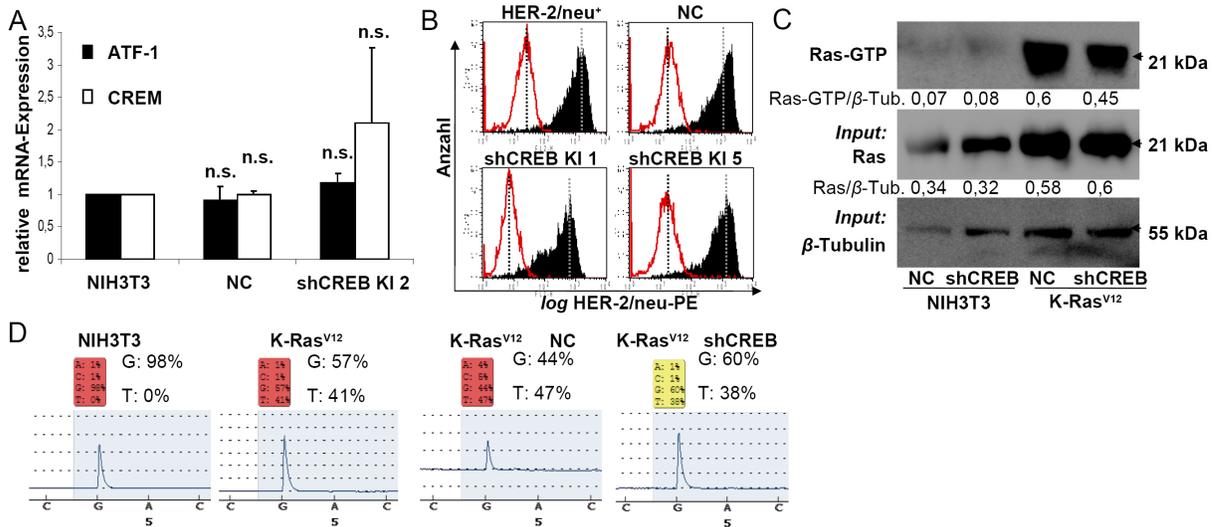


Abbildung 3.10: Unveränderte Expression CREB-verwandter Gene sowie der Onkogene nach CREB-Knock-down. **A.** Die mRNA-Expression der CREB-verwandten Gene ATF-1 und CREM wurde in den angegebenen CREB-defizienten Zellen durch qPCR bestimmt und mit den parentalen Zellen und der zugehörigen NC-Kontrolle verglichen. Die parentalen Zellen wurden für beide Gene auf „1“ normiert. (n = 3). **B.** Die Expression des HER-2/neu-Rezeptors auf der Zelloberfläche wurde durch Färbung mit einem PE-gekoppelten Antikörper in den HER-2/neu⁺-Zellen, den NC-Kontrollen und zwei CREB-Knock-down-Klonen gezeigt und ist als schwarze Fläche in den Histogrammen dargestellt. Die rot umrahmte Fläche entspricht der zugehörigen Isotypkontrolle, während die gestrichelten Vertikalen die Lage des Mittelwertes verdeutlichen. **C.** Mittels Ras-Pull-down und anschließender Immunfärbung wurde die Menge an aktiviertem Ras (Ras-GTP) in NIH3T3-Zellen, K-Ras^{V12} sowie deren CREB-defizienten Zellen bestimmt. *Input* entspricht derselben Proteinmenge, die anfänglich für den Pull-down verwendet wurde und verdeutlicht die gesteigerte Ras-Expression der K-Ras^{V12}-Zellen (Ras) sowie die vergleichbare Proteinbeladung (β -Tubulin). Das Verhältnis zwischen Ras-GTP/ β -Tubulin sowie Ras/ β -Tubulin ist angegeben. **D.** Das Vorliegen der Punktmutation G→T in Codon 12 der K-Ras^{V12} Mutation in der genomischen DNA der Zelllinien wurde durch Pyrosequenzierung bestätigt. Dargestellt ist der Ausschnitt des Pyrogramms zwischen Base 34 und 37. Die gefundenen Basen-% sind angegeben.

3.3.2 Einfluss des CREB-Knock-down auf die Proliferation der Zelllinien

Reduzierte Proliferation der CREB-defizienten Zellen

Eine Expression von Onkogenen geht oft mit einer deutlich gesteigerten Wachstumseigenschaft der Zellen einher. Um zu überprüfen, ob CREB bei diesem Prozess eine Rolle spielt, wurde die Generationszeit durch einen kolorimetrischen XTT-Test bestimmt. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass CREB-defiziente Zellen eine deutlich längere Generationszeit aufweisen als die NC-Kontrollen bzw. parentalen Zellen (Abb. 3.11A), was teilweise mit der Stärke des *Knock-downs* assoziiert war (NIH, H-Ras^{V12}). Da der XTT-Test auch auf der metabolischen Aktivität beruht, wurde die Proliferation weiterhin mit der stoffwechselunabhängigen CFSE-Methode bestimmt. In allen shCREB-Zelllinien konnte eine verringerte Proliferation bestätigt werden (Abb. 3.11B), jedoch zeigte sich der größte Unterschied zwischen CREB-reprimierten und parentalen Zellen bei den Zelllinien H-Ras^{V12} und HER-2/neu⁺, während NIH3T3 und K-Ras^{V12} hinsichtlich der Proliferation vergleichbar waren. Dies konnte auch durch die Messung der DNA-Synthese mittels BrdU-Einbau bestätigt werden (Abb. 3.11C).

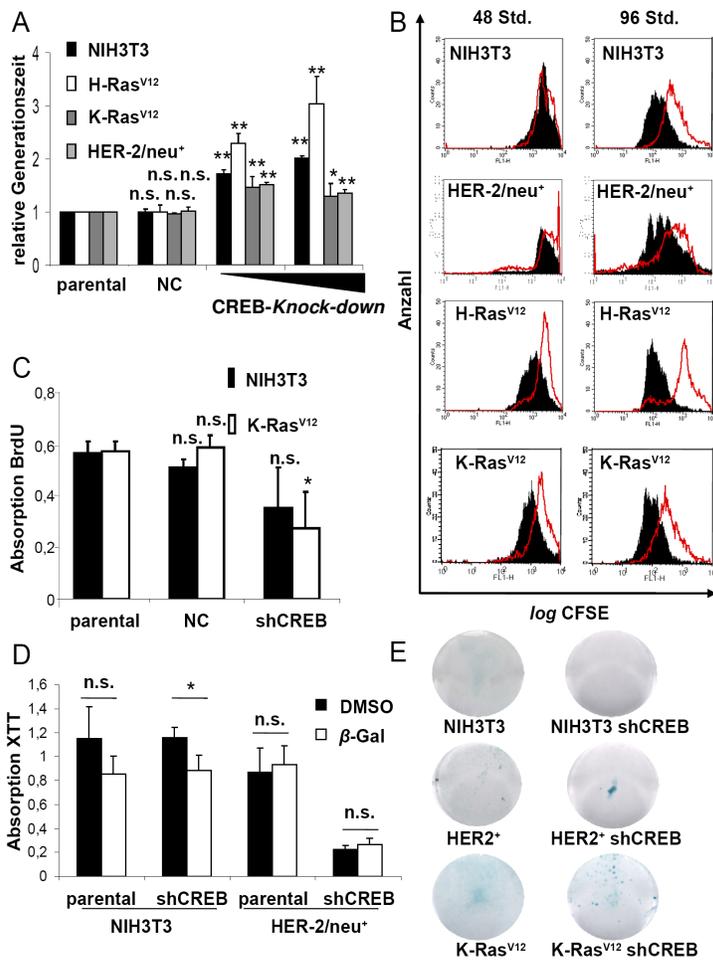


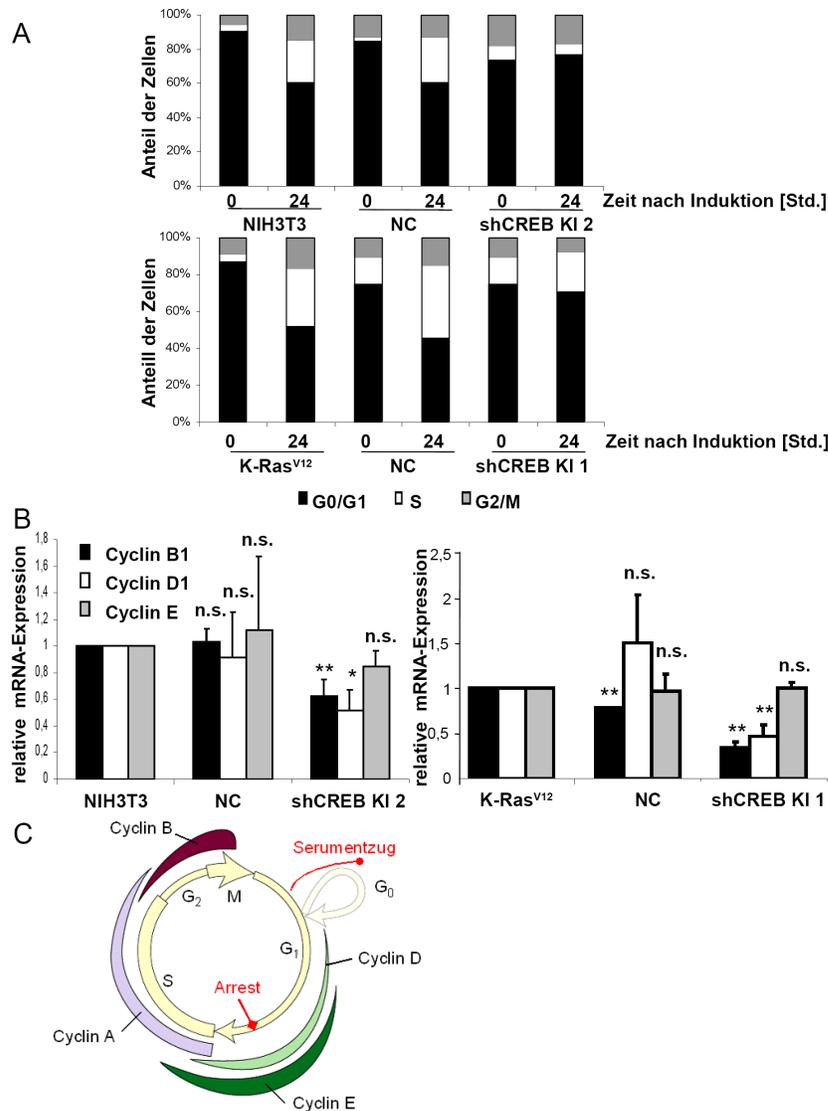
Abbildung 3.11: Verringerte Proliferation und erhöhte Generationszeit nach CREB-Knock-down. A. 5000 Zellen wurden eingesät und zu verschiedenen Zeitpunkten die mitochondriale Succinatdehydrogenase-Aktivität bestimmt. Aus der Zunahme der Aktivität innerhalb 24 Std. wurde die Generationszeit innerhalb des logarithmischen Wachstums bestimmt. (n = 3). Die Klone der CREB-defizienten Zellen sind hinsichtlich ihres *Knock-downs* angeordnet (Säulen ganz rechts entsprechen dem höchsten *Knock-down*, die jeweils zweiten Säulen von rechts dem Klon mit der geringeren Defizienz). B. Überlagerte Histogramme von CFSE-gefärbten Zellen sind 48 Std. und 96 Std. nach Färbung und Beginn der Kultivierung gezeigt. Schwarze Flächen stellen die parental und rote abgegrenzte Flächen die CREB-defizienten Zellen dar. Es wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. C. In einem BrdU-ELISA wurde die DNA-Synthese der NIH3T3 und K-Ras^{V12} sowie ihrer shCREB-Varianten in 24 Std. bestimmt. Die Abbildung zeigt die Absorptionswerte (n = 3). Alle HER-2/neu⁺ und H-Ras^{V12}-Zelllinien zeigten eine deutlich verringerte Adhäsion und wurden daher nicht ausgewertet. D. Die Wirkung von 5 μ M β -Galaktosidase in 24 Std. auf die Proliferation wurde im XTT-Test untersucht (n = 3). E. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität zur Abschätzung der Seneszenz. Es ist jeweils eine 3 Tage alte 6-Lochvertiefung nach Anfärbung gezeigt.

Auf Zugabe wachstumshemmender Faktoren wie β -Galaktosidase reagierten die parentalen NIH3T3-Fibroblasten, nicht jedoch die onkogenen K-Ras^{V12}, H-Ras^{V12} und die HER-2/neu⁺ und deren CREB-defiziente Transformanten (Abb. 3.11D, Daten nicht gezeigt). Da dieses inhierte Zellwachstum von Alterungsprozessen begleitet werden kann, wurden diese durch chromatischen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität untersucht. CREB-defiziente HER-2/neu⁺- und K-Ras^{V12}-Zellen zeigten in der Mitte einer Kultur eine verstärkte Aktivität in Form des umgesetzten X-Gal (Abb. 3.11E), bei den NIH3T3 war diese Aktivität jedoch deutlich schwächer.

Zellzyklus-Arrest nach CREB-Knock-down

Die veränderte Proliferation durch CREB-Knock-down geht auch mit einem veränderten Zellzyklus einher: Nach Synchronisation durch Serumentzug und anschließendem „Aushungern“ wurden die Zellen vermehrt in der G₀/G₁-Phase arretiert. CREB-defiziente Zellen zeigten hierbei jedoch eine verstärkte Apoptose (s. Abb. 3.44A) und wiesen einen geringeren Anteil an synchronisierten Zellen auf. Eine anschließende Serumzugabe ließ die Zellen wieder proliferieren (Abb. 3.12A). Nach 24 Std. wiesen die CREB-defizienten Zelllinien einen unveränderten bzw. deutlich verringerten Anteil an Zellen in der S-Phase im Vergleich zu den NC auf. Die Arretierung der shCREB-Klone in

der G₁-Phase beruht auf der verminderten Expression verschiedener Cycline (Abb. 3.12B): Die Expression der Cycline B1 und D1 war in den onkogenen Transformanten um ca. 50 % reduziert, in den NIH3T3 etwa um 40 % (HER-2/neu⁺ und H-Ras^{V12} Daten nicht gezeigt). Dadurch wird der Übergang G₁-S gehemmt, es tritt ein Zellzyklusarrest auf (Abb. 3.12C).



3.3.3 Einfluss des CREB-Knock-downs auf die Überlebensfähigkeit der Zelllinien

Verringerte Überlebensfähigkeit nach CREB-Knock-down

Die Überlebensfähigkeit der Zellen nach CREB-Knock-down wurde durch die Messung der apoptotischen und nekrotischen Zellen beschrieben. Hierbei wurde der Farbstoff Annexin V-FITC für den Nachweis der apoptotischen und PI für die Färbung der nekrotischen Zellen verwendet. CREB-Knock-down führte zu einer deutlichen Zunahme der apoptotischen und nekrotischen Zellen (Abb. 3.13A), während die NC-Kontrolle keinen Einfluss zeigte. Der höchste Anteil an toten Zellen wurde bei einem CREB-defizienten Klon der NIH3T3-Zellen gefunden (72 % AnnV⁺ Zellen/PI, 5 % Ann⁺/PI⁺), während bei einem Klon der Zelllinie HER-2/neu mit 29 % der höchste Anteil an

doppelt gefärbten Zellen gefunden wurde. In den H-Ras^{V12}-Zellen führte der CREB-*Knock-down* nur zu einem Vitalitätsverlust von durchschnittlich 15 %.

Um eine Schädigung der Zellen durch die Präparation (bspw. durch zu lange Trypsineinwirkung oder Verlust der Adhärenz) auszuschließen, erfolgte die Vitalitätsbestimmung zusätzlich mit einer Acridinorange-Ethidiumbromidfärbung, bei der kein Ablösen der Zellen erforderlich ist. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten unter CREB-Defizienz eine Akkumulation von rot-fluoreszierenden, nekrotischen Zellen, bei denen der Vitalfarbstoff Acridinorange nicht bindet und Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert, sowie gelbe, doppelt gefärbte Zellen (Abb. 3.13B). Hierdurch konnten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie bestätigt werden.

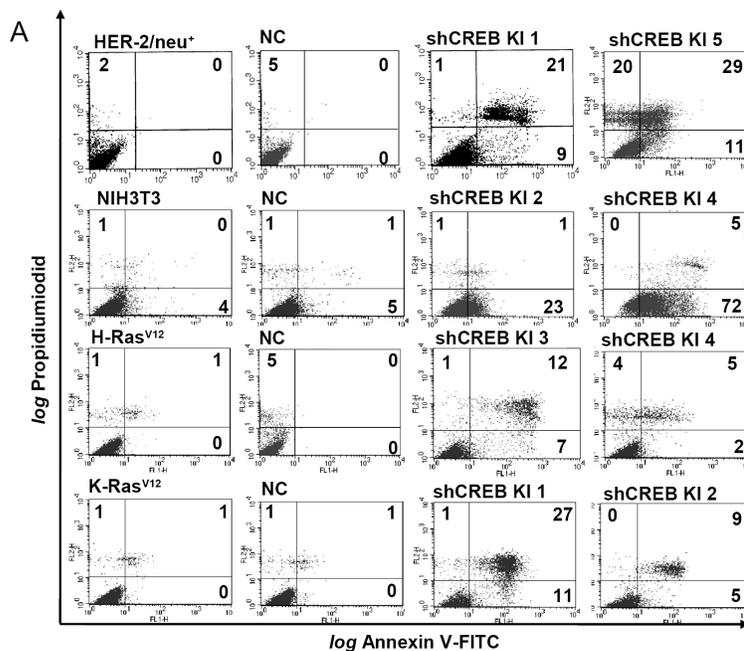
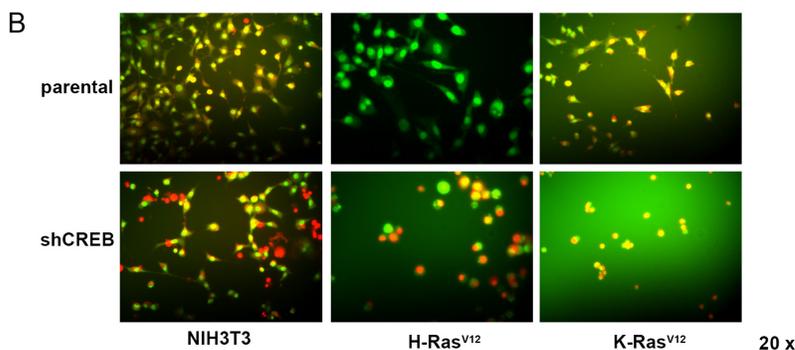


Abbildung 3.13: Erhöhte Apoptose in murinen Fibroblasten bei CREB-*Knock-down*. **A.** Apoptose wurde durch AnnexinV/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Beispielhaft sind Dot Plots von mindestens drei unterschiedlichen Replikaten dargestellt. Die Quadranten wurden anhand der ungefärbten bzw. einzeln gefärbten Zellen eingeteilt. Die Zahlen geben den Anteil der Zellen in den einzelnen Quadranten an. **B.** Zellen wurden mit Acridinorange-Ethidiumbromid gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dargestellt sind die Falschfarben (grün = Acridinorange, rot = Ethidiumbromid) in der Überlagerung. Die primäre Vergrößerung des Objektivs ist angegeben.



*Aktivierung von Caspase-3 nach CREB-*Knock-down* begünstigt Apoptose*

Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird in der Literatur (Pugazhenti et al., 2000) als direktes Ziel von CREB angegeben. CREB-*Knock-down* führte zu einer deutlichen Herunterregulation von bcl-2- und bcl-xL-mRNA, während deutlich mehr Transkriptmenge des pro-apoptotischen Bax nach CREB-*Knock-down* detektiert wurde (Abb. 3.14A). Die veränderte Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie ist ein Hinweis auf die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges. Daher wurde

die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 näher untersucht. Eine reduzierte Expression von CREB führte bei allen Zelllinien zu einem verstärkten Auftreten der geschnittenen, aktiven Form von Caspase-3, wobei der höchste Anteil bei den NIH3T3 shCREB Klonen detektiert wurde (56 bzw. 77 %). CREB-defiziente Klone anderer Zelllinien wiesen eine verringerte Aktivierung der Caspase-3 auf (Abb. 3.14B). Durch Inhibierung der Caspase-3-Aktivität mittels Z-DEVD-FMK-Substrat für 4 Std. konnte die Vitalität der CREB-defizienten Zellen wieder erhöht werden, was die Beteiligung der Caspase-3-Aktivierung an der Apoptose verdeutlicht (Abb. 3.14C). Wegen reduzierter Bcl-2-Expression unter CREB-Stillegung trat ein Verlust des Mitochondrienpotentials und somit Cytochrom c Freisetzung auf, was die Caspase-3 aktivieren konnte (Abb. 3.14D) (intrinsischer Apoptoseweg). Auch eine gesteigerte proteolytische Aktivität der Caspase-3/7 konnte nachgewiesen werden, wobei die Aktivitäten um 50 % (NIH3T3) bzw. 40 % (K-Ras^{V12}) erhöht waren (Abb. 3.14E).

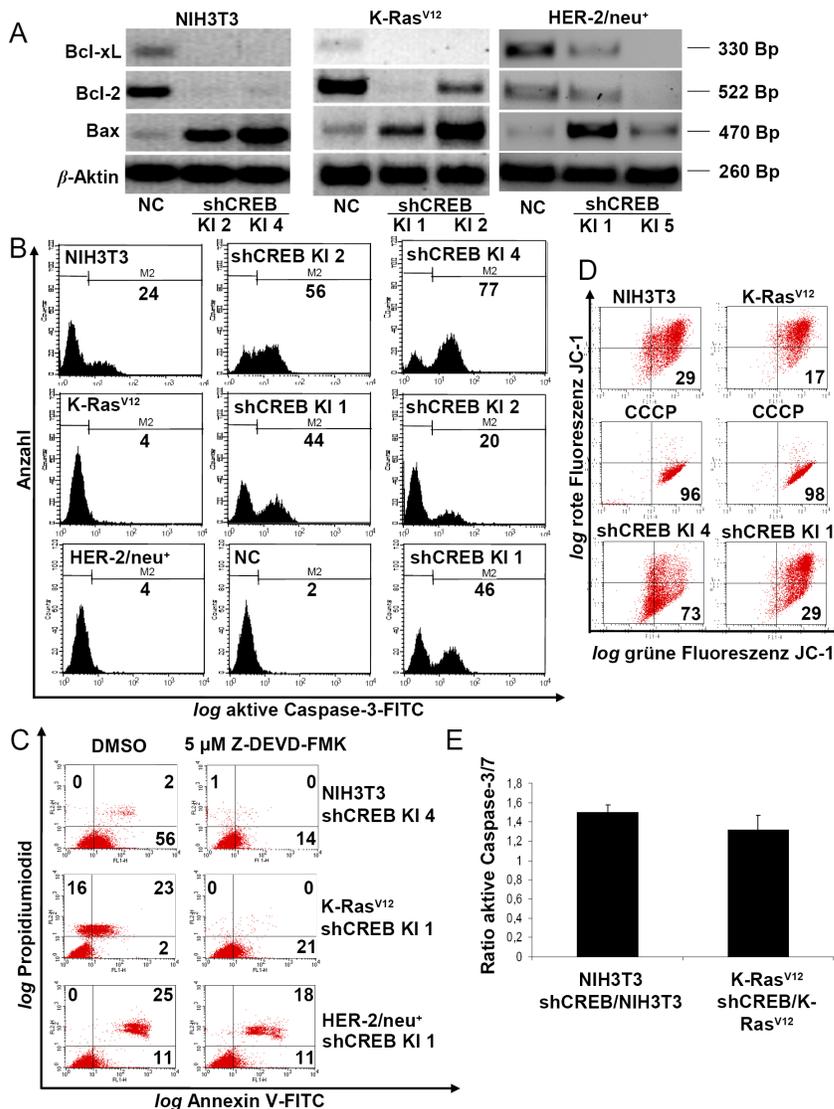
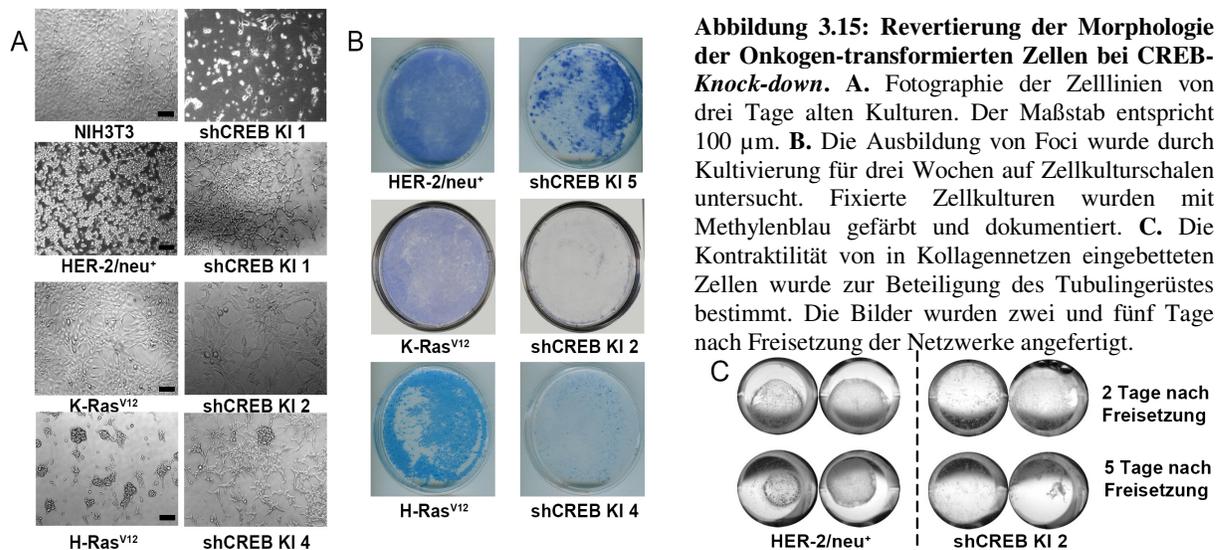


Abbildung 3.14: Apoptose-induktion durch den Verlust der Expression verschiedener anti-apoptotischer Gene sowie durch Aktivierung von Caspase-3. A. Produkte einer PCR (25 Zyklen, 65°C) mit anti- (bcl-2, bcl-xL) oder pro-apoptotischen (bax) Genen wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und visualisiert. Die Größe der Produkte ist angegeben. β-Aktin diente als Haushaltsgen. B. Die Aktivierung der Caspase-3 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Zellen mit aktivierter (geschnittener) Caspase-3 sind in der M2-Region zu finden und wurden quantifiziert. C. Nach 4 h Inkubation mit 5 μM Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK wurde die Apoptose wie in 3.13A bestimmt. Es wurden nur CREB-defiziente Zellen behandelt. Die Zahlen in den Quadranten geben den Anteil der Zellen an. D. Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. 2 μM CCCP dienten als Kontrolle. Die Zahl gibt den Anteil an Zellen mit geschädigten Mitochondrien an (Quadrant unten rechts). E. Eine Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-7 wurde durch Umsatz des Rhodamin-Substrates Z-DEVD-R110 zu einem fluoreszierenden Rhodamin 110 gemessen. Angegeben sind die Ratios shCREB/parentale Zelllinie (n = 3).

3.3.4 Einfluss des CREB-Knock-downs auf die Morphologie und die Migration der Zelllinien

Revertierung der transformierten Morphologie durch CREB-Knock-down

Onkogen-transformierte Zellen wiesen eine veränderte Morphologie und Wachstumsverhalten im Vergleich zu NIH3T3-Zellen auf: NIH3T3-Zellen waren flach-spindelförmig und wuchsen in einer Ebene, wobei das Wachstum bei Erreichen der vollständigen Konfluenz eingestellt wurde (Kontaktinhibition). Im Gegensatz dazu bildeten Onkogen-transformierte Zellen rundliche Zellen mit nur vereinzelt planaren Strukturen und formten kugelförmige Aggregaten („Foci“), wobei eine Kontaktinhibition nicht mehr auftrat. Durch Reduktion der CREB-Expression nahm die Anzahl der Foci ab und die Zellen nahmen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie an (Abb. 3.15A,B). Ebenfalls verringerte sich die Fähigkeit der Zellen, Kollagenetze zu kontrahieren, was die Beteiligung von CREB an Modifikationen des Tubulingerüsts für die Morphologieänderung nahelegt (Abb. 3.15C).

*Migrationsverhalten*

Die Messung der Migration von Zellen wurde mittels Wundheilungsanalysen durchgeführt, bei der das Schließen einer zellfreien Wunde in einer ansonsten konfluenten Zellkultur untersucht wurde. Die flachen und voluminöser wachsenden Zelllinien (NIH3T3, K-Ras^{V12}) zeigten dabei innerhalb von 48 Std. einen fast kompletten Wundschluss (15 % bzw. 25 %), die rundlichen H-Ras^{V12} einen deutlich schlechteren (50 %). Bei CREB-Knock-down wurde eine wesentlich schlechtere Wundheilung festgestellt, was teilweise auf einer Verdreifachung der Wundfläche hinführte (Abb. 3.16A). Bei der Zelllinie HER-2/neu⁺ shCREB veränderte sich die Wundfläche kaum, auch da die Zellen unter den serumarmen Kultivierungsbedingungen deutlich weniger vital waren (s. Abb. 3.44A). Auch bei der Migration durch eine engporige Membran konnte eine verringerte Migrationsfähigkeit der shCREB-transfizierten Zellen festgestellt werden (Abb. 3.16B), welche je nach Zelllinie um 40 – 60 % abnahm. Onkogen-transformierte Zellen wiesen dabei eine deutlich verstärkte Migrationsfähigkeit gegenüber den parentalen NIH3T3 auf.

Zellen verdeutlicht (Abb. 3.17B). Diese Faktoren konnten durch die Verwendung des spezifischen Inhibitors GM-6001 u.a. als MMPs identifiziert werden (Abb. 3.17C).

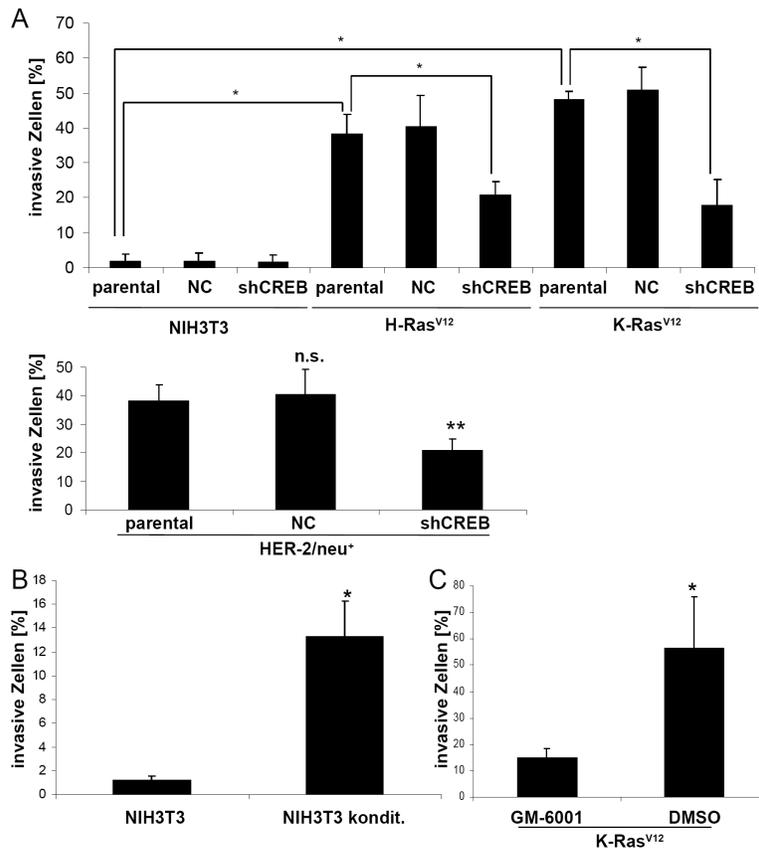


Abbildung 3.17: Verringerte Invasion durch Matrigel bei CREB-defizienten Zellen. **A.** Für die Bestimmung der Invasivität wurden Matrigel-beschichtete Migrationseinsätze verwendet und die darauf ausgesäten Zellen für 20 Std. inkubiert. Nach Entfernen der nicht invasiven Zellen wurde der ATP-Gehalt der verbliebenen Zellen bestimmt und auf die „Einsäurekontrolle“ bezogen (n = 3). **B.** Kulturüberstand, der 48 Std. von K-Ras^{V12}-Zellen konditioniert wurde (zu Beginn ca. 250.000 Zellen / 1 ml Medium), wurde für den Invasivitätstest mit NIH3T3-Zellen verwendet (NIH3T3 kondit.) und mit nicht-konditioniertem Medium verglichen (n = 2). **C.** K-Ras^{V12}-Zellen wurden für 24 Std. mit 10 µM GM-6001 (MMP-Inhibitor) oder mit 1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle) in nicht-konditioniertem EMEM vorinkubiert und dann für die Invasivitätsuntersuchungen in gleich behandeltem Medium verwendet (n = 2).

Verringerte MMP-Expression und Sekretion bei CREB-Verlust

Invasivität wird u.a. durch MMPs verursacht, die extrazellulär proteolytische Aktivität aufweisen und dadurch die extrazelluläre Matrix modellieren. Hierbei sind vor allem MMP-2 und -9 zu nennen, die der Klasse der Gelatinasen zugeordnet werden. Die mRNA-Expression beider MMPs wurde mit qPCR bestimmt, wobei die mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 in den Onkogen-transformierten Zelllinien verglichen mit den parentalen NIH3T3 um 1,5- bis 4-fach erhöht war. Die shRNA-vermittelte Reduktion der CREB-Expression war mit einer verminderten Transkription von MMP-2 und MMP-9 um 50 % in NIH3T3-Zellen und bis zu 90 % in Onkogen-transformierten Zellen gekoppelt (Abb. 3.18A). Diese reduzierte Expression ging auch mit einer Abnahme der sekretierten MMP-Menge einher, die in den Kulturüberständen von CREB-reduzierten HER-2/neu⁺-Zellen um 75 % verringert war (Abb. 3.18B). Mittels Zymographie konnte in konditionierten Kulturüberständen eine daraus resultierende Abnahme der proteolytischen Aktivität von MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden (Abb. 3.18C). Die Aktivität der MMP-9 war dabei in den meisten Zelllinien deutlich schwächer als die entsprechende MMP-2-Aktivität. Eine Ausnahme stellte die Zelllinie K-Ras^{V12} dar. Hierbei ist eine starke Bande bei ~125 kDa sichtbar, die in der Literatur als MMP-9-Komplex beschrieben wird (Triebel et al., 1992) (Abb. 3.18D).

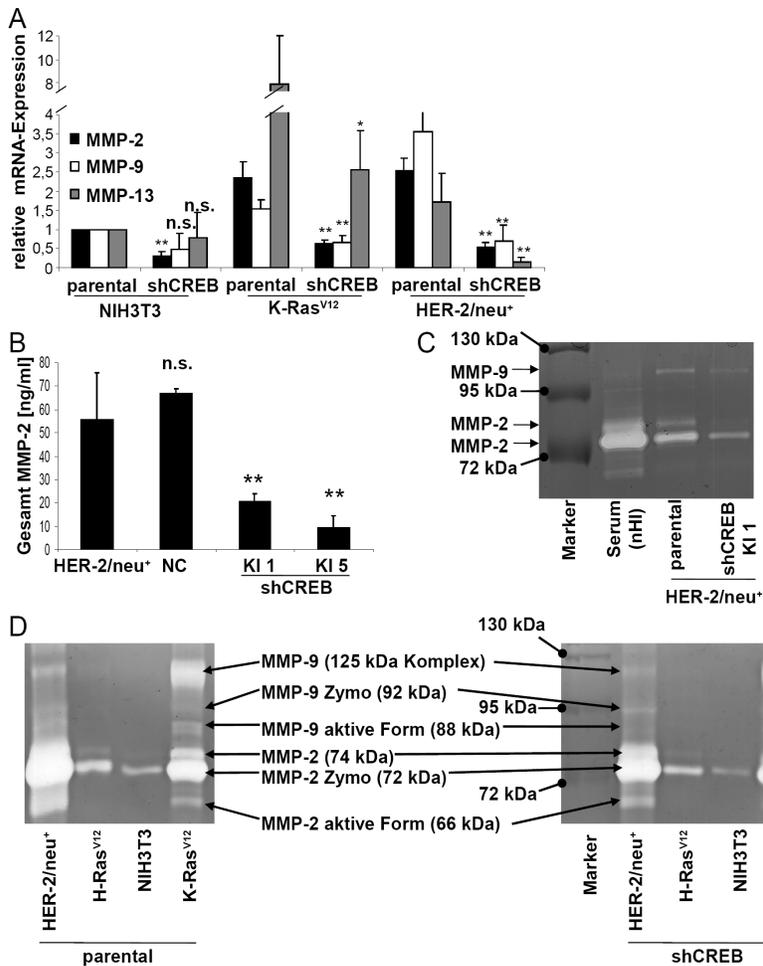


Abbildung 3.18: Positive Regulation der MMP-mRNA-Expression und MMP-Aktivität (in den Kulturüberständen) durch CREB. **A.** Darstellung der Expression von MMP-2, -9 und -13 mRNA in murinen Zelllinien, welche durch qPCR gemessen wurde. Die Daten entsprechen drei unabhängigen Replikaten. **B.** Sekretiertes MMP-2-Protein im Kulturüberstand wurde mit einem spezifischen ELISA bestimmt. Für die Konditionierung wurden 5×10^4 Zellen in 300 μ l serumfreiem Medium ausgesät und nach 24 Std. Inkubation der Überstand geerntet. Dargestellt sind drei biologische Replikate. **C.** Bestimmung der Aktivität der sekretierten MMPs durch Zymographie. 24 Std. konditionierte Kulturüberstände (15 μ l) wurden auf Gelatinegele aufgetragen, nach dem Lauf die MMPs renaturiert, dann ü.N. zum Gelatineabbau inkubiert und mit Coomassie gefärbt. Die hellen Flächen entsprechen den Gelatine-abbauenden MMP-2 und -9-Aktivitäten und wurden anhand eines Größenstandards identifiziert. Nicht Hitze-inaktiviertes (nHI) Serum enthält größere Mengen an MMP-2. **D.** MMP-9-Aktivität ist bei höheren Volumina an Überstand (25 μ l) nachweisbar.

Promotoranalysen

In silico-Analysen wiesen auf das Vorliegen von einer putativen CRE-Seite im murinen MMP-2-Promotor und auf drei Bindestellen in dem murinen MMP-9-Promotor hin (s. Abb. 2.1 im Kapitel Methoden). Das Einbringen eines Wildtyp-MMP-9-Promotor-Luziferasereporters zeigte eine gesteigerte Luziferaseaktivität in den Onkogen-transformierten Zelllinien, was auf eine stärkere Promotoraktivität im Vergleich zu den NIH3T3-Zellen schließen lässt (Abb. 3.19A; HER-2/neu⁺ Daten nicht gezeigt). In den shCREB-Klonen der Onkogen-transformierten Zellen war die Luziferaseaktivität deutlich verringert (um 20 – 60 %), während in der NIH3T3-Zelllinie die Promotoraktivität vom MMP-2-Gen nach CREB-Knock-down signifikant reguliert war (50 %).

Zur genaueren Überprüfung der CRE-Bindestelle wurden Fragmente des MMP-2-Promotors mit bekannten Bindestellen in den Luziferasevektor kloniert und nachfolgend die Aktivität in den Zelllinien bestimmt. Ein Verlust von ca. 50 % der Promotoraktivität nach Deletion der Region zwischen -1482 Bp und -695 Bp wurde nachgewiesen. Eine weitere Deletion, die zusätzlich ein 50 Bp-Fragment mit der putativen CREB-Bindestelle enthält, führte zur Abnahme der Promotoraktivität um durchschnittlich 15 % (Abb. 3.19B). Da dieses kurze Fragment u.a. auch eine STATX-Bindestelle enthält, kann die Aktivität nicht alleine auf CREB zurückgeführt werden.

Bei dem MMP-9-Promotor wurden die drei identifizierten CRE-Seiten jeweils einzeln mutiert, so dass CREB an diese nicht mehr binden konnte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die CRE-Seite 1 keine signifikante Bedeutung bei der Regulation der Gene hat, während Mutationen in der CRE-Seite 2 die Promotoraktivität um 30 % und in der CRE-Seite 3 um etwa 40 % supprimierte.

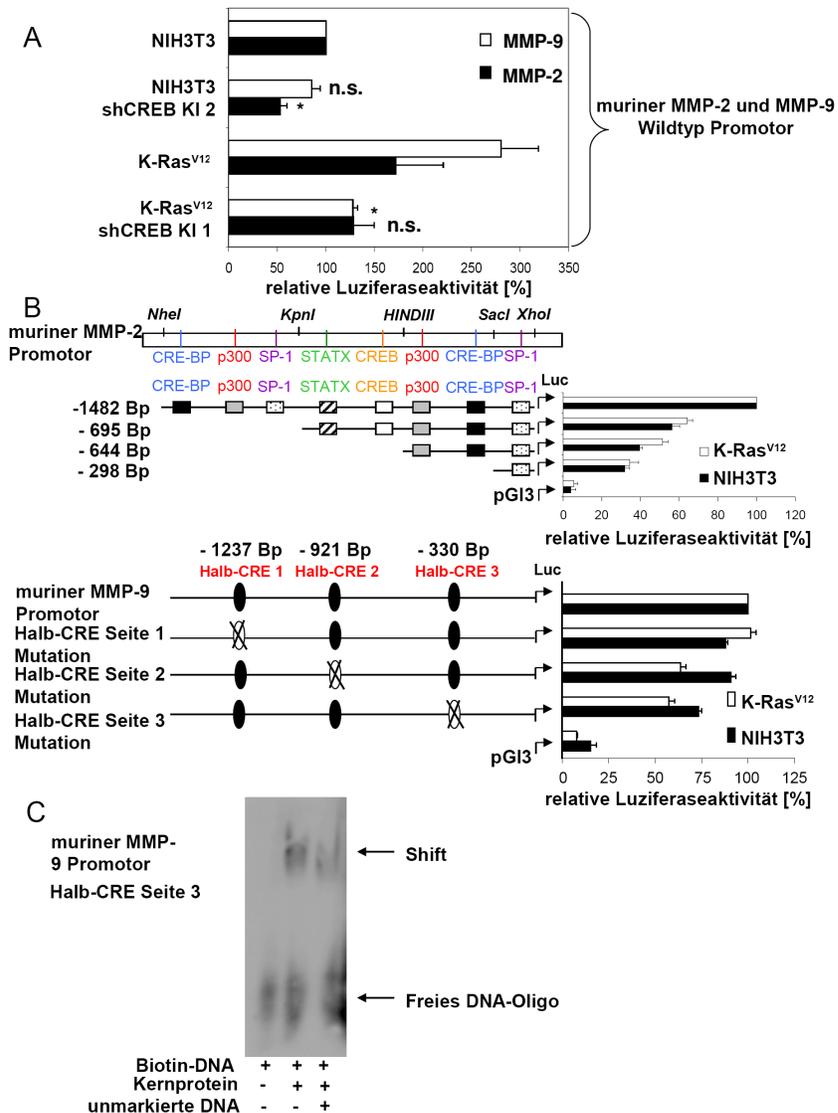


Abbildung 3.19: Putative CREB-Bindestellen in den Promotorregionen der murinen MMP-2 und 9-Gene. **A.** Volllängepromotoren von MMP-2 oder 9 wurden in einen Luciferasepromotorvektor kloniert und in die Zelllinien NIH3T3 sowie K-Ras^{V12} transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit gleichzeitiger Transfektion eines β -Galaktosidaseplasmids ermittelt, indem die Luciferaseaktivität auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert wurde. Die normierten Luciferaseaktivitäten der NIH3T3-Zelllinie wurden als 100 % gesetzt und die der anderen Zelllinien dazu im Verhältnis gesetzt. Daten entsprechen drei unabhängigen Ansätzen in jeweils drei Replikaten. **B.** Oben, Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurden im MMP-2-Promotor identifiziert und durch Restriktionsverdau erzeugte Promotorfragmente mit bekannten Transkriptionsfaktor-Bindestellen in ein Reporterplasmid kloniert. Die Daten zeigen deren Aktivität in den Zelllinien (n = 2). Unten, Die im murinen MMP-9-Promotor identifizierten CRE-Seiten wurden einzeln mutiert und deren Aktivität wie oben bestimmt (n = 2). **C.** Biotin-markierte DNA mit der Halb-CRE Seite 3-Sequenz des MMP-9-Promotors verursachte bei Inkubation mit Kernextrakt aus K-Ras^{V12} eine verzögerte Migration (*Shift*), welcher durch Zugabe der unmarkierten DNA kompensiert werden konnte. Bei den anderen zwei CRE-Seiten des MMP-9-Promotors und der CRE-Seite des MMP-2-Promotors konnte ein derartiger *Shift* nicht erreicht werden.

In den NIH3T3-Zellen war die Abnahme der Promotoraktivität mit 10 % bzw. 25 % deutlich geringer.

Um die *in vitro*-Bindung eines Transkriptionsfaktors an die putativen CRE-Elemente zu untersuchen, wurden EMSAs durchgeführt. Hierbei konnte nur bei dem Oligonukleotid, welches die Halb-CRE Bindestelle 3 beinhaltet, eine verzögerte Migration (*Shift*) und somit eine Bindung von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Abb. 3.19C). Dieser *Shift* war durch überschüssiges unmarkiertes Oligo kompensierbar. Ein direkter Nachweis von CREB durch einen *Super-Shift* war aus technischen Gründen nicht möglich.

Zusammenfassend reguliert CREB somit die Invasivität der Zellen durch die Bindung an den MMP-9-Promotor, wodurch auch vermehrt extrazelluläre MMP-9 sekretiert wird.

3.3.6 Einfluss des CREB-*Knock-downs* auf die Zell-Zell-Interaktion

CREB-Expression beeinflusst die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Matrixmetalloproteinasen sind für den Abbau und die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix wichtig, ihr Aufbau wird jedoch von den Hyaluronsäuresynthasen (HAS), welche das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure synthetisieren und es mit anderen Proteoglykanen vernetzen, bewerkstelligt. Um die Synthese der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurden die Transkriptionsspiegel von HAS1 und HAS2 untersucht. Die Expression von der HAS2 war in Onkogen-transformierten Zellen durch CREB-*Knock-down* um etwa 80 % verringert, in NIH3T3-Zellen um etwa 50 % (Abb. 3.20A). Hingegen war die mRNA-Expression von HAS1 nicht signifikant verändert.

Da die HAS2-Aktivität zu einer gesteigerten Synthese von Hyaluronsäure führt und daher die Neusynthese der extrazellulären Matrix fördern kann, wurden die Bestandteile der Matrix quantifiziert. CREB-*Knock-down* erhöhte die Synthese bzw. Sekretion von schwefelhaltigen Glykosaminoglykanen (GAG) jedoch nicht von Uronsäure-haltigen GAG wie Hyaluronsäure in allen getesteten Zelllinien (Abb. 3.20B). In den Kulturüberständen der Zelllinien konnten verschiedene Proteoglykane nachgewiesen werden, deren Sekretion durch CREB-*Knock-down* erhöht war (Abb. 3.20C). Die Art der vorhandenen Proteoglykane konnte nicht identifiziert werden. Stark vorhanden war ein Proteoglykan mit etwa 50 kDa sowie 65 kDa und 125 kDa. Letzteres könnte Decorin sein, während die anderen Endokan oder Biglykan darstellen könnten. Die Synthese der Hyaluronsäure war in den shCREB-Zellen um 50 % reduziert, während die onkogene Transformation die Menge an Hyaluronsäure nicht signifikant erhöhte (Abb. 3.20D).

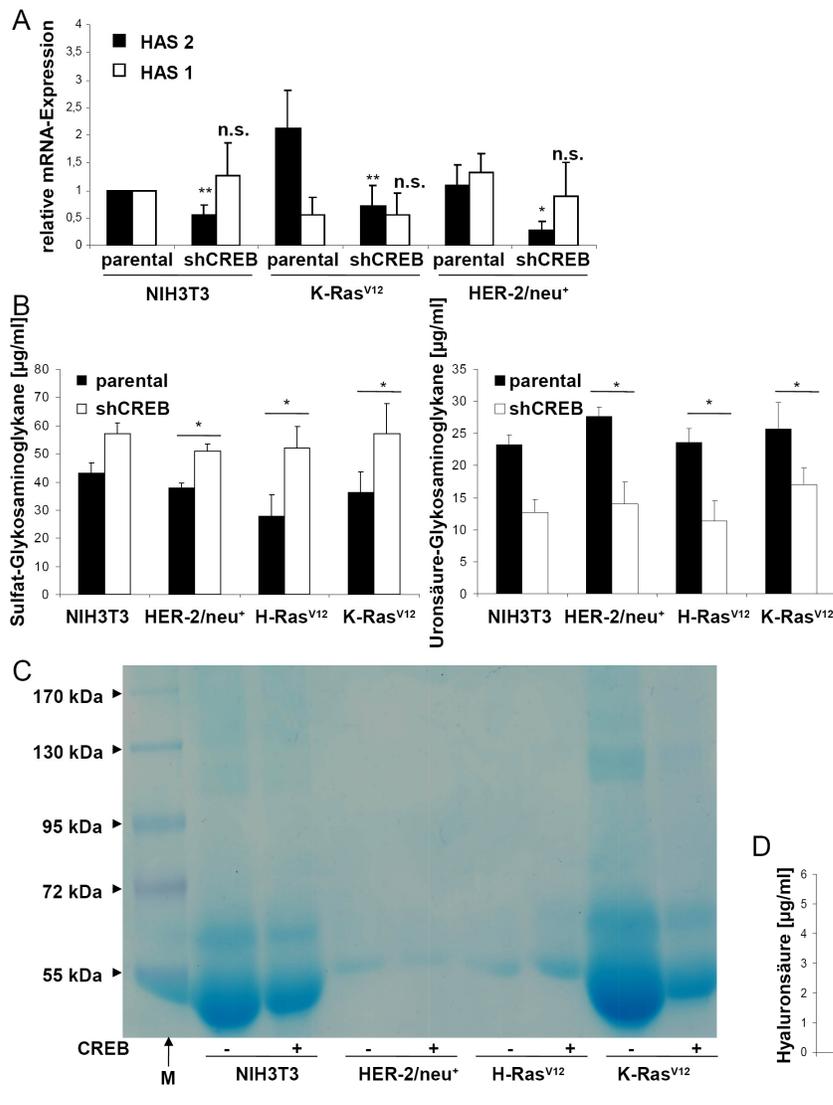


Abbildung 3.20: Beeinflussung der Ausbildung der extrazellulären Matrix durch CREB. **A.** mRNA-Expression von HAS 1 und 2 wurde mittels qPCR bestimmt und auf die Expression von GAPDH normiert. Die Expression in den parentalen NIH3T3 wurde auf 1 gesetzt. **B.** Die Sekretion von Sulfat-Glykosaminoglykane (mittels Alcianblau-Messung) und Uronsäure-Glykosaminoglykane (mittels Carbazol-Messung) wurde in konditionierten Kulturüberständen gemessen. Für die Konditionierung wurden 50.000 Zellen in einer 24-Lochplatte mit 300 µl Medium für 48 Std. kultiviert. **C.** Konditionierte Kulturüberstände (30 µl, s.o.) von murinen Fibroblasten (+) und CREB-defizienten Zelllinien (-) wurden auf einem Gel aufgetrennt und die Proteoglykane angefärbt. M entspricht der Spur mit dem Proteinstandard. **D.** Bestimmung der Hyaluronsäure in konditionierten (s.o.) Kulturüberständen (n = 3).

Verminderte Adhärenz durch erniedrigte CREB-Expression

In wieweit die verringerte Matrixsekretion die Adhäsionsfähigkeit der Zellen zu einer definierten Matrix beeinflusst, wurde durch Fibronectin-beschichtete Platten bestimmt. In parentalen und NC-Kontrollen aller Zelllinien mit Ausnahme von K-Ras^{V12} wurde eine deutliche Zunahme der Adhäsion mit steigenden Fibronectinkonzentrationen detektiert (Abb. 3.21A). Im Gegensatz dazu zeigten die K-Ras^{V12}-Zellen schon auf unbeschichteten Platten unabhängig von der Fibronectinkonzentration mit 80 % eine sehr hohe Adhäsion. In allen Zelllinien führte eine Verminderung der CREB-Expression zu einer deutlichen Abnahme der Adhäsion, welche mit 60 % Verlust am stärksten bei den H-Ras-Mutanten ausgeprägt war.

Auch die Fähigkeit von Zellen Kontakt zu anderen Zellen aufzubauen, war nach CREB-Knock-down eingeschränkter: So zeigten nur 30 % der CREB-defizienten HER-2/neu⁺-Zellen eine Adhäsion zu konfluenten NIH3T3-Zellen verglichen mit 55 % der parentalen Zellen (Abb. 3.21B). Dies könnte mit einer Reduktion der E-Cadherin-Expression auf der Zelloberfläche einhergehen (Abb. 3.21C), die durch CREB-Knock-down um 70 % abnahm.

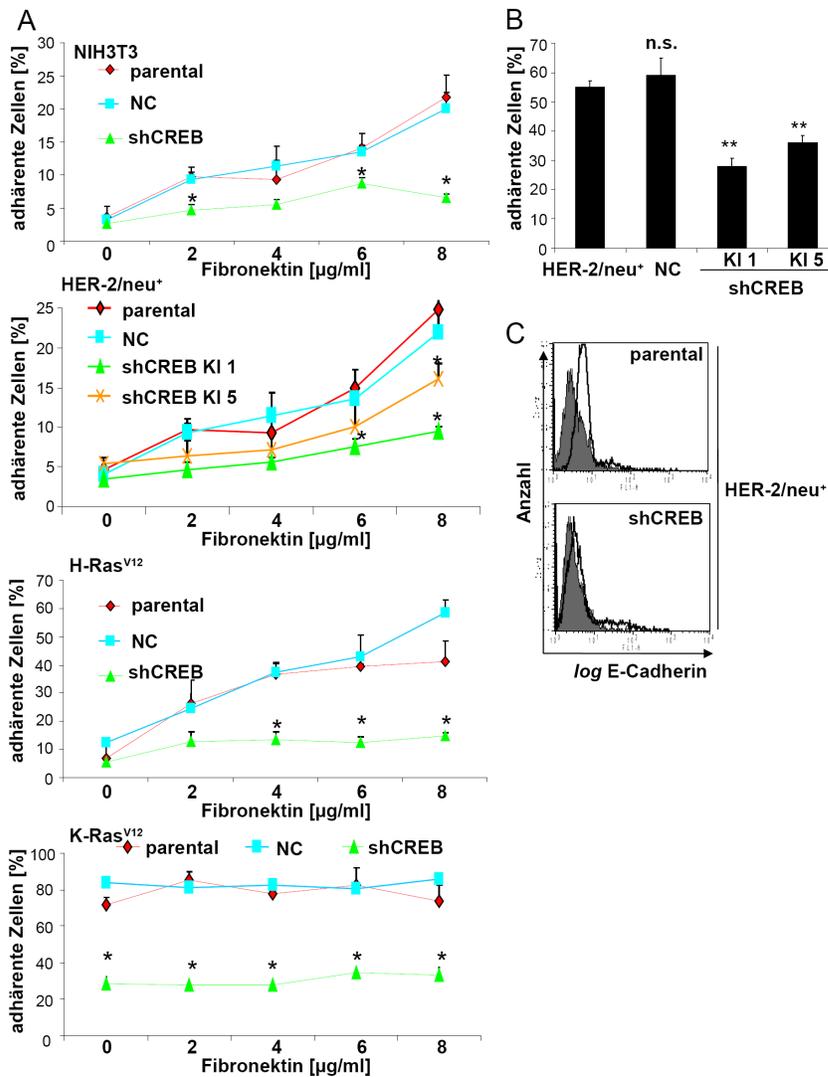


Abbildung 3.21: Steuerung von Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion durch CREB. **A.** Die Adhärenz von Zellen auf Fibronektinbeschichtung mit unterschiedlichen Konzentrationen wurde untersucht, indem Zellen für 90 Min. auf diesen in Medium inkubiert wurden und dann der Boden mehrfach mit PBS gewaschen wurde. Die Anzahl der verbliebenen Zellen wurde durch ATP-Bestimmung quantifiziert. 100 % entsprechen den eingesäten Zellen (n = 3). **B.** Zur Bestimmung der Zell-Zell-Interaktion wurden Calcein-markierte Zellen auf einen Rasen von konfluenten, unmarkierten NIH3T3-Zellen ausgesät und nach 90 Min. Inkubation mit PBS mehrfach gewaschen. Die Anzahl der verbliebenen Zellen wurde durch Fluoreszenzmessung quantifiziert. 100 % entsprechen den eingesäten Zellen (n = 3). **C.** Mittels Durchflusszytometrie wurde die Präsentation von E-Cadherin auf Zellen untersucht (schwarz umrahmter nicht ausgefüllter Bereich) und mit der IgG-Isotypkontrolle (graue Fläche) verglichen. Die Daten entsprechen einem von drei unabhängigen Replikaten von jeweils 10.000 Zellen.

Verankerungsunabhängiges Wachstum wird durch CREB gefördert

Krebszellen sind in der Lage in Suspension ohne Kontakt zu einer Oberfläche zu wachsen. „Normale“, nicht-transformierte Zellen zeigen unter diesen Bedingungen Anoikis, d.h. sie neigen zur Apoptose. Kultivierung von murinen Fibroblasten und onkogenen Transformanten auf Poly-HEMA-beschichteten Platten führte zu einer Sphäroidbildung, die in den NIH3T3-Zellen am geringsten ausgeprägt war (Abb. 3.22A). shCREB-Zellen entwickelten deutlich kleinere Sphäroide. Bei Kultivierung der Zellen auf Matrigel-beschichteten Platten entwickelten NIH3T3-Zellen keine Sphäroide, K-Ras^{V12}-Zellen nur bei 2,5 % FKS und HER-2/neu⁺ sowohl bei 2,5 als auch bei 0,5 % FKS (Abb. 3.22B). Eine verminderte CREB-Expression verursachte auch hier ein Ausbleiben der Sphäroidbildung. Um das verankerungsunabhängige Wachstum zu untersuchen, wurden Weichagar-Versuche durchgeführt. NIH3T3-Zellen bildeten keine Kolonien in Weichagar (Abb. 3.22C), während K-Ras^{V12} und HER-2/neu⁺-Zelllinien mehr als 150 Kolonien pro 20.000 Zellen, sowie H-Ras^{V12} durchschnittlich 80 Kolonien pro Schale bildeten. ShCREB verringerte das Weichagarwachstum gemessen an der Anzahl der vitalen Kolonien um 80 (K-Ras^{V12}-Zelllinien) bis

90 % (H-Ras^{V12}-Zelllinien, HER-2/neu⁺-Zelllinien). Die AHNAK-Expression, die die Zell-Zell-Interaktion fördert, war nach CREB-*Knock-down* um mindestens 70 % reduziert. Die Cortactin-Expression war in CREB-defizienten NIH3T3-Zellen nicht nachweisbar, bei den K-Ras^{V12} nach CREB-*Knock-down* um das Doppelte erhöht (Abb. 3.22D).

Diese Daten zeigen, dass CREB das Überleben und das Wachstum von verankerungsunabhängigen Sphäroidkulturen fördert, was die Metastasierung von Tumorzellen unterstützen kann.

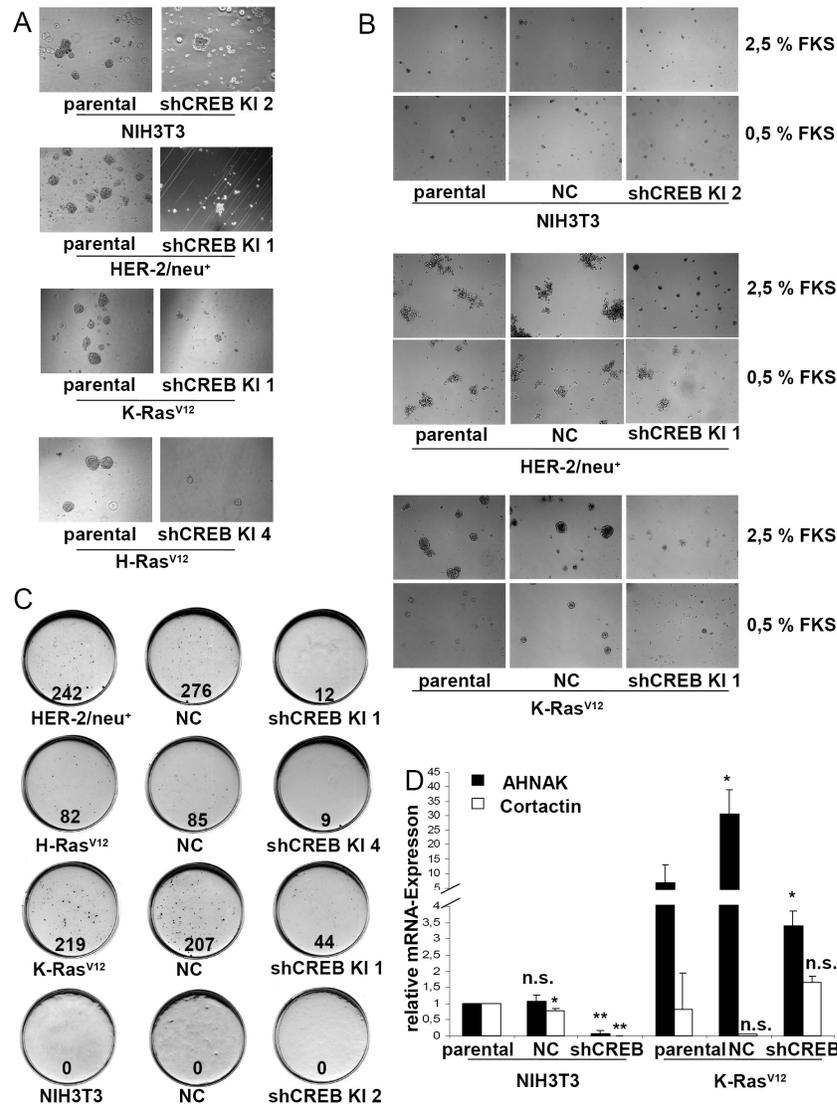


Abbildung 3.22: Begünstigung des Wachstums der Zellen auf Matrices durch CREB. **A.** Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen Sphäroidwachstum von drei Tage alten Zellkulturen auf Poly-HEMA-beschichteten Platten. **B.** Sphäroidwachstum wurde auf Matrigel-beschichteten Platten in Medium mit 2,5 % oder 0,5 % FKS bestimmt. Nach 72 Std. wurde das Wachstum dokumentiert. **C.** Weichgarkulturen verdeutlichen das verankerungsunabhängige Wachstum. Die Bilder zeigen 21 Tage alte und mit Iodnitrotetrazoliumchlorid gefärbte Schalen. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der Kolonien pro Schale. Es sind Beispiele von zwei Replikaten mit drei Parallelen gezeigt. **D.** Die mRNA-Expression von AHNAK und Cortactin wurde durch qPCR bestimmt. Es sind drei Replikate gezeigt.

3.3.7 Einfluss des CREB-Knock-downs auf den *Immunescape*

In vorherigen Publikationen wurde beschrieben, dass onkogene Transformation die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche verringert und somit zu einem *Tumor-escape* führt (Herrmann et al., 2004). Dies wird durch eine Herunterregulation von Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) erreicht. Daher wurde untersucht, ob die CREB-Stillegung die MHC-Klasse I-Expression verändert. Die MHC-Klasse I-Oberflächenexpression war nach CREB-Knock-down leicht erhöht, erreichte jedoch nur 10 % der Menge wie bei den NIH3T3-Zellen (Abb. 3.23A). Die Expression der APM-Komponenten TAP1 und TAP2 war nach CREB-Stillegung um 50 bis 60 % erhöht (Abb. 3.23B), jedoch nicht signifikant. Der stärkste Effekt des CREB-Knock-downs konnte auf Tapasin nachgewiesen werden, dessen Expression um etwa das Zehnfache induziert war. Dies könnte die verstärkte Antigenpräsentation erklären, da sie durch Tapasin reguliert wird (Abb. 3.23C). Die Expression von E2F1, einem Tapasin-Regulator, war stark variabel.

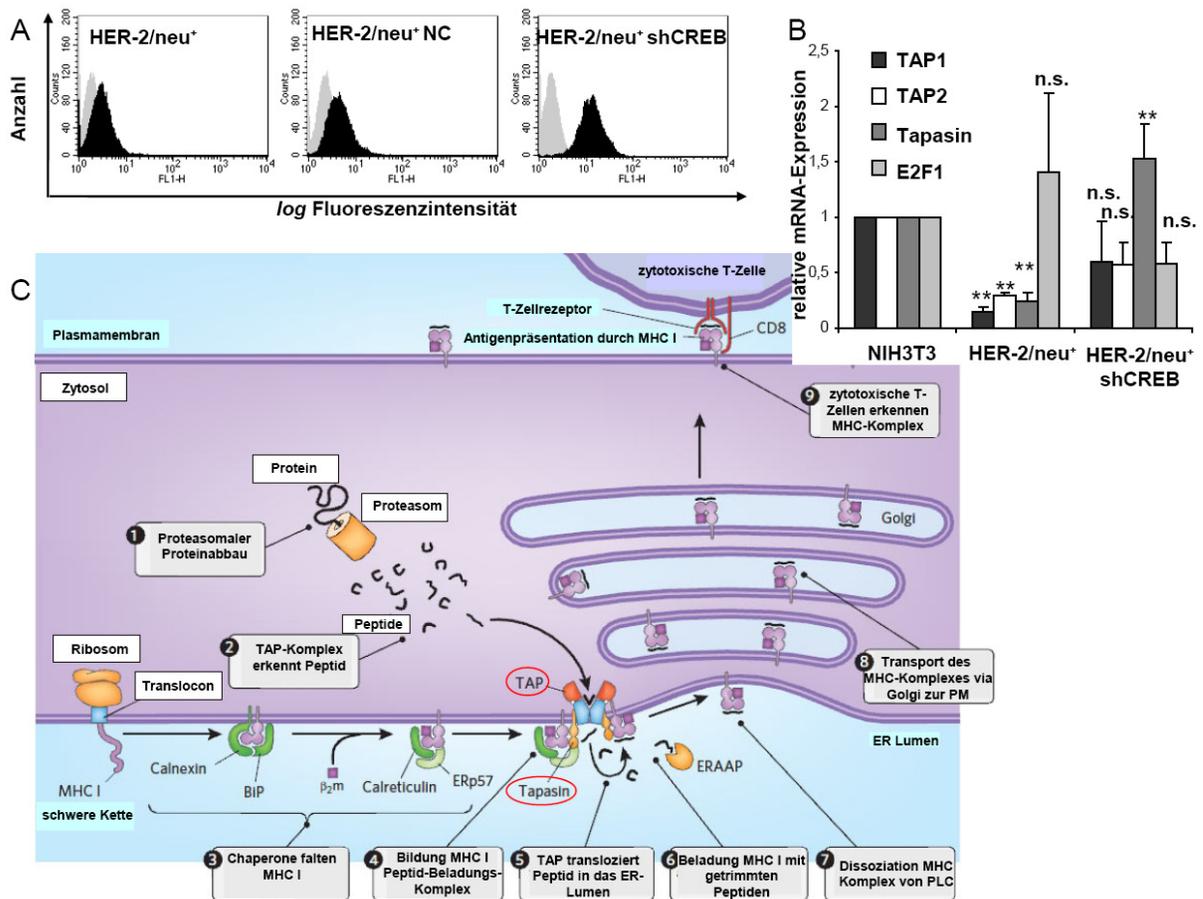


Abbildung 3.23: Erhöhte Präsentation von MHC-Klasse I-Komponenten nach CREB-Knock-down. **A.** Die Präsentation von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch bestimmt, indem Zellen mit H-2L^d-FITC gefärbt wurden (schwarze Flächen) und mit einer Isotypkontrolle verglichen wurden (graue Flächen). Pro Ansatz wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen. **B.** Komponenten der APM wurden hinsichtlich der mRNA-Expression charakterisiert. Die Daten entsprechen drei unabhängigen Replikaten und die Expression in den parentalen NIH3T3 wurde auf "1" normiert. **C.** Darstellung der APM. Peptide werden durch proteasomalen Abbau erzeugt und durch den TAP-Komplex gebunden. MHC schwere Kette wird durch Chaperone wie Calnexin gefaltet und bildet zusammen mit Beta-2-mikro-Globulin (β_2m) die reifen Komplex. Durch den TAP-Komplex werden diese mit den Peptiden beladen. Der MHC-Komplex wird mittels Golgi zur Zelloberfläche transportiert, wo er durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden kann, was die Immunantwort einleitet. Mögliche CREB-regulierte Proteine sind rot umkreist (Quelle: verändert nach Parcej und Tampé, 2010).

3.4 Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in *in vivo*-Experimenten

3.4.1 Einfluss des CREB-Knock-downs auf die *in vivo*-Tumorigenität

Blockierung der Tumorbildung in CREB-defizienten Zellen

Injektion von HER-2/neu⁺ und K-Ras^{V12}-Zellen führte bei DBA-1-Mäusen innerhalb weniger Tage zur Ausbildung von Tumoren. In dieser Gruppe hatten nach 14 Tagen alle Tiere Tumore entwickelt. In den CREB-defizienten Gruppen waren bis zum Ende des Versuches 60 – 80 % der Tiere Tumorfrei (Abb. 3.24A,C). Die Tumore der CREB-defizienten Gruppe erreichten innerhalb vier Wochen ein Tumolvolumen von bis zu 300 mm³, das innerhalb der letzten Woche konstant blieb. Bei den HER-2/neu⁺ und K-Ras^{V12}-Zelllinien wurde in den letzten Tagen ein exponentielles Tumorstadium beobachtet, das in dieser Zeit zu einer Verdopplung des Tumolvolumens führte (Abb. 3.24B,D). Tumore, die bis zur dritten Woche kein Tumolvolumen von ca. 100 mm³ erreicht hatten, wurden bis zum Ende des Versuches wieder kleiner und bei 30 % der DBA-1-Tiere verschwand der Tumor komplett (Abb. 3.24G,H). Das Tumorendvolumen betrug etwa 1000 mm³ bei HER2/neu⁺ und K-Ras^{V12}-Zellen, bei den shCREB-Transfektanten deutlich weniger (Abb. 3.24G,H).

Injektion der Onkogen-transformierten Zellen und ihrer shCREB Transfektanten in Nacktmäuse führte zu einer relativ homogenen Tumorentwicklung innerhalb der Gruppen, so dass Tumorzinzidenz und -größe zwischen den CREB-defizienten Zellen und der parentalen Gruppe relativ vergleichbar waren (Abb. 3.24E,F). Dabei wiesen die Nacktmäuse generell ein stärkeres Tumorstadium als die DBA-1-Mäuse auf.

Mittels *in vivo* Bildgebungsverfahren war es möglich, den Entwicklungsverlauf von injizierten mCherry-markierten Zellen zu verfolgen. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen sich vermehrten und ein Zelldepot bildeten, aus dem ein Tumor entstehen kann. Die Zellen konnten dabei auch längere Zeit im Körper des Tieres verbleiben, ohne dass ein sichtbarer Tumor entstand (Abb. 3.24I). So konnte bspw. in Maus M10 (HER-2/neu⁺ shCREB) ein Zelldepot ohne Ausbildung eines Tumors über längere Zeit beobachtet werden, während Maus M3 eine lange Wachstumsstagnation des Tumors zeigte. Eventuell sind dies Hinweise auf eine veränderte Immunantwort der Tiere.

In den untersuchten Organen der Tiere konnten keine pathologischen Veränderungen oder Metastasen entdeckt werden (Lunge und Niere, Abb. 3.25A; K-Ras^{V12} und Lymphknoten, Daten nicht gezeigt). IHC-Analysen ergaben eine verringerte CREB-Expression in den shCREB-Tumoren (Abb. 3.25B). In diesen Tumoren wurde auch eine verstärkte Apoptose/Nekrose im Gewebe nachgewiesen, wenn es nicht in der Nähe von Blutgefäßen lag. Während in HER-2/neu⁺ Tumoren nur 10 % der Zellen eine positive TUNEL-Färbung aufwiesen, so nahm dieser Anteil in den shCREB-Tumoren auf etwa 35 % zu (Abb. 3.25C). Ferner war die Proliferation der Zellen, welche durch Ki-67-Färbung beschrieben wurde, in den shCREB-Tumoren um etwa 50 % reduziert. In den HER-2/neu-Tumoren konnte die Expression von HER-2/neu nachgewiesen werden (Abb. 3.25D).

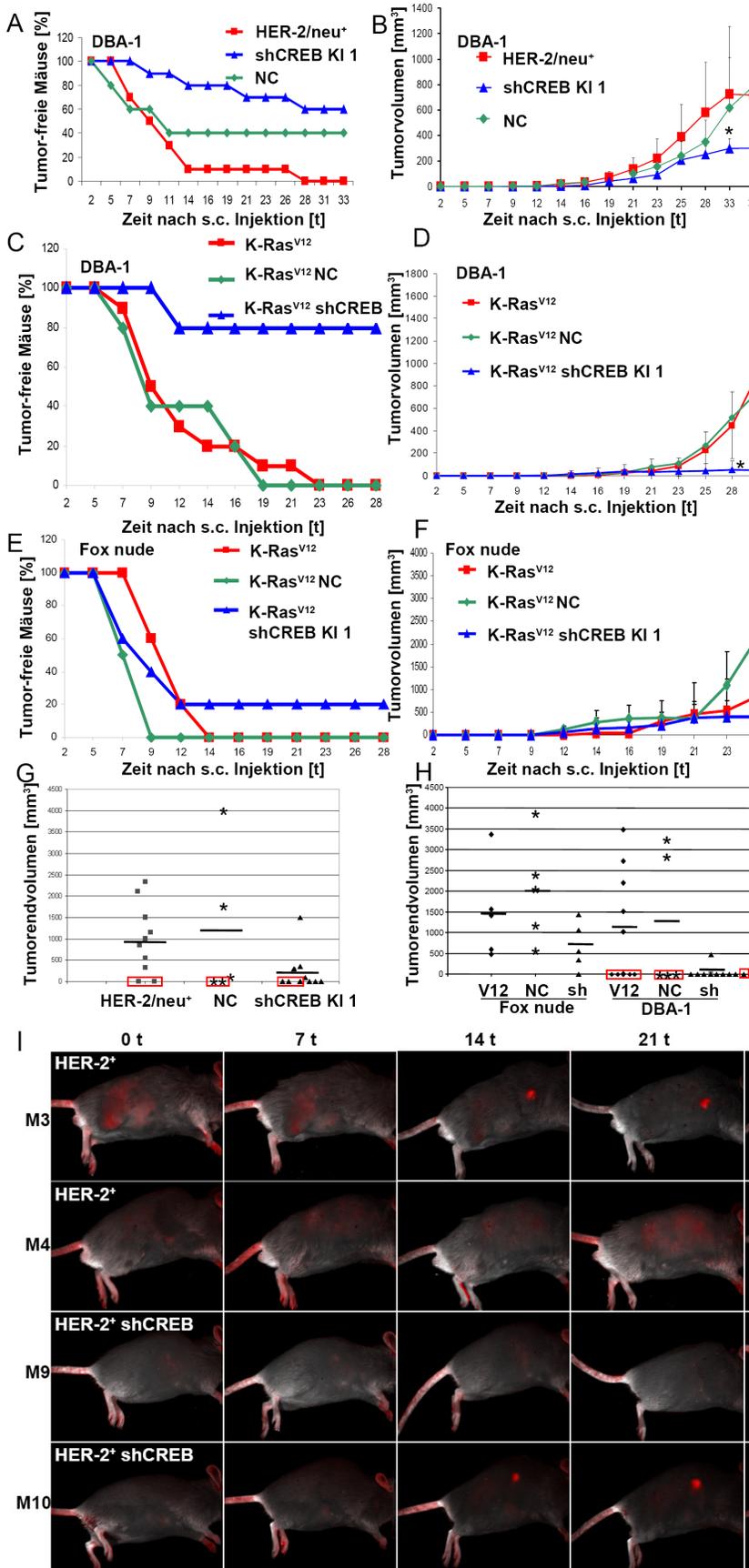


Abbildung 3.24: Verringerte *in vivo*-Tumorigenität nach CREB-Knock-down. A., C. Die Tumorfreiheit von DBA-1-Mäusen nach Injektion von A. HER2/neu-Zelllinien und ihren Transfektanten bzw. C. K-Ras^{V12} wurde über einen Zeitraum von mehreren Wochen verfolgt. B., D. Das durchschnittliche Tumorvolumen der Tiere in den einzelnen Gruppen wurde über einen Zeitraum von mehreren Wochen untersucht. E., F. Im Falle der K-Ras^{V12}-Zelllinien wurden Experimente auch in Nacktmäusen durchgeführt. G., H. Das Tumorendvolumen wurde an den entnommenen Tumoren bestimmt. In jeder Gruppe sind alle zur Verfügung stehenden Mäuse dargestellt; Es fehlen die vor Versuchsende getöteten Tiere. Die schwarze, horizontale Linie ist der Durchschnitt in jeder Gruppe. Rot eingekästelte Tiere zeigten eine komplette Tumorregression. Die Tiere wurden nach etwa 42 t (DBA-1-Mäuse) oder nach 28 t (Fox nude-Mäuse) getötet. I. Mittels mCherry-markierten HER-2/neu⁺ bzw. CREB-defizienten Zellen konnte die Tumorbildung *in vivo* verfolgt werden. Die intensiv leuchtende, runde Fläche stellt den wachsenden Tumor dar, die größerflächigen, schwach roten Areale stammen vom Rasieren der Tiere. Diese Mäuse sind nicht in den Daten von 3.24A. und B. enthalten.

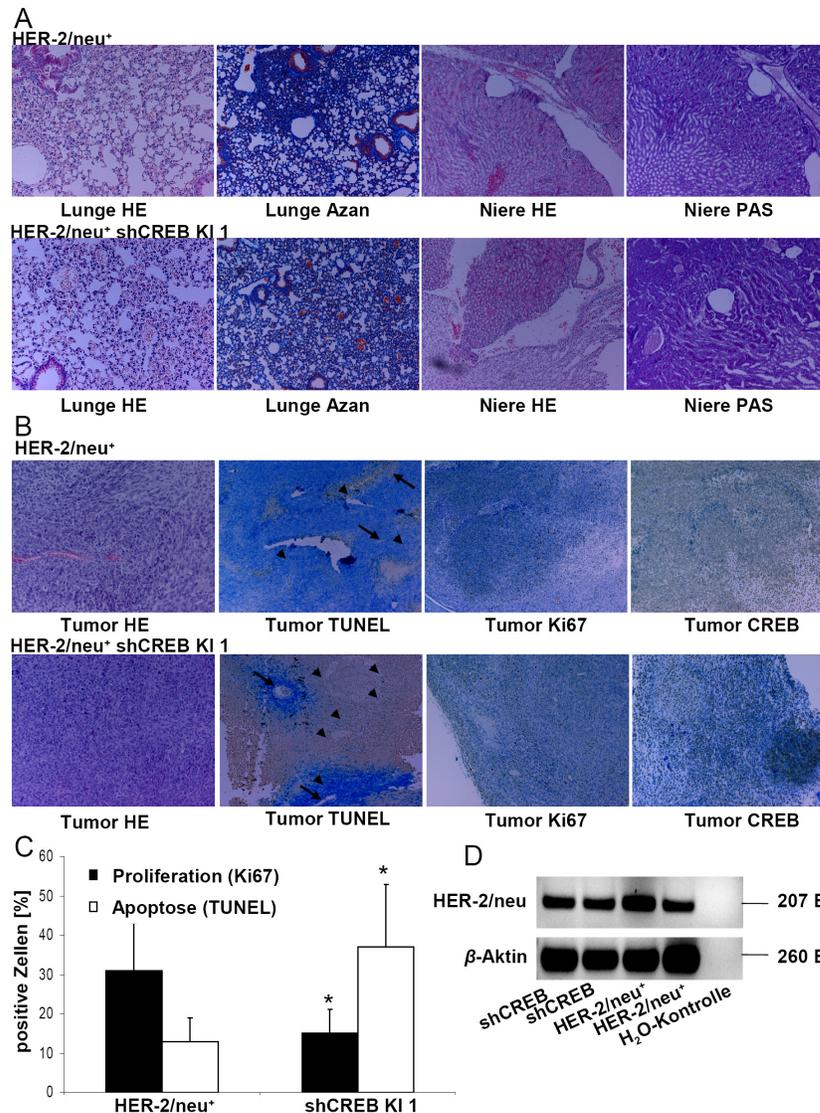


Abbildung 3.25: Verstärkte Apoptose und verringerte Proliferation bei CREB-Mangel im Tumorgewebe. **A.** Schnitte von Lungen- und Nierengewebe aus DBA-1-Mäusen wurden histologisch gefärbt und untersucht. Vergrößerung: 40x. **B.** Tumorgewebe wurde mit HE oder immunhistochemisch gefärbt und mikroskopiert. Die Pfeilköpfe der TUNEL-Bilder zeigen eine Auswahl von positiv gefärbten apoptotischen Zellen an, während die Pfeile kleine Blutgefäße kennzeichnen. Vergrößerung: 40x. **C.** Quantifizierung der TUNEL und Ki67-Bilder in B. Es wurden vier Bilder von jeweils vier Präparaten untersucht. **D.** Aus nicht fixierten Tumorgewebe wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR die Expression von HER-2/neu nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Es sind Daten von jeweils zwei Tumoren pro Gruppe gezeigt.

Da es bei den DBA-1-Mäusen in einigen Fällen zu einer kompletten Tumorregression kam, wurde das Blut der Tiere auf den Immunstatus untersucht. Dabei zeigte sich, dass in den Tieren mit den injizierten CREB-defizienten Zellen der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen erhöht war (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Blutuntersuchungen zeigen veränderte Immunreaktion bei CREB-Defizienz auf Tumorentwicklung an. Der Anteil an CD4⁺, CD8⁺ und CD11⁺ Leukozyten sowie CD11b⁺, Gr1⁺ MDSC (Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten) wurde in frisch gewonnenen, heparinversetzten Mäuseblut bestimmt. Aliquots des Blutes wurden aufgearbeitet, mit spezifischen Antikörpern inkubiert und an einem Durchflusszytometer gemessen. Die Daten zeigen acht bis zehn Mäuse pro Gruppe, sowie drei Mäuse in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Leukozyten	unbehandelt	HER-2/neu ⁺	HER-2/neu ⁺ shCREB	K-Ras ^{V12}	K-Ras ^{V12} shCREB
% CD4 ⁺	23,97 +/- 20,35	14,72 +/- 12,45	23,00 +/- 9,6	0,44 +/- 0,49	2,14 +/- 1,49
% CD8 ⁺	5,53 +/- 3,88	3,23 +/- 2,59	5,29 +/- 1,15	0,23 +/- 0,27	0,72 +/- 0,5
% CD11b ⁺	6,39 +/- 1,38	3,38 +/- 2,62	3,61 +/- 0,98	0,22 +/- 0,37	0,29 +/- 0,33
% Gr1 ⁺ , CD11b ⁺	35,59 +/- 20,59	27,06 +/- 26,94	8,87 +/- 8,49	0,29 +/- 0,33	0,97 +/- 1,2
% Gr1 ⁺	2,32 +/- 1,27	2,46 +/- 2,11	5,17 +/- 3,37	3,96 +/- 8,3	0,28 +/- 0,28

Vermehrtes Auftreten von nekrotisiertem Gewebe in CREB-defizienten Tumoren

Die in den Tierversuchen gewonnenen Tumore wurden durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass die

Blutgefäßanzahl auf der Oberfläche der shCREB Tumore deutlich reduziert war (Abb. 3.26A). Histologisch wurde dies durch die Färbung mit dem CD31-Antikörper im Gewebe bestätigt (Abb. 3.26B), wobei die Anzahl der Blutgefäße im Gewebe bei den shCREB-Tumoren um bis zu 75 % verringert war (Tab. 3.2). Im Gewebe konnte bei CREB-defizienten Tumoren des Weiteren gezeigt werden, dass es durch die mangelnde Durchblutung zu einer Nekrose kam, was auch zu einer Hypoxie im Gewebe führte (Abb. 3.26B, Tab. 3.2). Diese Befunde könnten das verringerte Tumorwachstum in den Tieren der shCREB-Gruppe erklären.

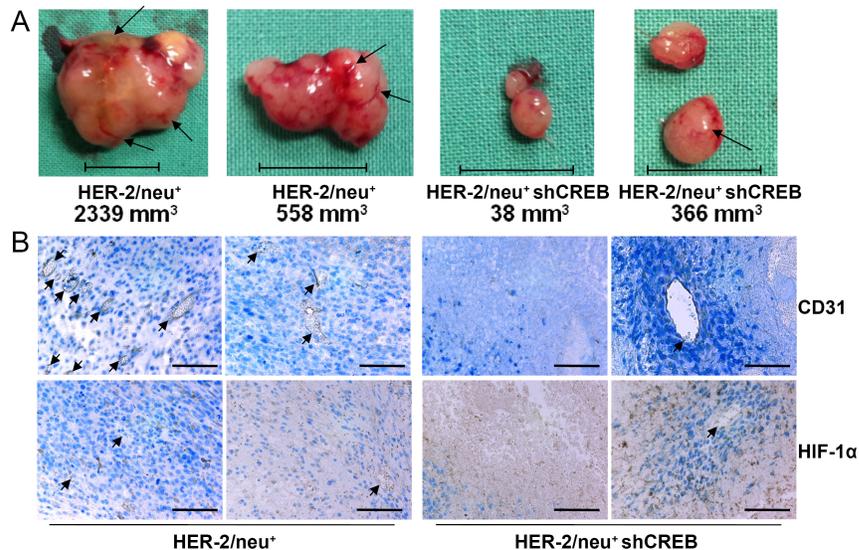


Abbildung 3.26: Histologische und immunohistochemische Untersuchungen der Organe und des Tumorgewebes. A. Makroskopische Aufnahmen der entnommenen Tumore 42 Tage nach Injektion von 1 Mio. Zellen in DBA-1-Mäuse. Die Pfeile zeigen auf Blutgefäße an der Tumoroberfläche. Das abgeschätzte Tumolvolumen ist unter den Tumoren angegeben und wurde an den entnommenen Tumoren mittels Schiebelehre bestimmt. Das Längenmaß steht für jeweils 1 cm. B. Histologische Schnitte wurden mit CD31 und HIF-1α gefärbt. Die Pfeile weisen auf Kapillargefäße hin (CD31 gefärbt). Zellkerne sind blau gefärbt. Das Längenmaß steht für jeweils 100 µm.

Tabelle 3.2: Beurteilung der histologischen Schnitte in Abb. 3.26B von HER-2/neu⁺ und CREB-defizienten Tumoren nach der Blutgefäßdichte sowie nekrotischen und hypoxischen Flächen. Es sind Daten von vier Tumoren mit jeweils vier Feldern dargestellt. Die Anzahl der Blutgefäße wurde in den CD31-gefärbten Schnitten bestimmt. Als nekrotische Flächen wurden die Tumoreareale angesehen, in denen keine Zellkerne angefärbt wurden und keine wesentlichen Strukturen mehr erkennbar sind. Mit dem HIF-1α-Antikörper braun-grau gefärbte Bereiche wurden als hypoxisches Gewebe angesehen.

Bewertungskriterium	HER-2/neu ⁺	HER-2/neu ⁺ shCREB
mittlere Blutgefäßdichte [Anzahl/Feld]	3,93 +/- 1,07	0,75 +/- 0,62 *
mittlere nekrotische Fläche [% /Feld]	7,42 +/- 3,24	17,55 +/- 8,78
mittlere hypoxischen Fläche [% /Feld]	7,16 +/- 2,25	14,89 +/- 4,79

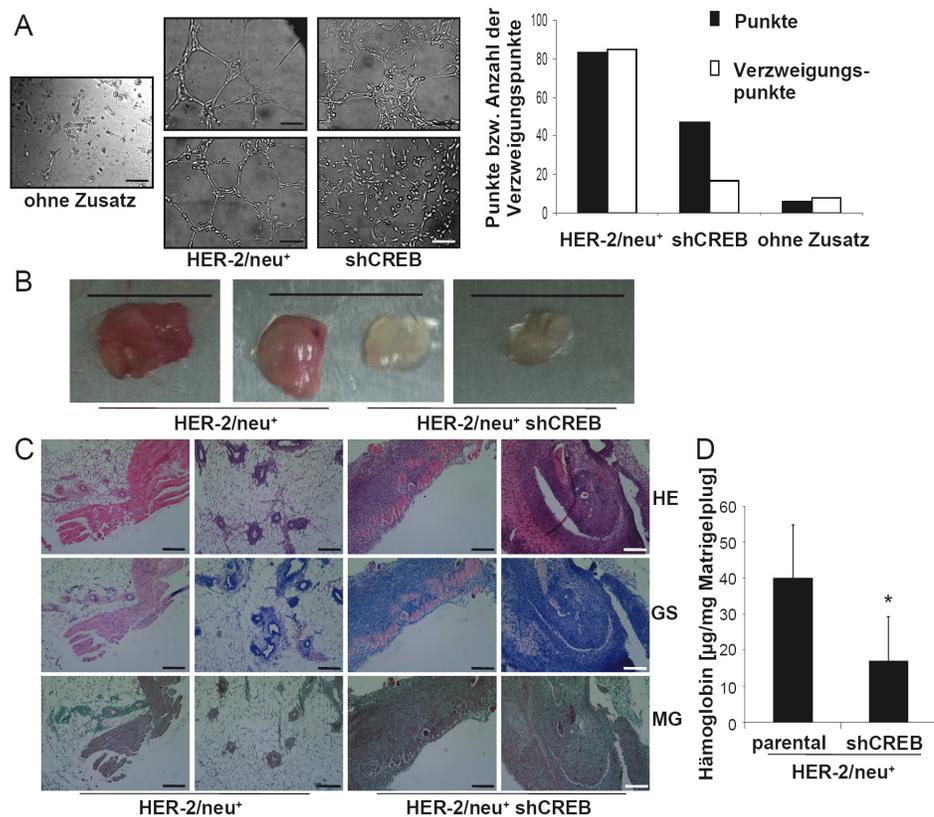
3.4.2 Einfluss des CREB-Knock-downs auf die *in vitro*- und *in vivo*-Angiogenese

Aus den vorherigen Untersuchungen wurde auf eine reduzierte Blutgefäßneubildung (Angiogenese) im Falle der verringerten CREB-Menge geschlossen. In *in vitro*-Versuchen wurde die Bildung von Maschen-ähnlichen Strukturen als Angiogenesemarker bei HUVEC-Zellen untersucht, welche mit konditionierten Kulturüberständen inkubiert wurden. Hierbei bildeten die mit HER-2/neu-Überständen inkubierten Zellen ovale bis trapezförmige Strukturen mit vielen Verzweigungspunkten aus, während die shCREB-Überstände zu unvollständig geschlossenen Strukturen und

einer reduzierten Anzahl an Verzweigungspunkten führten (Abb. 3.27A). Nicht-konditionierte Medien verursachten nur eine sehr geringe Anzahl an Verzweigungspunkten. Die *in vivo*-Angiogenese wurde durch Injektion von Matrigel mit oder ohne Zellen in Mäuse untersucht. Nach sieben Tagen zeigten die Matrigel-Plugs im Falle der HER-2/neu⁺-Zellen eine deutliche rote Färbung, welche in den shCREB-Zellen reduziert war (Abb. 3.27B). In den Matrigel-Plugs konnte durch histologische Färbungen die reduzierte Blutgefäßbildung nachgewiesen werden (Abb. 3.27C). Der Hämoglobingehalt in den HER-2/neu-Plugs war etwa 100 % höher als in den vergleichbaren shCREB-Plugs (Abb. 3.27D). Die mRNA-Expression der Gene ICAM 1 und VEGF war in den Onkogen-transformierten HER-2/neu shCREB verändert, während in den NIH3T3 shCREB-Zellen die Expression von Angiopoietin 1 und 2 verändert war (Tab. 3.3). Die Daten zeigen, dass CREB die Angiogenese durch die Heraufregulation der Faktoren VEGF und ICAM 1 beeinflusst.

Abbildung 3.27: Schlechtere Angiogenese und Auftreten von Hypoxie in Tumorgewebe nach CREB-Knock-down.

A. HUVEC-Zellen wurden auf polymerisiertem Matrigel ausgesät und mit normalen RPMI-Medium oder zusätzlich noch mit konditioniertem Medium von HER-2/neu⁺ oder HER-2/neu shCREB Zellen inkubiert. Nach 16 Std. Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fotografiert. Der Maßstab entspricht 80 µm. Rechts, Die Anzahl der Verzweigungspunkte sowie die Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen wurde mit einem Punktesystem quantifiziert. (n > 10)



B. Makroskopische Bilder von Matrigel-Plugs sieben Tage nach Injektion in DBA-1-Mäusen. Der Maßstab entspricht 1 cm. **C.** Schnitte der Plugs in B. wurden histologisch gefärbt und mikroskopiert. Der Maßstab entspricht 100 µm. **D.** Der Hämoglobingehalt der Plugs in B. wurde bestimmt. Die Daten entsprechen den Plugs von jeweils fünf Tieren.

Tabelle 3.3: Einfluss des CREB-Knock-downs auf Angiogenesemarker und Oberflächenmarker. Die mRNA-Expression von pro-angiogenen Faktoren wurde untersucht. Die Daten entsprechen drei unabhängigen Replikaten. Die Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich parentale zu CREB-defiziente Zelllinie. Es wurde auf NIH3T3 normiert.

mRNA	NIH3T3	NIH3T3 shCREB	HER-2/neu ⁺	HER-2/neu shCREB
Angiopoietin 1	1	0,56 +/- 0,23	4,06 +/- 3,01	4,63 +/- 0,41
Angiopoietin 2	1	1,7 +/- 0,39 *	0,65 +/- 0,7	1,45 +/- 0,44
ICAM 1	1	0,82 +/- 0,5	0,12 +/- 0,03	2,07 +/- 1,2 *
PECAM 1	1	1,08 +/- 0,54	0,28 +/- 0,34	0,29 +/- 0,23
VCAM 1	1	0,56 +/- 0,49	3,62 +/- 5,63	0,18 +/- 0,02
VEGF-A	1	0,87 +/- 0,53	2,76 +/- 0,31	0,79 +/- 0,49 *

3.5 Einfluss des Tumormikromilieus auf die CREB-Aktivität

3.5.1 Einfluss von Hypoxie auf die CREB-Aktivität

Gesteigerte CREB-Aktivität unter Hypoxie

Wegen der verringerten Sauerstoffversorgung und der im Gewebe auftretenden Hypoxie wurde nachfolgend untersucht, welchen Einfluss Hypoxie auf den Status von CREB hat. Hierfür wurden NIH3T3- und HER-2/neu⁺-Zellen für 24 Std. unter 1 % O₂-Gehalt inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurden die Hypoxie-spezifischen Marker Glut-1 und/oder VEGF hochreguliert, während die mRNA-Expression von CREB-1 unverändert blieb (Abb. 3.28A). Die Phosphorylierung von CREB an Ser¹³³ nahm unter 24 Std. Sauerstoffentzug sowohl bei den NIH3T3-Zellen (160 %) als auch bei den HER-2/neu⁺-Zellen (40 %) zu, während die Phosphorylierung an CREB-Ser¹²¹ unverändert blieb (Abb. 3.28B). Die Menge an CREB in den HER-2/neu⁺-Zellen veränderte sich nicht wesentlich, während die CREB-Protein-Expression in den NIH3T3-Zellen unter Hypoxie stark erhöht war. Die Zunahme der CREB-Ser¹³³-Phosphorylierung ging mit der gesteigerten Phosphorylierung von ERK-1/2 einher, während die Phosphorylierung von AKT nur leicht erhöht war (Abb. 3.28C). Durch die Inkubation der Zellen mit dem MEK/ERK-Inhibitor Trametinib konnte die Menge an phosphoryliertem CREB Ser¹³³ unter Hypoxie signifikant reduziert werden (Abb. 3.28D). U0126 zeigte in der verwendeten Konzentration keinen Effekt. Die Behandlung mit dem AKT-Inhibitor LY294002 reduzierte die Phosphorylierung an Ser¹³³ und Ser¹²¹.

Um eine mögliche EGF-R- bzw. HER-2/neu-vermittelte Signaltransduktion unter Hypoxie zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Inhibitor Lapatinib inkubiert. Schon geringe Konzentrationen des Inhibitors regulierten die Phosphorylierung von CREB herunter (Abb. 3.28E). Eine Beteiligung des cAMP-PKA-Weges für die CREB-Phosphorylierung unter Hypoxie wurde nicht nachgewiesen, da die Bildung von cAMP unter Hypoxie in allen getesteten Zellen nicht erhöht war (Abb. 3.28F). Die Zunahme der Phosphorylierung von CREB unter Hypoxie konnte auch für humane Tumorzelllinien, u.a. der Brustkrebszelllinie HTB122, gezeigt werden. Hierbei führte die Inkubation unter Hypoxie bei gleichzeitiger Überexpression von HER-2/neu zu einer sehr starken Phosphorylierung von CREB, nicht aber nach Überexpression einer dominant negativen Form von HER-2/neu (Abb. 3.28G). Bei den HER-2/neu-defizienten Transfektanten der Lungenkrebszelllinie H125 wurde unter Hypoxie CREB nicht phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Die Expression von HER-2/neu unter Hypoxie war dabei in allen getesteten Zelllinien nicht verändert (Abb. 3.28H).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass CREB bei Sauerstoffmangel in einer Zellkultur durch den gesteigerten MEK/ERK-Signalweg weiter aktiviert wird, während die Menge an HER-2/neu-Rezeptor unverändert ist. Ob weitere Signaltransduktionswege wie p38-MAPK ebenfalls einen Einfluss haben, wurde nicht bestimmt.

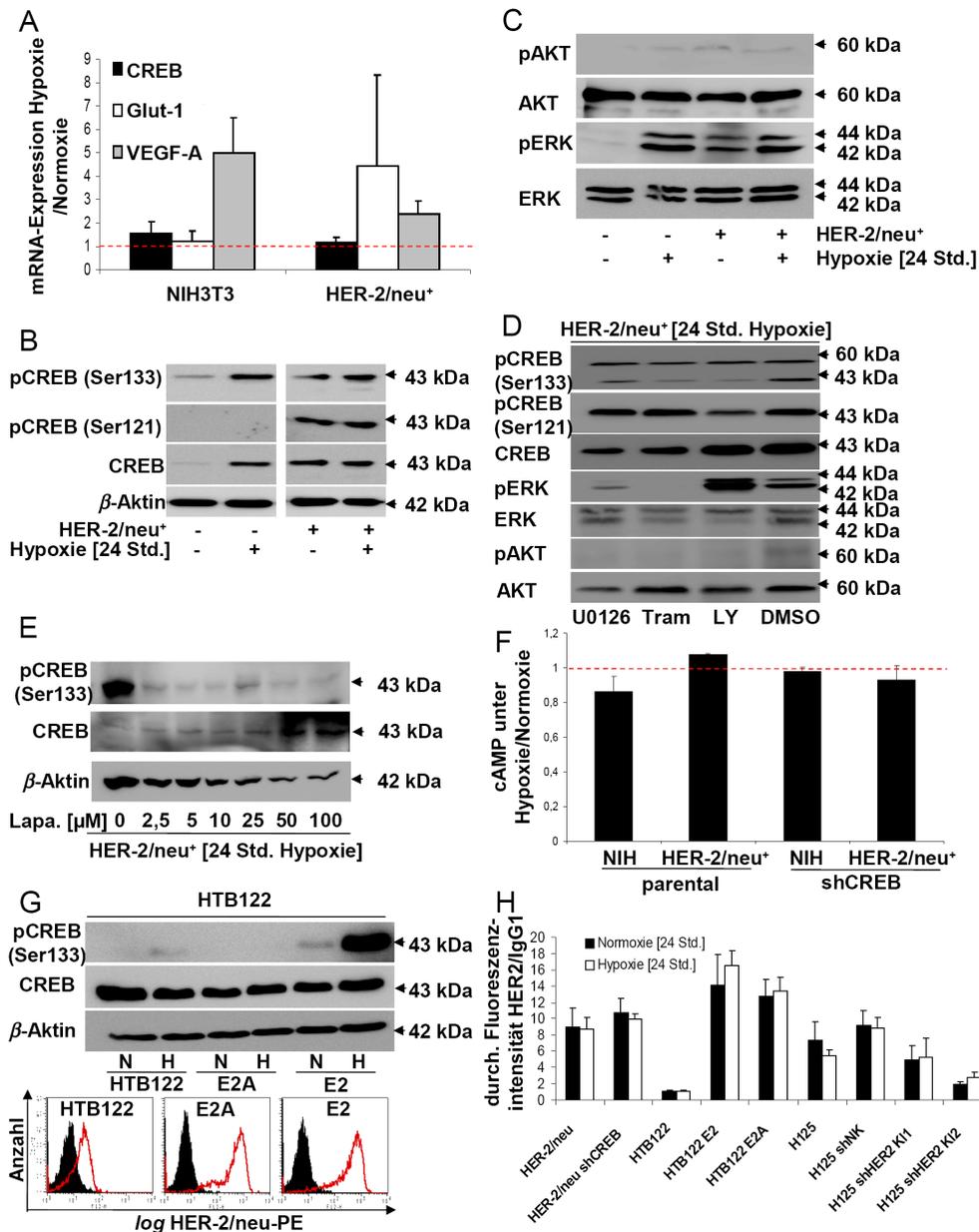


Abbildung 3.28: Beeinflussung der CREB-Phosphorylierung unter Hypoxie. **A.** Die Veränderung der mRNA-Expression von CREB, Glut-1 und VEGF-A unter 24 Std. Hypoxie gegenüber Normoxie wurde mittels qPCR untersucht. Die Daten zeigen drei Experimente. Die rot gestrichelte Linie zeigt die Normierung unter Normoxie auf „1“ an. **B.** Die Phosphorylierung von CREB an Ser¹²¹ und Ser¹³³ wurde in NIH3T3-Zellen (HER-2/neu⁻) und HER-2/neu⁺-Zellen mittels Western-Blot unter Normoxie und Hypoxie bestimmt. Die Daten zeigen eines von drei repräsentativen Experimenten. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **C.** Die AKT und ERK-Phosphorylierung der Zellen in B wurde analog untersucht. Ladekontrolle s. B. **D.** Signaltransduktionsinhibitoren gerichtet gegen den PI3K-Weg (5 μM LY294002, LY) und MEK-ERK-Weg (100 nM Trametinib, Tram; 10 μM U0126) wurden in ihrer Wirkung unter 24 Std. Hypoxie auf die CREB-Phosphorylierung und die Signalwege untersucht. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. **E.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden unter Hypoxie für 24 Std. dem EGF-R/HER-2/neu Inhibitor Lapatinib (Lapa.) in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt und die CREB-Phosphorylierung und Expression mittels Western-Blot beschrieben. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **F.** Der cAMP-Spiegel in NIH3T3, HER-2/neu⁺ und den CREB-defizienten Zellen wurde unter 24 Std. Normoxie und 24 Std. Hypoxie bestimmt. Das Verhältnis zwischen Hypoxie und Normoxie ist für drei unabhängige Experimente angegeben. Die rot gestrichelte Linie zeigt die Normierung unter Normoxie auf „1“ an. **G.** Oben, HTB122-Zellen sowie die HER-2/neu-überexprimierende Transformante (E2) bzw. eine nicht-funktionelle HER-2/neu Form (defekte zytoplasmatische Domäne, E2A) wurden für 24 Std. unter Normoxie (N) bzw. Hypoxie (H) kultiviert und die Phosphorylierung von CREB untersucht. Unten, Die HER-2/neu-Expression der Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie unter Normoxie charakterisiert. Die schwarze Fläche entspricht der Isotypkontrolle, während die rot umgrenzte Fläche HER-2/neu darstellt. **H.** Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität HER-2/neu gegen Isotypkontrolle IgG1 wurde unter Normoxie und Hypoxie mittels Durchflusszytometrie analysiert (n = 2).

Hypoxie-verbundene Modifikationen von CREB

Der Effekt von Hypoxie auf die CREB-Expression wurde in einer Zeitkinetik untersucht. Hypoxie verursachte innerhalb von 60 Min. eine Steigerung der CREB-Aktivität, die ihr Maximum etwa nach zwei Std. erreichte und dann abnahm (Abb. 3.29A), was aber nur mit geringen pH-Wertänderungen des gepufferten Mediums einherging. In diesem Zeitraum konnte das Auftreten einer Proteinbande bei ca. 60 kDa sowie teilweise Banden mit einem Molekulargewicht von > 90 kDa beobachtet werden. Nach vier Tagen Hypoxie verschwand die 60 kDa-Proteinbande (modifiziertes CREB) sowie dessen Phosphorylierung (Abb. 3.29B) wieder. Innerhalb der ersten zwölf Std. Hypoxie nahm ebenfalls die Menge an gebildeten CREB zu, während sie unter Langzeitbedingungen konstant blieb. Die Phosphorylierung an Ser¹²¹ blieb hierbei ebenfalls konstant (Abb. 3.29B). Nach drei bis vier Tagen Hypoxie wurde das Medium saurer, was die deutliche Zunahme der CREB-Phosphorylierung bei 43 kDa nach Tag drei erklären könnte.

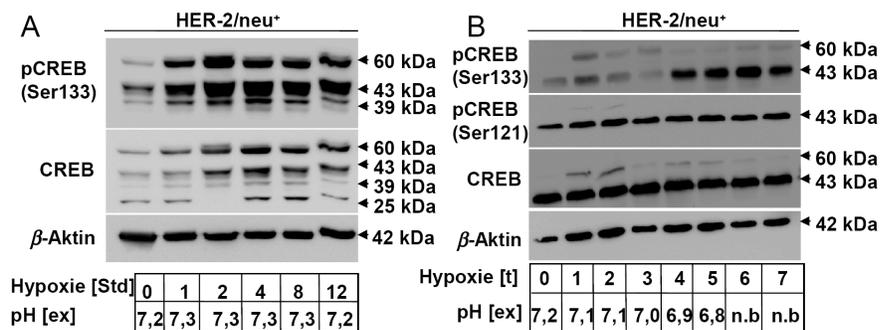


Abbildung 3.29: Hypoxie-verursachte Modifikation von CREB. A. HER-2/neu⁺-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume unter Hypoxie gesetzt oder verblieben bei normoxischen Bedingungen. Anschließend wurde die Phosphorylierung von CREB im Zelllysate bestimmt. Der direkt nach dem Ernten gemessene pH-Wert des Mediums (pH [ex]) ist angegeben. B. Die Kultivierung unter Hypoxie wurde auf bis zu einer Woche erhöht. n.b. = nicht bestimmt.

Um die Art der Modifikation von CREB zu untersuchen, wurden Zellen kurzzeitig der Hypoxie ausgesetzt und das im Zelllysate vorhandene CREB immunpräzipitiert. Nachfolgend detektierte ein Ubiquitin-spezifischer Antikörper eine Bande bei etwa 60 kDa, die unter Hypoxie stark zunahm und etwa nach vier Stunden ihr Maximum erreichte (Abb. 3.30A). Diese Bande war auch nach einem Ubiquitin-Pull-down sichtbar und unter hypoxischen Bedingungen deutlich stärker vertreten (Abb. 3.30B). Die Ubiquitinierung von CREB konnte durch die Hemmung des Proteasoms mittels MG-132 beeinflusst werden, was zusätzlich noch zur Identifizierung von höhermolekularen Formen von CREB führte, die normalerweise abgebaut werden (Abb. 3.30C). Eine Behandlung mit dem E3-Ligase-Inhibitor PYR-41 reduzierte das Auftreten dieser höhermolekularen Formen komplett und die 60 kDa Form weitestgehend.

Um weiterhin die Art der Ubiquitinierung zu bestimmen, wurden TUBEs verwendet, die bestimmte Vernetzungen der Ubiquitine erkennen (Hjerpe et al., 2009). So konnte nachgewiesen werden, dass die höhermolekularen Formen von CREB allesamt mit einer K63- oder K48-Modifizierung vorlagen und daher dem proteasomalen Abbau zugeführt wurden (Abb. 3.30D). Die 60 kDa

Proteinbande konnte jedoch nicht eindeutig bei diesem Experiment identifiziert werden, so dass eine Mono-Ubiquitinierung an zwei Lysin-Seitenketten oder eine Oligo-Ubiquitinierung an einer Seitenkette angenommen werden kann.

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass ein Teil von CREB unter Hypoxie dem proteasomalen Abbau durch Poly-Ubiquitinierung zugeführt wird, während ein anderer Teil Oligo- bzw. Mono-ubiquitiniert wird, was auch zu Funktionsänderungen führen könnte.

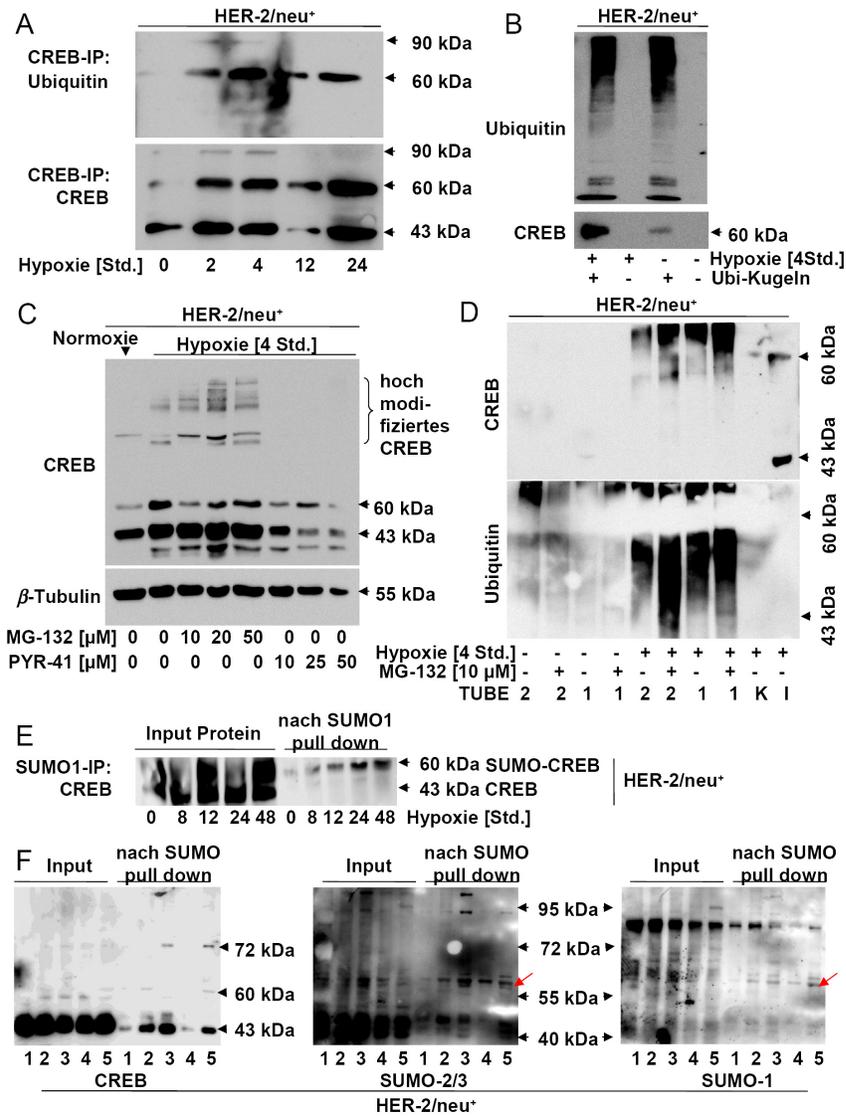


Abbildung 3.30: Hypoxie-vermittelte Ubiquitinierung und SUMOylierung von CREB. **A.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für die angegebene Zeit unter Hypoxie gehalten. Das CREB im Zelllysate wurde mittels IP gefällt, auf einem Gel aufgetrennt und Ubiquitin bzw. CREB immunologisch nachgewiesen. **B.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für 0 und vier Std. unter Hypoxie gesetzt und das Zelllysate mittels Ubiquitin-spezifischer Kugeln (Ubi-Kugeln, +) oder Kontrollkugeln (-) behandelt. Die Detektion von Ubiquitin und CREB erfolgte mittels WB. **C.** Zellen wurden für vier Std. unter Hypoxie mit unterschiedlichen Konzentrationen an MG-132 (Proteasominhibitor) bzw. PYR-41 (Ubiquitinligase-E1-Inhibitor) behandelt. Normoxische Zellen dienten als Kontrolle. **D.** Zellen wurden unter Normoxie oder Hypoxie +/- MG-132 gehalten (vier Std.) und das Zelllysate mit TUBE 1 oder 2 behandelt. Die eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immunologisch nachgewiesen. K = Kontrollkugeln, I = Input. **E.** Die SUMOylierung von CREB wurde mittels IP von SUMO1 und anschließender Immunfärbung nachgewiesen. **F.** Zelllysate von Hypoxie-behandelten HER-2/neu⁺-Zellen wurden mit SUMO-spezifischen Kugeln inkubiert und die eluierten Proteine immunologisch nachgewiesen. Spur 1 = 0 Std. Hypoxie, Spur 2 = eine Std. Hypoxie, Spur 3 = vier Std. Hypoxie, Spur 4 = 24 Std. Hypoxie, Spur 5 = 48 Std. Hypoxie. Der rote Pfeil zeigt auf die SUMO-CREB-Bande bei etwa 60 kDa.

Da die Modifikation bei 60 kDa nach Hemmung der Ubiquitinierung durch MG-132 nicht komplett verschwand, wurde überprüft, ob eine weitere Modifikation vorliegen könnte. Es wurde eine Immunpräzipitation mit einem SUMO-1 Antikörper durchgeführt, bei der eine Bande von etwa 60 kDa CREB nachwies, die unter Hypoxie verstärkt auftrat und ihr Maximum nach 48 Std. erreichte (Abb. 3.30E). Ein SUMO-Pull-down bestätigte die Funde und zeigte ein Vorliegen von SUMO-2/3 als auch SUMO-1 an (Abb. 3.30F). Eine weitere Bande bei 72 kDa konnte nach SUMO-Pull-down als CREB identifiziert werden. Ein gleichzeitiger Nachweis von SUMO-1 oder SUMO-2/3 war hierbei jedoch nicht erfolgreich.

Unterschiedliche Lokalisation von CREB unter Hypoxie

Aus dem proteasomalen Abbau wurde auf einen Export von CREB gefolgert. Daher wurde die Lokalisation von CREB unter beiden Kultivierungsbedingungen untersucht. Mittels ICC konnte gezeigt werden, dass CREB unter Normoxie vor allem im Zellkern zu finden ist, während der extranukleäre Anteil unter Hypoxie deutlich erhöht ist (Abb. 3.31A). Eine Fraktionierung der Proteine in zytoplasmatische, Organellen- und Kern-Proteine konnte nachweisen, dass CREB unter Hypoxie verstärkt in den Mitochondrien vorhanden ist (Abb. 3.31B). Dies konnte durch Überlagerung mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff (*MitoTracker Red*) in der ICC bestätigt werden (Abb. 3.31C). Der extranukleäre Anteil von CREB erreicht je nach Darstellungsmethode bis zu 35 % (Abb. 3.31D). Hypoxie-Behandlung verursachte weiterhin eine Veränderung der "Foci" Morphologie hin zu einer flacheren, Fibroblasten-ähnlicheren Morphologie (Abb. 3.31E), welche vermutlich durch eine vergrößerte Oberfläche die Sauerstoffversorgung begünstigen soll. Um auszuschließen das CREB nur an der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist, wurden Mitochondrien aus hypoxischen Zellen isoliert und mit Proteinase K und/oder Triton-X100 behandelt. Da die CREB-Bande nur bei Kombinationsbehandlung verschwand, ist eine Lokalisierung von CREB innerhalb der Mitochondrienmembran(en) wahrscheinlich (Abb. 3.31F).

Um nachzuweisen, ob das mitochondriale CREB aus dem Kern stammte, wurden Zellen unter Hypoxie mit dem Kern-Export-Inhibitor Leptomycin B, dem AKT-Inhibitor LY294002 und dem Ubiquitin-Inhibitor PYR-41 behandelt und erneut die Lokalisation von CREB untersucht. Alle drei Inhibitoren verringerten im Vergleich zur Kontrolle deutlich die Menge an CREB in den Mitochondrien (Abb. 32). Unter Leptomycin B-Behandlung reicherten sich die hochmolekularen Formen von CREB im Zellkern an und wurden nicht mehr im Zytoplasma dem proteasomalen Abbau zugeführt. Ebenfalls kann MEK1 nun auch nicht mehr in das Zytoplasma transportiert werden, was als Kontrolle für die Leptomycin B-Behandlung gilt (Asscher et al., 2002).

Die Daten zeigen, dass CREB unter Hypoxie vermehrt in den Mitochondrien zu finden ist und dass ein Transport von CREB mit Ubiquitinmodifikation und den AKT-Weg zusammen hängt.

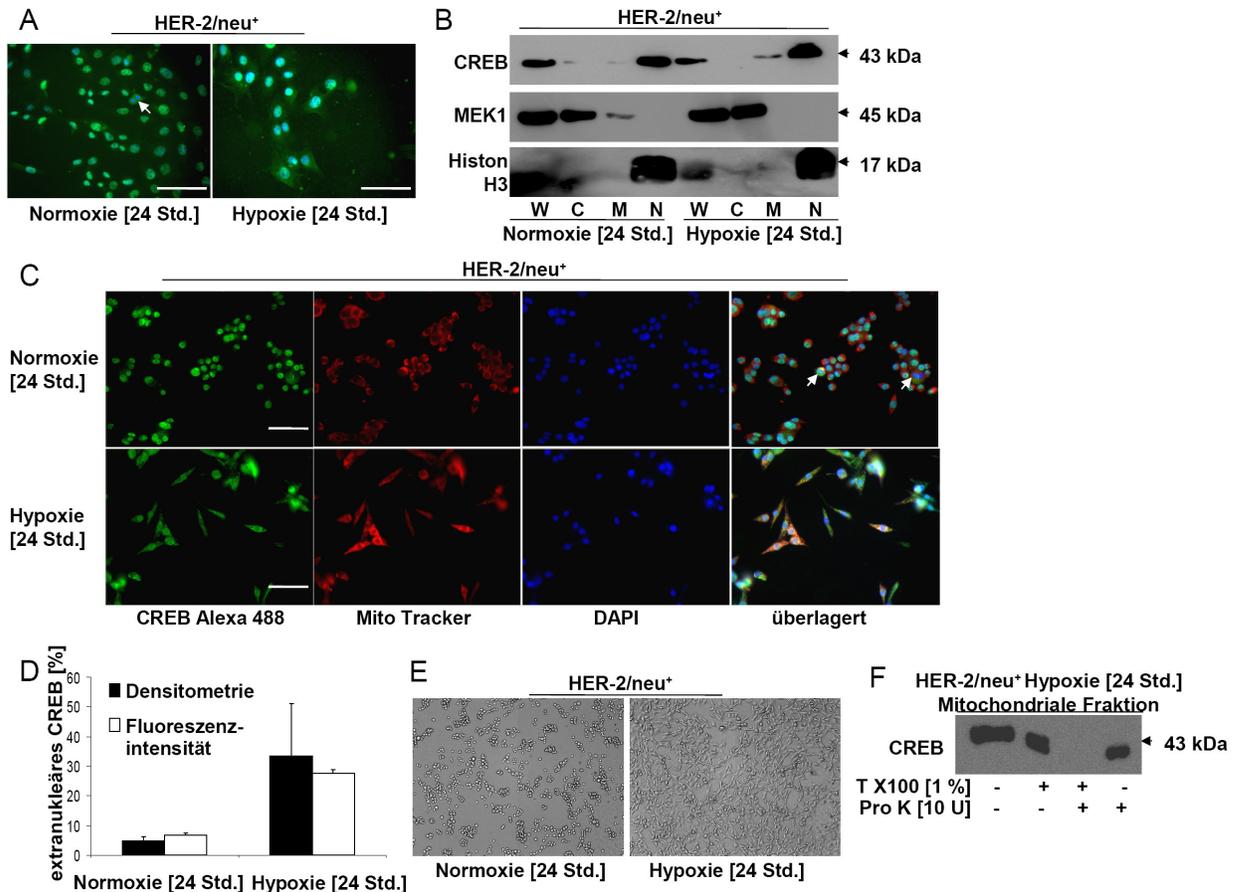


Abbildung 3.31: Verstärkte mitochondriale Lokalisierung von CREB unter Hypoxie. **A.** Nach 24 stündiger Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie wurden die Zellen auf den Platten fixiert und die Expression von CREB immunzytochemisch am Leica DM IRB nachgewiesen. Zellkerne erscheinen durch die DAPI-Färbung in blau, CREB mit Alexa 488 in grün. Der Balken entspricht 80 μ m. Der Pfeil zeigt auf eine sich teilende Zelle, in der CREB nur extranukleär nachgewiesen werden konnte. **B.** Von unter Hypoxie- bzw. Normoxie-behandelten Zellen wurden Proteinfraktionierungen durchgeführt und auf einem Gel aufgetrennt. Die Lokalisation von CREB wurde immunologisch nachgewiesen. MEK1 diente als Zytoplasma-Marker, während Histon H3 die Reinheit der Fraktionen bezüglich Kernproteine anzeigte. W = Totallysat, C = Zytoplasmafraktion, M = Membran- und Mitochondrienfraktion, N = Kernfraktion. **C.** CREB wurde immunzytochemisch in 24 Std. unter Normoxie bzw. Hypoxie behandelten Proben am BD Pathway 855 dargestellt. Für die Kernfärbung wurde DAPI (blau) verwendet, *MitoTracker Red* färbt Mitochondrien spezifisch an (rot) und CREB-Antikörper wurde mit Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert (grün). Die beiden Bilder rechts zeigen das aus allen Kanälen überlagerte Bild. Der Balken entspricht 80 μ m. Die Pfeile zeigen auf sich teilende Zellen, in denen kein CREB im Kern sondern nur noch extranukleär nachweisbar ist. **D.** Die Densitometrie der extranukleären Signale in B. bzw. die extranukleäre Fluoreszenzstärke von CREB in C. wurde quantifiziert und ist als Ergebnis von drei Experimenten dargestellt. Die Densitometrie bezieht sich auf das Gesamtlusat. **E.** Durchlichtaufnahmen von Hypoxie-ausgesetzten HER-2/neu⁺-Zellen weisen im Gegensatz zu normoxischen Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf. **F.** Mitochondrien einer Fraktionierung wurden mit Triton X-100 und/oder Proteinase K behandelt und die Stabilität von CREB durch Western-Blot ermittelt.

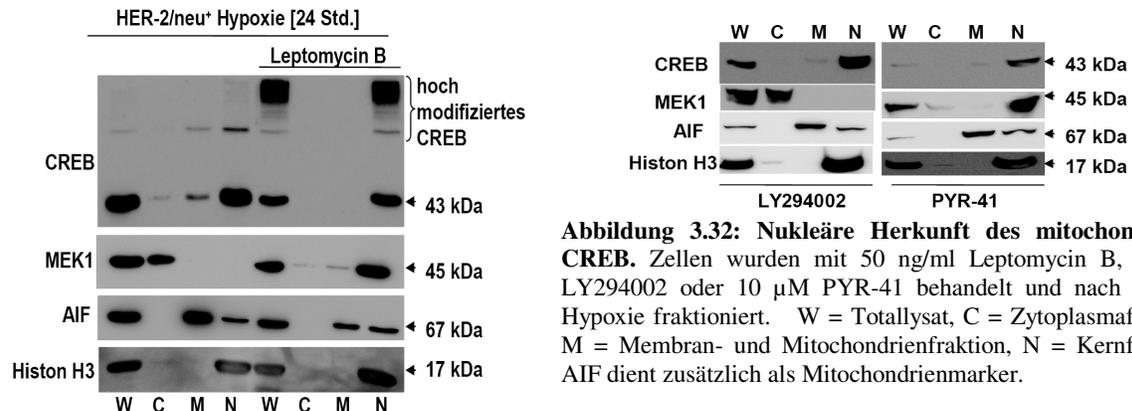


Abbildung 3.32: Nukleäre Herkunft des mitochondrialen CREB. Zellen wurden mit 50 ng/ml Leptomycin B, 10 μ M LY294002 oder 10 μ M PYR-41 behandelt und nach 24 Std. Hypoxie fraktioniert. W = Totallysat, C = Zytoplasmafraktion, M = Membran- und Mitochondrienfraktion, N = Kernfraktion. AIF dient zusätzlich als Mitochondrienmarker.

Bedeutung von CREB für die mitochondriale Aktivität und Biogenese

Mittels Subfraktionierung konnte die genaue Lokalisierung von CREB in den Mitochondrien bestimmt werden. Unmodifiziertes CREB (43 kDa) konnte in der Mitochondrien-Matrix nachgewiesen werden, während die modifizierte Form von CREB (~60 kDa) auch in den Mitochondrienmembranen detektiert wurde (Abb. 3.33A).

Für die Funktion von mitochondrialem CREB wurde zunächst die mRNA-Expression der mitochondrialen, proteincodierenden Gene untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von ND5, COXIII und ATP Synthase 6 nach CREB-*Knock-down* um bis zu 60 % verringert war (Abb. 3.33B), während andere mitochondriale mRNA nicht signifikant reguliert war (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette vermutet. Durch Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (SVR) in einem extrazellulären Flussanalysator können Rückschlüsse auf die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette geschlossen werden. Dazu wurden Zellen unter Normalbedingungen (Normoxie) kultiviert und die SVR gemessen. Anschließend wurde Oligomycin automatisiert hinzugegeben, was die F_O-F₁-ATP-Synthase hemmte und die SVR für die ATP-Produktion und das Protonenleck anzeigte (Abb. 3.33C). Die Injektion des Entkopplers FCCP erlaubte den Rücktransport von Protonen außerhalb der F_O-F₁-ATP-Synthase, wodurch die SVR anstieg. Zuletzt erfolgte eine kombinierte Zugabe von Antimycin A (Komplex III-Inhibitor) und Rotenon (Komplex I-Inhibitor), wodurch der Elektronenfluss und der Protonengradient gehemmt wurden. In zellbasierenden Tests konnte unter diesen Bedingungen an lebendem Material eine reduzierte mitochondriale Atmung nachgewiesen werden, die mit einer 45 % verringerten Reservekapazität der Atmung einher ging (Abb. 3.33D). Die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette wurde mittels Blau-Nativer-Gelelektrophorese und anschließenden Aktivitätsfärbungen dargestellt. Hierbei war die Aktivität des NADH-Komplexes (Komplex I) als eine Protein-Bande bei ~1000 kDa detektierbar, die in den HER-2/neu⁺-Zellen deutlich stärker ausfiel als in den CREB-defizienten Zellen (Abb. 3.33E). Die Aktivität der Succinatdehydrogenase (Komplex II), welche als Bande bei ca. 230 kDa sichtbar war, war in beiden Zelllinien vergleichbar, während die 320 kDa Bande der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) in den shCREB Zelllinien deutlich schwächer war. Eine Aktivitätsbestimmung der isolierten ATP-Synthase (Komplex V) erfolgte durch den ATP-Umsatz mit Freisetzen von Phosphat, welches mit Ca²⁺ präzipitierte. Vor einem dunklen Hintergrund analysiert, war diese nicht signifikant verändert. Die reduzierte Aktivität des Komplexes I wurde durch spektrometrische Analysen bestätigt. Eine ATP-Messung an Zellen bestätigte die verringerte ATP-Synthese bei zellulärer CREB-Defizienz, welche aus der niedrigen mitochondrialen Atmung resultierte (Abb. 3.33F). Die mitochondriale Aktivität in lebenden Zellen war nach CREB-*Knock-down* um bis zu 40 % vermindert (Abb. 3.33G). CREB reguliert demnach die mitochondriale Atmungskette.

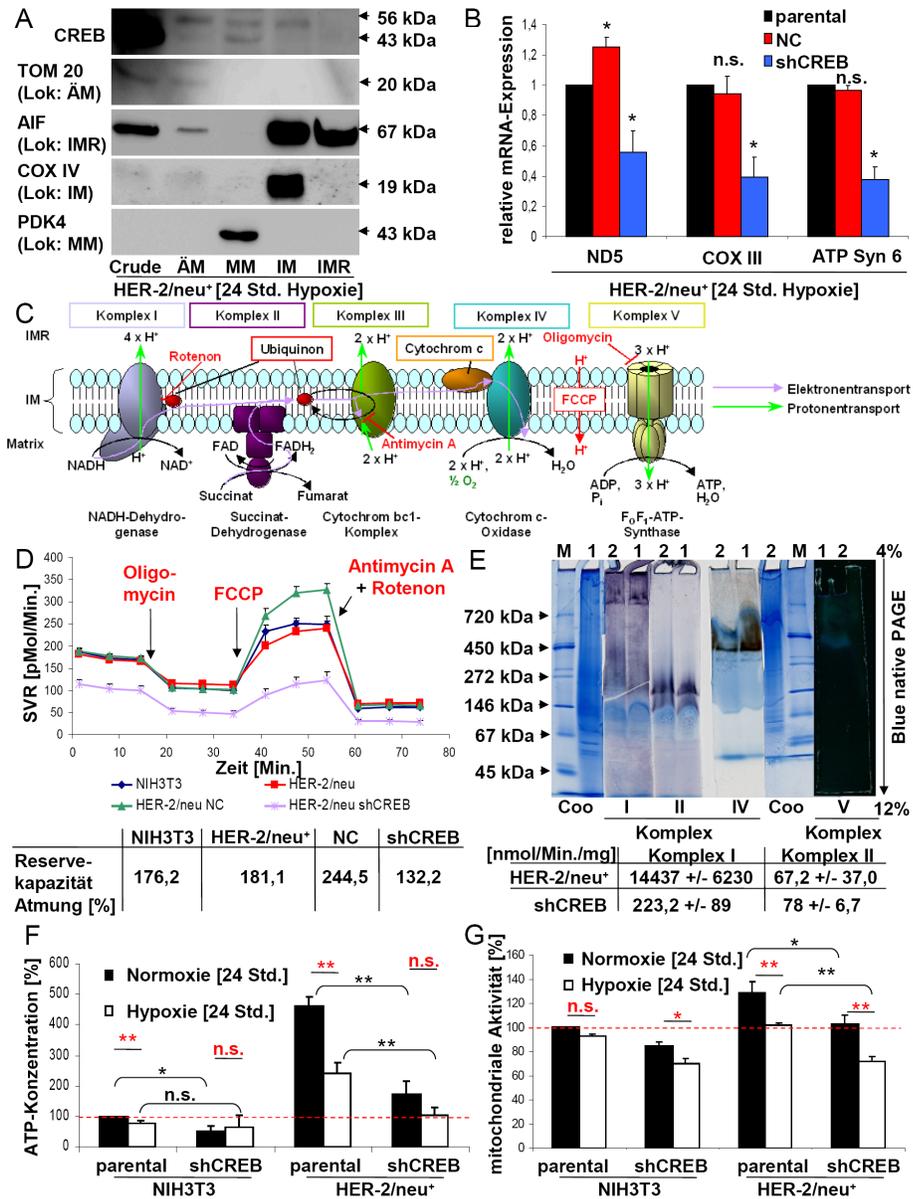


Abbildung 3.33: CREB wird unter Hypoxie in die Mitochondrien-Matrix transportiert und beeinflusst dort die Mitochondrien-Aktivität. **A.** Aus hypoxischen Zellen wurden Mitochondrien isoliert und diese weiter subfraktioniert. Crude = Lysat aus intakten Mitochondrien, ÄM = äußere Mitochondrienmembran, IMR = Intermembranraum, IM = innere Mitochondrienmembran, MM = Mitochondrien-Matrix. Die Anwesenheit von CREB in den Fraktionen wurde mittels WB bestimmt. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels spezifischer Marker kontrolliert, wobei AIF auch an der IM detektierbar war. **B.** Die mRNA-Expression der mitochondrial kodierten Gene wurde durch qPCR untersucht. Die Balken zeigen die signifikant regulierten mRNA-Expressionen im Vergleich zur parentalen HER-2/neu⁺-Zelllinie. Die Daten entsprechen drei unabhängigen Replikaten. **C.** Darstellung der mitochondrialen Atmungskette und den verwendeten Inhibitoren. Es wurde die SVR bestimmt. **D.** Die SVR wurde mit einem extrazellulären Flussanalysator bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten fand eine automatische Zugabe der Inhibitoren statt. Es sind Mittelwerte einer Achtfachmessung gezeigt. Unten, Die Reservekapazität der Atmung wurde aus den Daten der Kinetik berechnet. **E.** Oben, Darstellung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskomplexe. Hierbei wurden über Blau-Native-Gelelektrophorese (4-12 % Gradientengel) die einzelnen Komplexe getrennt und anschließend über spezifische Färbungen die Aktivitäten der einzelnen Komplexe nachgewiesen. Komplex I erscheint als violette Bande mit einem Molekulargewicht von ~1000 kDa, Komplex II ist eine dunkelviolette Doppelbande bei 230 und 160 kDa. Aktivität des Komplex IV ist als dunkelgrüne Bande bei 320 kDa sichtbar, ATP-Synthase (Komplex V) als weißes Präzipitat, welches vor einem dunklen Hintergrund, bei 430 kDa erkennbar ist. M = Marker, 1 = HER-2/neu⁺, 2 = HER-2/neu⁺ shCREB, Coo = Coomassiefärbung. Unten, Die Aktivität der mitochondrialen Komplexe wurde zusätzlich durch spektrometrische Messungen bestimmt (n = 3). **F.** Die ATP-Produktion wurde unter Hypoxie bestimmt und mit den Daten unter Normoxie verglichen (n = 3). Statistik: Rot, Normoxie vs. Hypoxie; Schwarz, parental vs. shCREB **G.** Die mitochondriale Aktivität in HER-2/neu⁺-Zellen erfolgte durch Bestimmung des XTT-Umsatzes (n = 3). Statistik s. F.

Die reduzierte mRNA-Expression verschiedener mitochondrialer Gene nach CREB-*Knock-down* lässt sich nicht über die Bindung von CREB an Promotoren erklären, da die mitochondriale DNA als Plasmid vorliegt und eine polycistronische prä-mRNA gebildet wird, aus der die mRNA bzw. tRNA und rRNA prozessiert wird. Auch die Kopienzahl der mitochondrialen DNA war unter den untersuchten Bedingungen unverändert (Abb. 3.34A), was die veränderte mRNA-Expression somit nicht erklärt. CRE-Elemente befinden sich einerseits im sogenannten D-LOOP der DNA, an dem die Replikation der polycistronischen prä-mRNA ansetzt und in mehreren Genen (Abb. 3.34B). Durch eine modifizierte ChIP konnte die Bindung von CREB an den D-LOOP nachgewiesen werden (Abb. 3.34C). Da auch mehr PCR-Produkt bei Hypoxie-behandelten Proben entstand, lässt sich eine verstärkte Bindung von CREB an diese Struktur unter Sauerstoffmangel vermuten. Die gesteigerte Bindung von CREB an die CRE-Struktur lässt sich auch durch die erhöhte Aktivität der mitochondrialen PKA unter Hypoxie erklären (Abb. 3.34D).

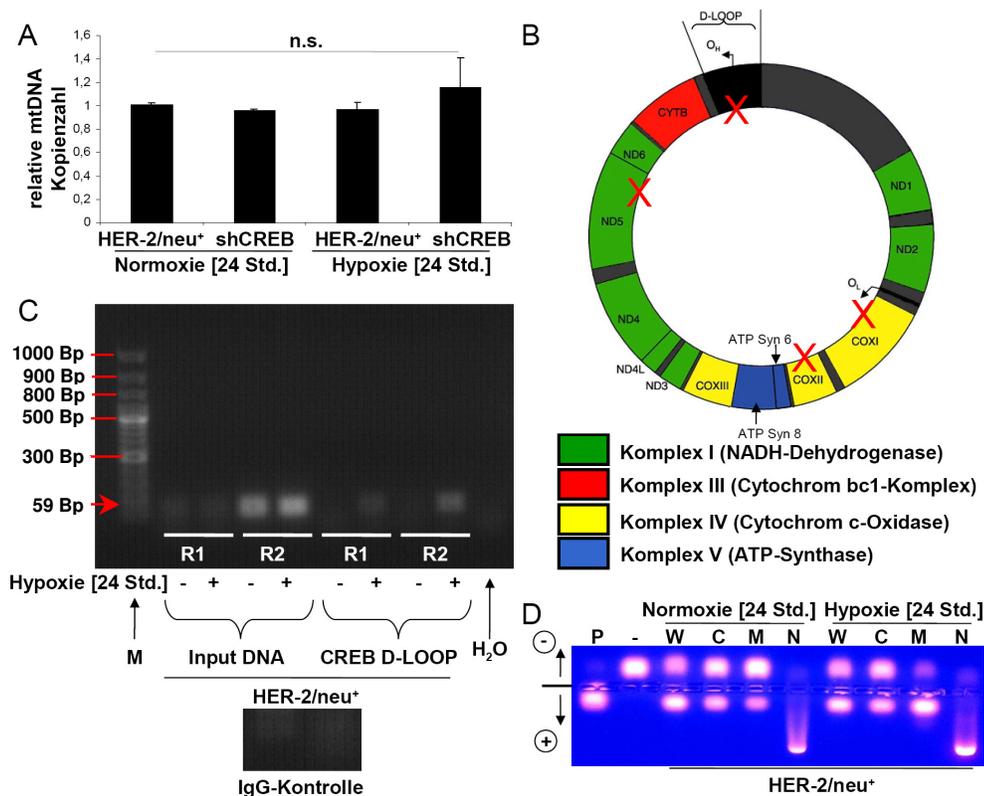


Abbildung 3.34: Verstärkte CREB-Bindung unter Hypoxie an den D-LOOP der mitochondrialen DNA. **A.** Die relative Kopienanzahl der mitochondrialen DNA (mtDNA) wurde durch den Vergleich der Expression von COXI mtDNA mit der von genomischer 18S rDNA nach qPCR errechnet. Es sind die Daten aus zwei unterschiedlichen Replikaten dargestellt. **B.** Übersicht über die Organisation der mtDNA. Die proteinkodierenden Regionen der mtDNA sind den vier mitochondrialen Komplexen mit Bestandteilen mitochondrialer Herkunft zugeordnet. In grau sind die Bereiche der tRNAs und der rRNAs angegeben. Weiterhin sind die Strukturen des D-LOOPS (schwarz) sowie die Replikationsursprünge der leichten und schweren Kette (O_L bzw. O_H) gekennzeichnet. Putative CRE-Elemente sind mit roten Kreuzen markiert. **C.** Eine Bindung von CREB an das CRE-Element des D-LOOPS wurde mit einer DNA-IP und anschließender qPCR bestimmt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert. R1 und R2 bezeichnen zwei von drei unabhängigen Replikaten. Die Behandlung mit Hypoxie und die eingesetzten Produkte sind angegeben. Ein IgG-Antikörper diente als Negativkontrolle. M = 100 Bp-Marker, H₂O = Wasserkontrolle. **D.** Von Zellfraktionierungen wurde die PKA-Aktivität bestimmt und die Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert. Die Laufrichtung der Peptide ist angegeben (+/-). W = Totallysat, C = Zytoplasmafraktion, M = Membran- und Mitochondrienfraktion, N = Kernfraktion, P = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle.

Mitochondrien unterlaufen unter Hypoxie einen Prozess der Fragmentierung, der sogenannten Fission. Dies konnte mit einer ICC im murinen Modellsystem bestätigt werden (Abb. 3.35A): Das mitochondriale Netzwerk weicht unter Hypoxie einer mehr kernnahen, perinukleären Lokalisation. Durch Mitophagie werden dabei nicht funktionelle Mitochondrienfragmente abgebaut und das verbliebene, funktionelle Material für eine neue Biogenese verwendet. Die Mitophagie wird dabei durch Autophagiemarker wie ATG5 und 7 gesteuert, welche unter Hypoxie und Ubiquitinierung verstärkt vorlagen (Abb. 3.35B), bzw. durch CREB positiv reguliert werden.

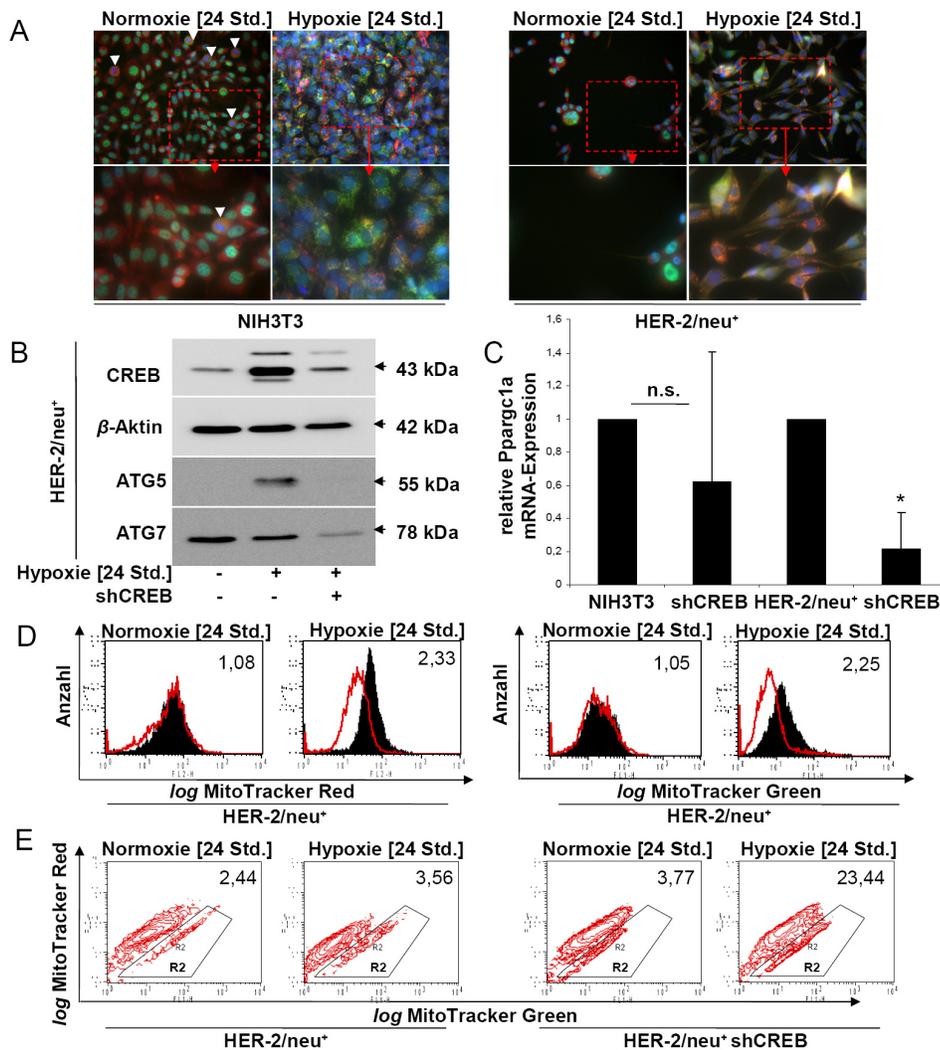


Abbildung 3.35: CREB beeinflusst die mitochondriale Biogenese und den Abbau dysfunktionaler Mitochondrien. **A.** Immunzytochemische Bilder von HER-2/neu⁺- und NIH3T3-Zellen wurden nach normoxischen und hypoxischen Bedingungen am BD Pathway 855 aufgenommen. Die Farben entsprechen denen in Abb. 3.31 C. Der rot eingerahmte Bereich wird unten vergrößert dargestellt (Vergrößerung: oben 20x, unten 40x). Die Pfeile zeigen auf sich teilende Zellen, in denen kein CREB im Kern sondern nur noch extranukleär nachweisbar ist. Die Einzelfärbungen finden sich im Anhang (Kapitel III.). **B.** Die Proteinexpression von CREB und der Autophagiemarker ATG5 und 7 wurde unter Einfluss von Hypoxie in HER-2/neu⁺-Zellen und shCREB-Zellen mittels Western-Blot untersucht. Eines von drei Replikaten ist gezeigt. **C.** Dargestellt ist die durch qPCR ermittelte mRNA-Expression von PPARC1α unter Normoxie. Die Daten entsprechen zwei biologischen Replikaten. **D.** Vitale Zellen wurden nach Hypoxie oder Normoxie mit den Farbstoffen *MitoTracker Green* (mitochondriale Masse) oder *MitoTracker Red* (mitochondriale Aktivität) gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die CREB-defizienten Zellen sind innerhalb der rot umrahmten Fläche zu finden, die parentalen in der schwarzen Fläche. Die Zahl gibt das MFI-Verhältnis parental/CREB-defizient an. **E.** Konturplots der Zellen aus D. Die Zellen im Bereich R2 werden als Zellen mit dysfunktionalen Mitochondrien angesehen (stärkeres Grünsignal als Rotsignal). Die Zahl gibt den prozentualen Anteil dieser Region an.

Des Weiteren wird die Neusynthese der Mitochondrien u.a. durch *PPARGC1 α* reguliert, welches durch *CREB-Knock-down* in *HER-2/neu⁺*-Zellen um etwa 80 % reduziert wurde (Abb. 3.35C). Durch den Verlust der Mitophagie wurde eine Anreicherung von nicht funktionalen Mitochondrien vermutet. Mit einer Doppelfärbung von *MitoTracker Red* und *MitoTracker Green* konnte dies bestätigt werden: Während die Einzelfärbung mit *MitoTracker Red* einen leichten Verlust der Atmung bei *CREB-Defizienz* bzw. *MitoTracker Green* die mitochondriale Masse unter *CREB-Repression* zeigte (Abb. 3.35D), war in den *shCREB* Zelllinien eine Anreicherung von Zellen mit weniger roter Fluoreszenz bei vorhandener grüner Fluoreszenz sichtbar, was den dysfunktionalen Mitochondrien entspricht (Abb. 3.35E).

Verlust des mitochondrialen Potentials nach CREB-Knock-down unter Hypoxie

Die auftretenden Dysfunktionen blieben nicht folgenlos für die Zellen: Während unter Normoxie der *CREB-Verlust* zu einem ~20 %igen Vitalitätsverlust innerhalb 24 Std. führte, so trat unter Hypoxie im selben Zeitraum ein 40 %iger Verlust auf, der unter länger andauernder Inkubation noch zunahm (Abb. 3.36A). Dies war teilweise auf die Aktivierung von Caspasen, wie z.B. *Caspase-3*, zurückzuführen. Bei den *CREB-Knock-down-Zellen* wiesen unter Hypoxie etwa 60 % der Zellen eine Aktivierung der *Caspase-3* auf (Abb. 3.36B). Auch das Mitochondrienpotential war in den *shCREB-Zelllinien* unter Hypoxie leicht reduziert (63 % der *shCREB-Zellen* im Vergleich zu 84 % bei den *HER-2/neu⁺*, Abb. 3.36C).

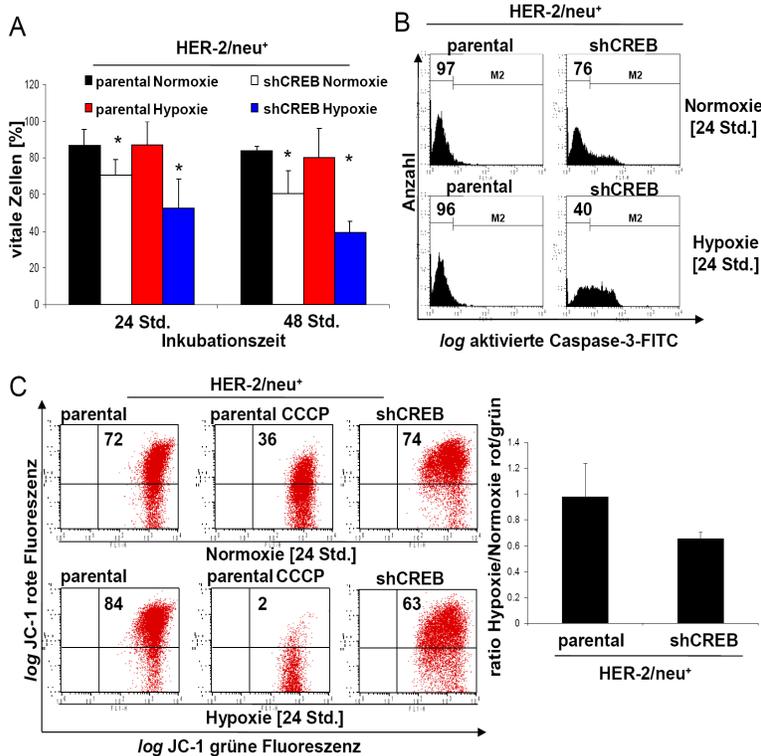


Abbildung 3.36: Auswirkungen mitochondrialer Dysfunktionen auf das Überleben der Zellen. A. Die Vitalität der Zellen unter Normoxie und Hypoxie wurde durch AnnexinV/PI-Färbung bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Replikaten. B. Aktivierte *Caspase-3* wurde durchflusszytometrisch in parentalen *HER-2/neu⁺* sowie den *shCREB-Zellen* unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Die Histogramme zeigen eines von drei repräsentativen Replikaten, wobei die Anzahl der Zellen mit nicht aktivierter *Caspase-3* angegeben ist. M2 kennzeichnet die Zellen mit aktivierter *Caspase-3*. C. Das Mitochondrienpotential in *HER-2/neu⁺* und *shCREB-Zellen* wurde unter Normoxie und Hypoxie durch *JC-1-Färbung* und anschließender Durchflusszytometrie untersucht. Die Zahlen geben den Anteil an Zellen mit intakten Mitochondrien an (Quadrant oben rechts). 2 μ M *CCCP* diente als Positivkontrolle. Rechts, Das Ratio Normoxie/Hypoxie für drei unabhängige Experimente ist dargestellt.

Beeinflussung der CREB-Aktivität durch Veränderungen des Tumormikromilieus unter Hypoxie

Hypoxie führte zu einer Reduktion des extrazellulären und intrazellulären (pHi) pH-Werts. Im normoxischen Bereich betrug der pHi etwa 7,5 bei den NIH3T3-Zellen und pH 7,3 bei den HER-2/neu⁺. Ein *Knock-down* von CREB revertierte diesen Effekt in den HER-2/neu⁺ wieder auf pH 7,5 (Abb. 3.37A). Der Protonenpumpeninhibitor ESOM zeigte eine gute Wirkung in den HER-2/neu-Überexpressionszelllinien, in dem er den pHi weiter erniedrigte, bei den beiden NIH3T3-Zellen war er wirkungslos. Unter Hypoxie lagen alle pHi-Werte mit Ausnahme bei der NIH3T3 shCREB-Zelllinie etwa 0,1 bis 0,2 pH-Einheiten unter denen der Normoxie. Eine schnelle Regeneration des pHi unter Normoxie nach 24 Std. Hypoxie wurde in allen Zellen innerhalb 60 Min. beobachtet (Abb. 3.37B).

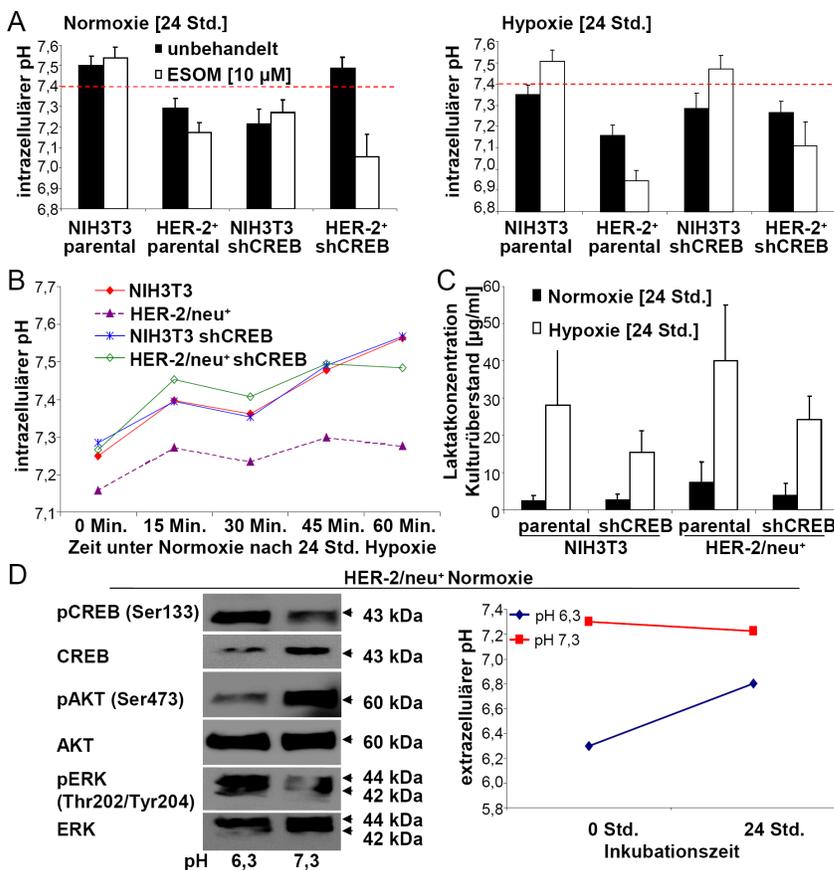


Abbildung 3.37: Mediierte Veränderungen des Tumormikromilieus durch Hypoxie. A. Durch Färbung von Zellen mit BCECF konnte der intrazelluläre pH-Wert bestimmt werden. Der Protonenpumpeninhibitor ESOM wurde in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Die rot gestrichelte Linie entspricht einem pH von 7,4. B. Die Veränderungen des pH-Wertes unter Reoxygenierung nach 24 Std. Hypoxie wurde über einen Zeitraum von 60 Min. untersucht. C. Vom zellfreien Kulturüberstand wurde nach 24 Std. Normoxie oder Hypoxie die Laktatkonzentration im Kulturüberstand gemessen. D. Links, HER-2/neu⁺-Zellen wurden in pH neutralem (7,3) und leicht saurem Medium (6,3) für 24 Std. inkubiert und danach die Phosphorylierung von CREB und der Signalwege mittels Western-Blot bestimmt. Rechts, Der pH-Wert des Kulturmediums wurde nach dieser Zeit mit dem Startwert verglichen.

Unter Normoxie wiesen nur die HER-2/neu⁺-Zellen eine stärkere Sekretion von Laktat in das Kulturmedium auf, während bei Hypoxie die Laktatsekretion bei allen Zelllinien deutlich gesteigert war (Abb. 3.37C). Eine Ansäuerung des Kulturüberstandes auf pH 6,3 erhöhte die Ser¹³³-Phosphorylierung von CREB deutlich, was vermutlich durch die gesteigerte ERK-Phosphorylierung verursacht wurde (Abb. 3.37D).

Die Daten zeigen somit, dass CREB das Überleben von Zellen unter Hypoxie fördert und mitochondriale Funktionen unter diesen Bedingungen stabilisieren kann. Die CREB-Aktivität selber kann dabei durch das Tumormikromilieu beeinflusst werden.

Zellwachstum unter Hypoxie

Die verstärkte Phosphorylierung von CREB unter Hypoxie kann sich in einer gesteigerten Migration und Invasion von Zellen manifestieren. Während die Inkubation der Zellen für 20 Std. unter hypoxischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Migrationsrate der Zellen hatte (Abb. 3.38A), nahm die Invasivität unter Hypoxie in den HER-2/neu⁺-Zellen, aber nicht in NIH3T3-Zellen auf etwa 60 % zu (Abb. 3.38B), was auf der Sekretion von MMP-2/9 beruht: Bei Inkubation unter Hypoxie wurde mehr MMP-2 bzw. MMP-9 in den Kulturüberstand im Vergleich zur Normoxie freigesetzt (Abb. 3.38C). Die shCREB-Zellen zeigten hierbei bei gleicher Inkubationszeit unter Hypoxie keine Zunahme der MMP-9-Aktivität, während die 72 kDa-Zymogenform der MMP-2 ähnlich stark der HER-2/neu⁺-Zellen war.

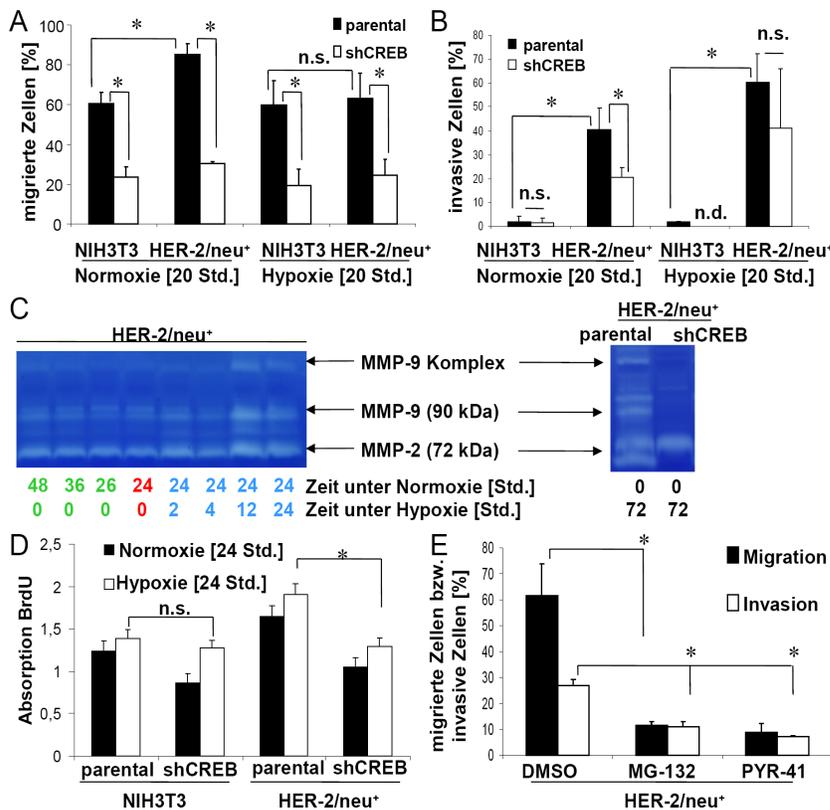


Abbildung 3.38: Gesteigerte Migration und Invasion unter Hypoxie. **A.** Die Migration von Zellen wurde unter Normoxie und Hypoxie miteinander verglichen. Die Daten entsprechen zwei biologischen Replikaten. **B.** Wie unter A wurde die Invasivität der Zellen bestimmt. n.d. = nicht detektiert. **C.** Die MMP-2 und -9 Aktivität in zellfreien Kulturüberständen wurde unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Zellen wurden für 24 Std. unter Normoxie gehalten (rot) und dann weiter unter Normoxie kultiviert (grün) oder unter Hypoxie gesetzt (blau). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Medium entnommen und auf einem Zymogramm untersucht. Rechts, Der Unterschied zwischen HER-2/neu⁺ und CREB-defizienten Zellen nach 72 Std. unter Hypoxie ist angegeben. **D.** Die Proliferation von NIH3T3, HER-2/neu⁺ und ihren CREB-defizienten Transformanten wurde durch den Einbau von BrdU bestimmt. (n = 3). **E.** Der Einfluss des Ubiquitin-Inhibitors PYR-41 und des Proteasom-Inhibitors MG-132 (jeweils 5 µM) auf Migration und Invasion wurde für 20 Std. untersucht (n = 2).

Um zu überprüfen, ob hypoxische Kulturbedingungen das Wachstum von Zellen affektierten, wurde die Proliferation anhand des Einbaus von BrdU quantifiziert. Die Experimente zeigten, dass Hypoxie die Proliferation in allen Zelllinien um ca. 5 bis 20 % steigerte und die größte Zunahme in den CREB-defizienten NIH3T3-Zellen gefunden wurde (Abb. 3.38D). Außerdem reduzierten die Inhibitoren MG-132 und PYR-41 (jeweils 10 µM für 24 Std. Inkubation) die Migration und Invasion deutlich (Abb. 3.38E).

3.5.2 Einfluss von ROS auf die CREB-Aktivität

Dysfunktionale Mitochondrien können in höherem Maße Radikale wie ROS produzieren, welche zu Schäden an der Zelle führen können und demgegenüber entgiftet werden müssen.

Es wurde zunächst getestet, inwieweit H_2O_2 als ROS die Aktivität von CREB regulieren kann. In einer Zeitkinetik konnte nachgewiesen werden, dass eine niedrige Konzentration an H_2O_2 ($10 \mu M$) die Phosphorylierung von CREB an Serin¹³³ innerhalb von vier Std. kontinuierlich steigerte, während die Phosphorylierung an Serin¹²¹ teilweise abnahm (Abb. 3.39A). Eine Zunahme der AKT-Phosphorylierung konnte nicht nachgewiesen werden und die ERK-Phosphorylierung blieb stabil auf hohem Niveau. Eine höhere Konzentration an H_2O_2 ($30 \mu M$) zeigte eine deutliche Zunahme sämtlicher Phosphorylierungen nach zwei bis vier Std. Behandlung, während die AKT-Phosphorylierung, aber nicht CREB-Ser¹³³ im Zeitraum zwischen 30 und 60 Min. gesteigert war. Bei noch höheren Konzentrationen an H_2O_2 ($50 \mu M$) waren die Phosphorylierungen stärker ausgeprägt, nach 15 Min. die Ser¹³³-Phosphorylierung jedoch schwächer als bei den anderen Konzentrationen. Damit konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 die Aktivität von CREB an Ser¹³³ positiv reguliert und dies vermutlich überwiegend durch die AKT-Phosphorylierung vermittelt wird.

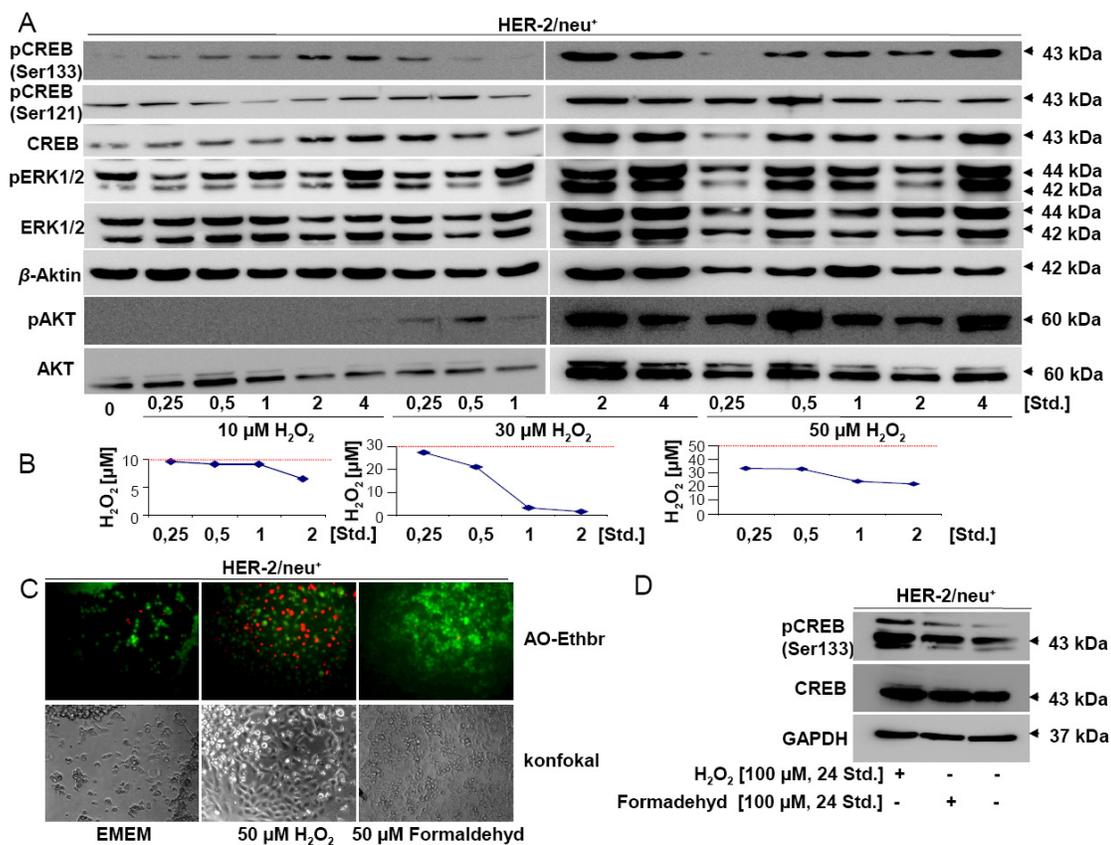


Abbildung 3.39: Induktion von CREB-Aktivität durch H_2O_2 und ROS. **A.** HER-2/neu⁺-Zellen wurden für die angegebene Zeit mit einer niedrigen ($10 \mu M$), mittleren ($30 \mu M$) oder hohen ($50 \mu M$) Konzentration an H_2O_2 inkubiert und die Phosphorylierung von CREB, ERK und AKT durch Immunfärbung bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **B.** Von den in A. inkubierten Zellen wurde die H_2O_2 -Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Die Startkonzentration wird jeweils durch die rote Linie dargestellt. **C.** Bestimmung der Apoptose durch Acridinorange-Ethidiumbromidfärbung (jeweils 4 Std. Inkubation mit den Inhibitoren). Vergrößerung: 20 x. **D.** Bestimmung der Phosphorylierung von CREB durch Langzeitbehandlung mit Formaldehyd und H_2O_2 . GAPDH diente als Ladekontrolle.

Da die Phosphorylierung von CREB bei den höheren Konzentrationen zeitweise verschwand, wird eine Entgiftungsreaktion des H_2O_2 angenommen. Aus diesem Grund wurde der H_2O_2 -Gehalt des Mediums bestimmt. Während bei der niedrigen $10 \mu M$ H_2O_2 -Konzentration diese über zwei Std. kaum abnimmt, so ist bei Inkubation mit $30 \mu M$ nach etwa 30 Min. eine Abnahme erkennbar, bei der $50 \mu M$ Konzentration schon innerhalb der ersten 15 Min. (Abb. 3.39B). Trotz der Entgiftungsreaktion zeigten die mit $50 \mu M$ H_2O_2 inkubierten Zellen nach 4 eine hohe Schädigung im Vergleich zu Formaldehyd (Abb. 3.39C). Dieses führte bei Langzeitinkubation zu einer leichten Zunahme der CREB-Phosphorylierung und hohe Konzentrationen an H_2O_2 erhöhten diese weiter (Abb. 3.39D).

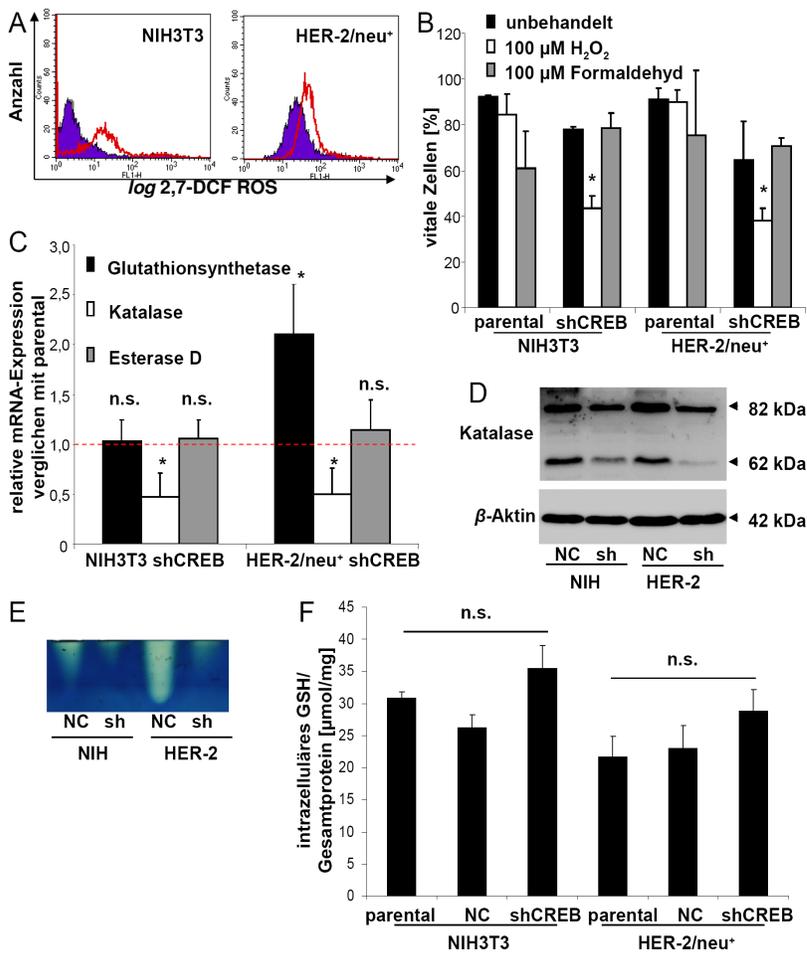


Abbildung 3.40: Initiation von Detoxifikationsmechanismen durch CREB.

A. Intrazelluläre ROS-Produktion konnte durch Färbung von Zellen mit dem Farbstoff 2,7-DCF und anschließender durchflusszytometrischer Messung bestimmt werden. Die rote Linie entspricht den CREB-defizienten shCREB Zelllinien und die violette Fläche den jeweiligen parental Zelllinien (NIH3T3 oder HER-2/neu⁺). 5.000 Zellen sind in dem Histogramm jeweils dargestellt. **B.** Die Vitalität der Zellen unter dem Einfluss von $100 \mu M$ H_2O_2 und $100 \mu M$ Formaldehyd für vier Std. wurde mittels Annexin V/Propidiumiodid-Färbung quantifiziert. Es sind drei Replikate gezeigt. **C.** Die mRNA-Expression der Glutathion-synthetase, Katalase und Esterase D ist für CREB-defiziente NIH3T3 und HER-2/neu⁺-Zelllinien dargestellt. Die jeweiligen parental Zelllinien sind auf „1“ normiert. **D.** Die Proteinexpression der Katalase wurde in den Zelllysaten mittels Western-Blot untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **E.** Mittels nativer Gelelektrophorese und anschließender Aktivitätsfärbung wurde die Katalase-Aktivität in Zelllysaten bestimmt. **F.** Die Konzentration von totalem GSH wurde im Zelllysate der angegebenen Zelllinien bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge bezogen. Die Daten entsprechen drei Replikaten.

Eine verringerte Detoxifikation konnte durch die Persistenz von ROS in den Zellen gezeigt werden. Die CREB-defizienten Zellen zeigten eine Anreicherung von ROS, die mittels 2,7-DCF-Färbung sichtbar gemacht wurde (Abb. 3.40A). Behandlung mit $100 \mu M$ H_2O_2 reduzierte die Vitalität der shCREB Zellen deutlich, nicht jedoch die Behandlung mit $100 \mu M$ Formaldehyd (Abb. 3.40B). Die Untersuchung von Genen, welche zur Entgiftung benötigt werden, zeigte die unterschiedliche

Reaktion auf die CREB-Stillegung: Während die Expression der für die Formaldehydentgiftung wichtigen Esterase D nicht verändert war, reduzierte der CREB-*Knock-down* die mRNA-Expression von Katalase um bis zu 55 % (Abb. 3.40C). Die verringerte Expression der Katalase-mRNA führte zu einer reduzierten Translation von Katalase (Abb. 3.40D) und auch einer verringerten Katalase-Aktivität in den shCREB-Zelllysaten (Abb. 3.40E).

Des Weiteren war die Expression der Glutathionsynthetase nach CREB-Stillegung erhöht, was zu einer gesteigerten intrazellulären GSH-Konzentration führte (Abb. 3.40F).

3.6 Untersuchungen des CREB regulierten Proteoms in murinen Onkogen-transformierten Fibroblasten

Proteomuntersuchungen sollten darstellen, welche Proteine durch CREB reguliert werden. Dazu wurden Proteinlysate von HER-2/neu⁺-Zellen und deren CREB-defiziente Zellen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, differentiell exprimierte Proteinspots detektiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Abb. 3.41 zeigt ein repräsentatives 2D-Gel.

Die Proteomanalysen zeigten, dass eine verringerte Expression von CREB die Expression verschiedener glykolytischer Enzyme supprimierte (alpha-Enolase, Pyruvatkinase M1/M2, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratkinase 1, Phosphoglyceratmutase 1) und Proteine, die für eine Stressreaktion stehen, hochreguliert wurden. Dies betrifft unter anderem Chaperone, wie Crystallin alpha, Proteasen, wie Prolylendopeptidase, oder Entgiftungsenzyme, wie Peroxiredoxin-4 (Abb. 3.41).

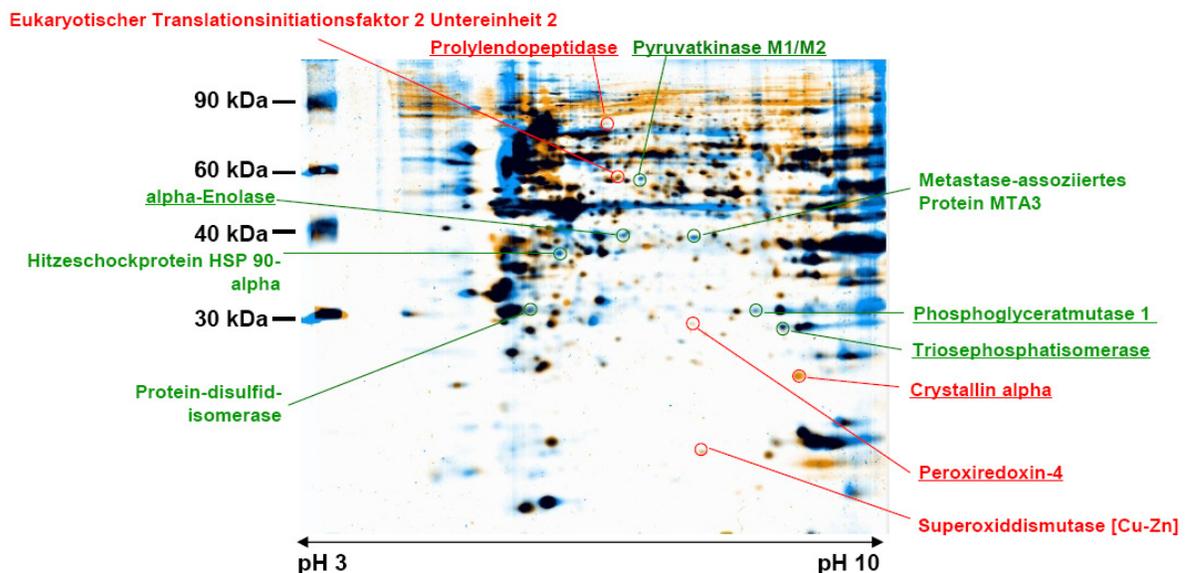


Abbildung 3.41: Repräsentatives 2D-Gel mit ausgewählten, differentiell exprimierten Proteinen nach CREB-*Knock-down*. Es ist eine Auswahl an Proteinen dargestellt, die in mindestens zwei unabhängigen Replikaten reguliert und in der Massenspektrometrie identifiziert wurden. Rot hinterlegte Proteine sind nach CREB-*Knock-down* hochreguliert und grün gekennzeichnete Proteine sind in ihrer Menge nach CREB-*Knock-down* verringert exprimiert. Unterstrichene Proteine konnten weiter mittels WB und/oder qPCR validiert werden. Die gelben Farben des Gels entsprechen dem Proteinmuster der CREB-defizienten Zellen, die blauen der HER-2/neu⁺-Zellen.

Eine Auflistung der mehrfach identifizierten und regulierten Proteine findet sich in Tab. 3.4. Von den 18 mehrfach identifizierten Proteinen, darunter auch mehrere Formen von alpha-Tubulin, sind die meisten Proteine im Zytoplasma lokalisiert (72 %), nur 22 % finden sich auch im Kern.

Tabelle 3.4: Mehrfach identifizierte, in CREB-defizienten Zellen regulierte Proteine. Für jedes Protein ist das erwartete und tatsächlich gefundene Molekulargewicht angegeben, ferner der isoelektrische Punkt. Proteine mit einem Ratio von 2,0 und größer werden nach CREB-*Knock-down* als hochreguliert, Proteine mit einem Ratio von 0,5 und kleiner werden nach CREB-*Knock-down* als runterreguliert bezeichnet. Seque. Cover gibt in Prozent an, wie viele Aminosäurefragmente vom Gesamtprotein identifiziert wurden. Ein *Score*-Wert von 57 oder höher gibt die ausreichende Güte der Identifizierung an. Angaben zur Funktion und zur Lokalisation wurden direkt aus der MASCOT-Datenbank entnommen.

Protein	Accession-Nr.	Molekulargewicht erwartet gefunden		Iso P	Ratio	Seque Cover	Score	Lokalisierung	Funktion
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9WVJ2	43,1	41	5,46	2,352	57	245	Nicht genannt	Proteinabbau
ATP-dependent RNA helicase DDX39A	Q8VDW0	49,5	60	5,46	4,46058	43	167	Zytoplasma und Kern	Spleißing
Alpha-crystallin B chain	P23927	20,0	23	6,76	23,2709	58	108	Zytoplasma, Kern	Stressinduziert, Chaperon, gegen Proteinaggregation
Alpha-enolase	P17182	47,5	40	6,37	0,28233	35	116	Zytoplasma, Zellmembran	Glykolyse, Wachstum, Hypoxieregulation
Heat shock protein HSP 90-alpha	P07901	85,1	86	4,93	0,14483	10	62	Zytoplasma, Melanosomen	Chaperon, Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle
Leukocyte elastase inhibitor A	Q9D154	42,7	40	5,85	7,57712	33	164	Zytoplasma	Reguliert Proteaseaktivität
Peroxiredoxin-4	O08807	31,2	28	6,67	2,70412	40	98	Zytoplasma, extrazellulär	Redoxregulation der Zelle, Regulation NF-kB Aktivität
Phosphoglycerate kinase 1	P09411	44,9	40	8,02	0,22773	38	116	Zytoplasma	Glykolyse, Kohlenhydratabbau, Blutgefäßbildung in Tumoren, Disulfidreduktase
Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	28,9	30	6,67	0,29785	31	101	Nicht genannt	Glykolyse
Prolyl endopeptidase	Q9Q4R6	81,6	75	5,44	2,14436	20	135	Zytoplasma	Serinprotease, Synthese / Abbau von Peptidhormonen
Protein disulfide-isomerase A6	P09103	48,5	42	5,00	0,46047	21	78	ER Lumen, Melanosomen	Disulfidbrückenbindungen, Chaperon
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P52480	58,3	58	7,18	0,1014	19	78	Zytoplasma, Kern	Glykolyse, Kohlenhydratabbau
Spliceosome RNA helicase Ddx39b	Q9Z1N5	49,4	50	5,44	2,22258	35	95	Kern	Spleißing
Triosephosphate isomerase	P17751	32,6	29	5,56	0,48336	33	92	Nicht genannt	Glykolyse, Glukoneogenese
Tubulin alpha-1A	P68369	50,7	40	4,94	0,20544	25	102	Zytoplasma,	Mikrotubuli
Tubulin alpha-1B	P05213	50,8		4,94		25	102	Zytoskelett	
Tubulin alpha-3 chain	P05214	50,6		4,97		20	74		
Vimentin	P20152	53,7	60	5,06	0,33691	29	73	Zytoplasma	Strukturprotein

Differentiell regulierte Proteine wurden mittels qPCR und Western-Blot validiert (Tab. 3.5, Abb. 3.42A). Im Falle der Citratsynthese, welche Teil des Citratzyklus darstellt, sowie der in der 2D-PAGE gefundenen Proteine Pyruvatkinase M1/M2 (PKM 1/2), Phosphoglyceratmutase 1 (PGM1), und Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) konnten die Ergebnisse der 2D-PAGE durch eine verringerte mRNA- und Proteinexpression bestätigt werden. Ebenso konnte eine gesteigerte mRNA-Expression der Prolylendopeptidase nachgewiesen werden. In Bezug auf Peroxiredoxin-4 konnten die Ergebnisse der 2D-PAGE auf Proteinebene nicht validiert werden. Ferner ist Triosephosphat-isomerase (TPI-1) sehr stark in den Zellen exprimiert und eine starke Verminderung der Expression wurde weder auf mRNA- noch auf Proteinebene detektiert. Für das bei Tumorzellen häufig überexprimierte PKM 1/2 konnte eine um 50 % geringere Aktivität in HER-2/neu⁺ shCREB-Zellen im Vergleich zu parentalen HER-2/neu⁺-Zellen gezeigt werden (Abb. 3.42B). Insgesamt waren bei

den CREB-regulierten und identifizierten Proteinen ca. 30 % glykolytische bzw. metabolische Enzyme gefunden worden (Abb. 3.42C,D,E).

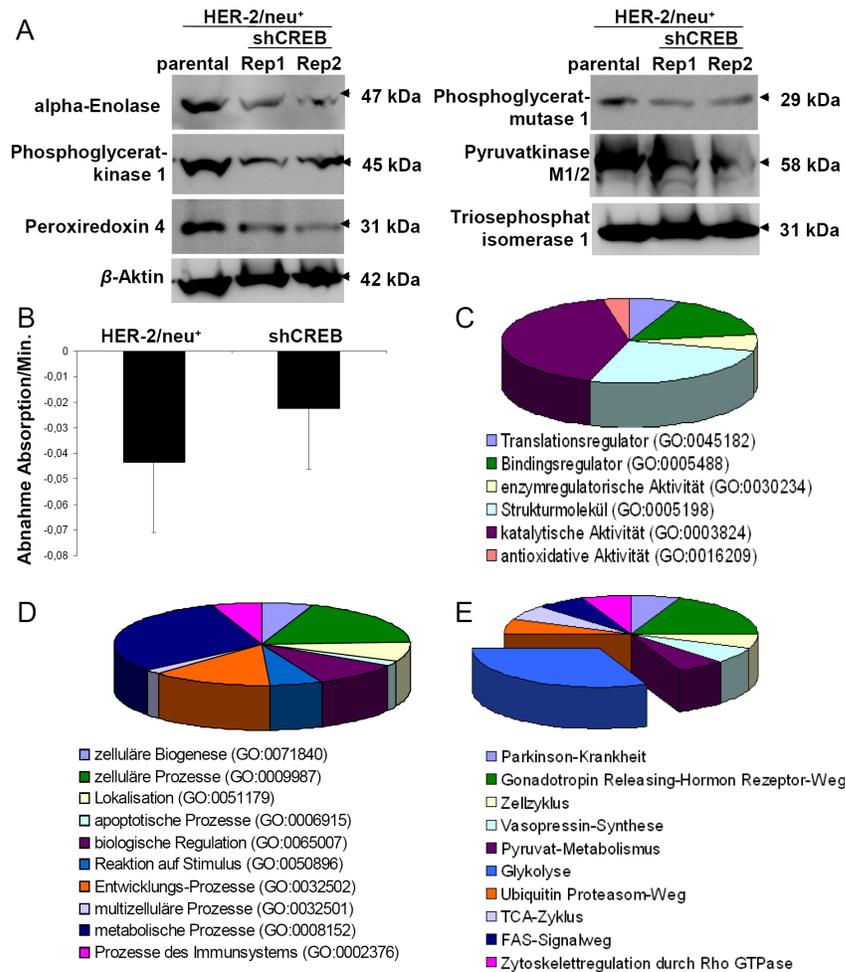


Tabelle 3.5: mRNA-Expression von differenziell exprimierten Proteinen nach CREB-Knock-down. A. Die mRNA-Expression der in Abb. 3.41 reguliert gefundenen Proteinspots wurde mittels qPCR untersucht. Die Daten zeigen zwei Replikate. Die mRNA-Expression der parentalen Zelllinie NIH3T3 wurde jeweils "1" gesetzt. Die Angaben der Signifikanz beziehen sich im Vergleich auf die NIH3T3-Zellen, bzw. im Falle der HER-2/neu⁺ shCREB auf die parentale HER-2/neu⁺.

mRNA	NIH3T3	NIH3T3 shCREB	HER-2/neu ⁺	HER-2/neu ⁺ shCREB
Citratsynthase	1	0,87 +/- 0,28	1,09 +/- 0,13	0,34 +/- 0,05 *
Cofilin 1	1	0,68 +/- 0,12 *	0,41 +/- 0,16 *	0,93 +/- 0,22 *
α -Crystallin B	1	0,61 +/- 0,17 *	0,45 +/- 0,12 *	0,2 +/- 0,04 *
Peroxiredoxin-4	1	1,23 +/- 0,42	0,81 +/- 0,17	1,76 +/- 0,18 *
PGM1	1	0,89 +/- 0,17	1,87 +/- 0,12 *	1,21 +/- 0,2 *
PGK1	1	0,68 +/- 0,18 *	1,76 +/- 0,45 *	0,78 +/- 0,02 *
Prolylendopeptidase	1	0,42 +/- 0,12 *	0,3 +/- 0,08 *	0,57 +/- 0,08 *
Pyruvatkinase M1/M2	1	0,62 +/- 0,05 *	1,68 +/- 0,14 *	0,12 +/- 0,03 *
TPI-1	1	0,7 +/- 0,12 *	4,97 +/- 1,11 *	4,82 +/- 1,23

3.7 Tumormetabolismus und CREB

CREB reguliert einige Enzyme der Glykolyse

Da viele Metabolismus-relevante Proteine durch CREB reguliert werden, wurde untersucht, welche Auswirkungen eine Reduktion der CREB-Expression auf den Metabolismus der Zellen hatte. Dazu wurde die extrazelluläre Ansäuerungsrate (EZAR), die Protonenabgabe, in HER-2/neu⁺ und HER-

2/neu⁺ shCREB unter Normoxie miteinander mittels extrazellulären Fluss-Analysator untersucht (Abb. 3.43A). In beiden Zelllinien konnte eine vergleichbare Rate gemessen werden, wobei die der CREB-defizienten Zellen leicht reduziert war. Deutlich verschieden war die glykolytische Kapazität der CREB-defizienten Zellen, welche nach Oligomycinzugabe der gesamten glykolytischen Funktion entspricht (Abb. 3.43B). Die intrazelluläre Laktatkonzentration war bei allen Zelllinien mit etwa 25 µg/ml vergleichbar, nach CREB-Knock-down jedoch signifikant reduziert (Abb. 3.43C). Interessanterweise war die intrazelluläre Aktivität der LDH in CREB-defizienten Zellen ebenfalls leicht, aber nicht signifikant reduziert (Abb. 3.43D). Die Stoffwechselzwischenprodukte Pyruvat und Citrat waren in shCREB-Zellen durchgängig um 50 bis 80 % reduziert, allerdings nur in den Onkogen-transformierten Zelllinien, bei den NIH3T3-Zellen waren die Konzentrationen nicht unterschiedlich (Abb. 3.43E,F).

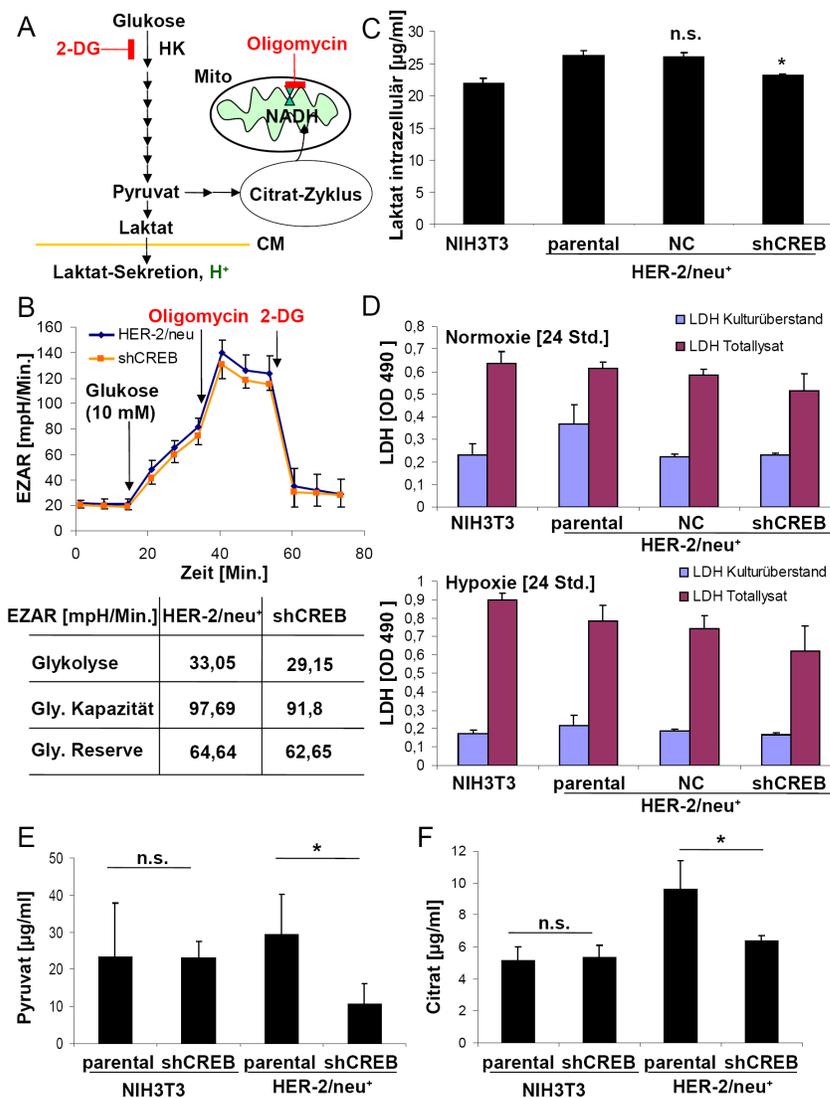


Abbildung 3.43: Beeinflussung des Zell-Metabolismus nach CREB-Knock-down. **A.** Die Protonenabgabe durch Laktatsekretion wurde zur Bestimmung der Glykolyse gemessen. Durch die automatisierte Zugabe von 10 µM Glukose wird die Glykolyse induziert, Oligomycin blockiert die ATP-Synthase und der Hexokinase (HK)-Inhibitor 2-Desoxyglukose (2-DG) stoppt die Glykolyse komplett. CM = Zytoplasmamembran, Mito = Mitochondrien. **B.** Oben, Durch Messung der EZAR konnte die glykolytische Aktivität der Zellen bestimmt werden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Glukose, Oligomycin oder 2-DG automatisch zugegeben. Die Daten entsprechen acht Replikaten. Unten, aus den Daten wurden die glykolytische Kapazität und die glykolytische Reserve bestimmt. **C.** Die intrazelluläre Laktatkonzentration in Zellen wurde bestimmt. (n = 3) **D.** Die LDH-Aktivität im Kulturüberstand und in dem Totallysat (intrazelluläre LDH-Aktivität) wurde bestimmt. Die Daten entsprechen drei Replikaten. **E.** Die intrazellulären Konzentrationen an Pyruvat wurden bestimmt. Die Daten entsprechen drei Replikaten. **F.** Die intrazellulären Konzentrationen an Citrat wurden bestimmt. (n = 3).

Serum- und Glukosespiegel verändern CREB-Phosphorylierung

Da der Stoffwechsel der Zellen beeinflusst war, wurde untersucht, wie die Zellen auf eine veränderte Nährstoffversorgung ansprechen. Daher wurden die Zellen zunächst in unterschiedlichen Serumkonzentrationen inkubiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass HER-2/neu⁺-Zellen sich sehr gut an die verringerte FKS-Konzentration anpassen können, da der Anteil der vitalen Zellen auch bei niedrigen Konzentrationen bis 0,1 % nicht unter 80 % fiel (Abb. 3.44A). Bei den CREB-defizienten Zellen fiel die Vitalität bei der niedrigsten Konzentration auf bis zu 30 % ab. Unter reduzierten Serumkonzentrationen nahm die CREB-Phosphorylierung nach 48 Std. stark ab, die CREB-Expression nur bei 1,25 % FKS (Abb. 3.44B).

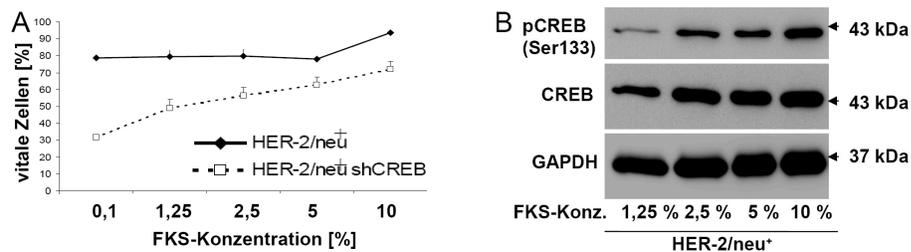


Abbildung 3.44: Verändertes Ansprechen von CREB-Knock-down Zellen auf Serumentzug. **A.** Bestimmung der Vitalität nach 48 Std. von HER-2/neu⁺ und HER-2/neu⁺ shCREB-Zellen unter unterschiedlichen FKS-Konzentrationen mittels AnnV/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung. Als vitale Zellen wurden die nicht gefärbten angesehen. Die Daten entsprechen drei unabhängigen Replikaten. **B.** Der Einfluss von unterschiedlichen FKS-Konzentrationen auf die CREB-Aktivität wurde an Zelllysaten bestimmt. Die Zellen wurden für 48 Std. nach der Aussaat in den Medien kultiviert und dann geerntet. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Auch bei Entzug von Glukose war die Vitalität der shCREB-Zellen niedriger, dies war jedoch nicht signifikant zur Normalkonzentration (Abb. 3.45A). Ferner führte eine reduzierte Glukoseversorgung zu einer verringerten CREB-Phosphorylierung an Ser¹³³ (Abb. 3.45B). Da sich bei der Untersuchung des Zellzyklus nach Serumentzug bei CREB-defizienten Zellen ein Zellzyklusarrest zeigte (s. Abb. 3.12), wurde untersucht, wie die Zellen Glukose aufnehmen können. Die Aufnahme des fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG zeigte sich unabhängig von der Sauerstoffversorgung bei Onkogen-transformierten Zellen nach CREB-Knock-down mit 75 % der Aufnahmerate von parentalen Zellen leicht vermindert (Abb. 3.45C), was auch auf die verringerte Expression des Glukosetransporters Glut-1 zurück gehen könnte (Abb. 3.45D). Diese Effekte waren dabei anscheinend Tumorzell-spezifisch: Nur in den Onkogen-transformierten Zellen konnte dabei eine um 75 % verminderte Expression nachgewiesen werden.

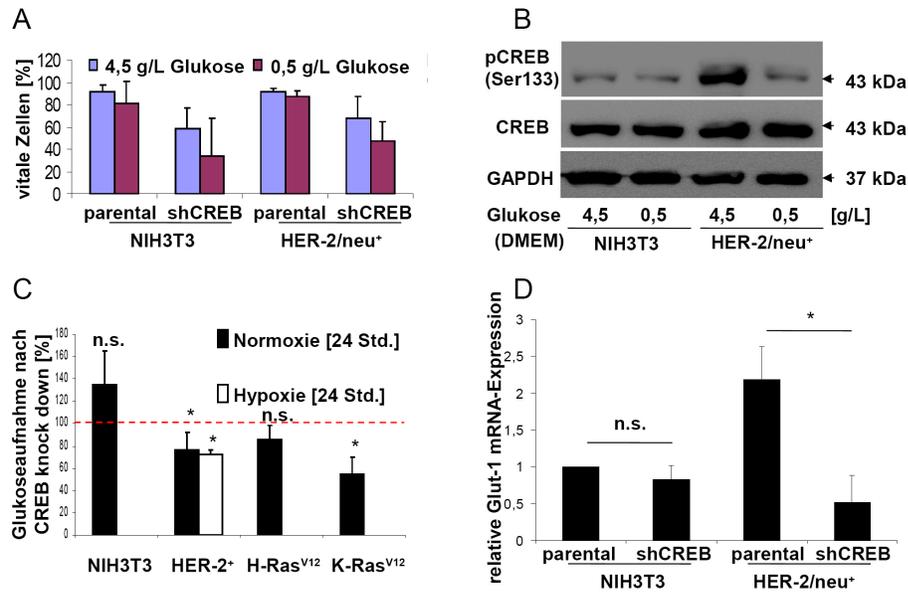


Abbildung 3.45: Verlangsamte Aufnahme von Glukose nach CREB-Knock-down. **A.** Die Vitalität von NIH3T3- und HER-2/neu-Zellen sowie der entsprechenden CREB-defizienten Zellen wurde unter 48 Std. Inkubation mit normalen Glukosekonzentrationen (4,5 g/L) und unter Glukosemangel (0,5 g/L) mittels AnnV/PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Vitale Zellen sind ungefährdet. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unterschiedlichen Replikaten dargestellt. Die Glukosekonzentration des Mediums wurde mittels DNSA-Methode kontrolliert. **B.** Die CREB-Phosphorylierung wurde unter den Bedingungen in A. bestimmt. GAPDH dient als Ladekontrolle. **C.** 2-NBDG wurde zu Zellen nach 24 Std. Normoxie oder Hypoxie gegeben und die Aufnahme an einem Fluoreszenzlesegerät gemessen. Es sind die Anteile der CREB-defizienten Zellen im Vergleich zu den parentalen Zellen, welche 100 % entsprechen (rot gestrichelte Linie), angegeben. Der Effekt von Hypoxie wurde nur bei den HER-2/neu⁺ und deren CREB-defizienten Zellen untersucht. **D.** Die Expression der Glut-1 mRNA wurde mittels qPCR unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt.

CREB-defiziente Zellen zeigten unter reduzierten FKS-Konzentrationen ein deutlich vermindertes Wachstum und gingen im Falle der NIH shCREB und den HER-2/neu shCREB bei Konzentrationen unter 5 % in die Apoptose (Abb. 3.46; HER-2/neu Daten nicht gezeigt). Bei den K-Ras^{V12} shCREB waren die Effekte wesentlich abgeschwächt.

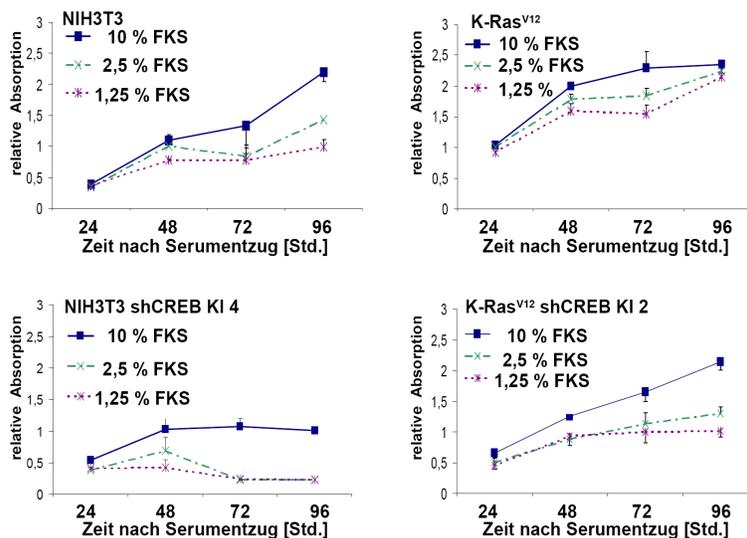


Abbildung 3.46: Wachstum von murinen Zelllinien in FKS-reduziertem Mangelmedium. Zelllinien wurden in Medien mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen inkubiert und nach 24, 48, 72 und 96 Std. die mitochondriale Aktivität mittels XTT-Test bestimmt. Die Daten repräsentieren drei Experimente mit jeweils drei Parallelen.

4. Diskussion

4.1 Expression und Aktivität von CREB in humanen und murinen Tumorzellen

Da CREB in vielen Tumorzellen, wie z.B. nichtkleinzelligen Lungenkrebs(NSCLC)-Zelllinien (Aggarwal et al., 2008) und Mammakarzinomzelllinien (Son et al., 2010), eine gesteigerte Aktivität aufweist, wird CREB als ein möglicher Regulator des neoplastischen Phänotyps beschrieben. Außerdem gilt CREB als ein Risikofaktor für das Auftreten von Komplikationen und ist mit einer schlechten Prognose und reduzierter Überlebensrate von Tumorpatienten assoziiert: So wurde von Melnikova et al. (2010) beispielsweise gezeigt, dass nicht-metastatische SB2 und DX3-Zelllinien eine geringere CREB-Aktivität aufweisen als die metastasierenden Zelllinien A375SM und C8161-c9. Bei AML-Patienten konnten Shankar und Koautoren (2005) belegen, dass die Prognose und das Überleben der Patienten mit der Phosphorylierung von CREB negativ assoziiert sind. Des Weiteren ist die Überexpression von CREB bei Nichtrauchern mit NSCLC zu einer schlechteren Prognose gekoppelt und wird daher als Therapieziel diskutiert (Seo et al., 2008). Die CREB-Expression ist in Glioblastomen erhöht, was mit dem Tumorgrad korreliert (Tan et al., 2012(a)). Allerdings fehlten bislang Studien, die eine Korrelation von Onkogenen mit der Aktivität von CREB beschrieben.

Da Brust- und Lungenkarzinomzellen häufig eine Überexpression von HER-2/neu und/oder eine K-Ras-Mutation aufweisen, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob diese beiden Onkogene die CREB-Expression und -Aktivität beeinflussen. Sowohl in murinen Modellsystemen mit HER-2/neu- bzw. K-Ras-vermittelter Transformation als auch in humanen Tumorzelllinien mit bekanntem HER-2/neu bzw. K-Ras-Status konnte die gesteigerte Expression / Aktivität von CREB nachgewiesen werden.

In Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg und dem CeSI in Chieti, Italien konnten die *in vitro*-Daten auch in Tumorerläsionen bestätigt werden: In Mammakarzinomerläsionen konnte eine direkte Korrelation zwischen der HER-2/neu-Expression und der Aktivität von CREB (pCREB Ser¹³³) nachgewiesen werden (Steven et al., 2013). In 12 von 19 HER-2/neu-positiven Mammakarzinomerläsionen korrelierte die HER-2/neu-Expression mit der von pCREB Ser¹³³, während die CREB-Expression nicht mit dem Überleben, der Tumorgröße und dem Tumorgrad korrelierte (Patientendaten s. Anhang VI.). Somlo und Koautoren (2012) diskutierten die Expression und Aktivität von CREB als Marker für Patienten mit metastasierendem Brustkrebs und Therapieresistenz. In Kolonkarzinomerläsionen konnte gezeigt werden, dass eine K-Ras^{V12}-Mutation die Phosphorylierung von CREB an Ser¹³³ erhöht, allerdings waren die vorliegenden Daten weniger aussagekräftig als bei den HER-2/neu-Patientenstudien, da für diese Untersuchungen insgesamt nur 23 Patienten zur Verfügung standen. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere CREB aktivierende Mutationen vorliegen (Steven et al., 2015). Die zugrunde liegenden Mechanismen der CREB-Überexpression in Tumoren sind bisher wenig aufgeklärt. Da nur in

wenigen Tumoren eine Amplifikation des CREB-Gens nachgewiesen wurde (Tan et al., 2012 (b)), sind strukturelle Alterationen im Wesentlichen nicht für die erhöhte Expression und Funktion von CREB in Tumoren verantwortlich. Folglich muss die CREB-Aktivität näher untersucht werden.

4.2 Einfluss von Signaltransduktions- und RTK-Inhibitoren auf die CREB-Aktivität

Signaltransduktion durch die vier Hauptwege

Die Aktivierung von CREB erfolgt u.a durch die Phosphorylierung an der Serinseitenkette 133, was durch mehrere Signaltransduktionswege initiiert werden kann (Johannessen et al., 2004). Allerdings zeigte sich der namensgebende cAMP-PKA-Weg in den Mausfibroblasten als wenig aktiv, da der PKA-Inhibitor H89 kaum Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB hatte. Delghandi und Koautoren (2005) konnten in NIH3T3-Fibroblasten eine gesteigerte Aktivität des cAMP-PKA-Weges unter Stimulation mit Forskolin nachweisen, was die CREB-Phosphorylierung erhöhte. Da dies unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen mit FKS nicht beobachtet werden konnte, lässt sich hierbei auf eine gewebespezifische Aktivierung durch PKA-Kinase mittels Neurotransmittern schließen (Montminy und Bilezikjian, 1987). Du und Montminy (1998) beschrieben eine Phosphorylierung von CREB durch die PKB/AKT, die in HER-2/neu-positiven Zellen durch die Verwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 bestätigt werden konnte (Abb. 4.1A). Ein Ansteuern von CREB durch den MEK-ERK-Weg wurde in der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 beschrieben (Buzzi et al., 2009). Inhibition mit dem MEK-Inhibitor PD98059 führte in K-Ras^{V12}-mutierten, aber nicht bei HER-2/neu-positiven Zellen zu einer verringerten CREB-Phosphorylierung (Abb. 4.1B). Dies kann auch an der schwachen Wirkung von PD98059 auf die MEK2 liegen, da die MEK1 stärker gehemmt wird (Berndt et al., 2013). Werden Inhibitoren verwendet, die die Aktivität beider MEK vergleichbar blockieren, wie Trametinib, so wird CREB generell stärker inaktiviert. Zusammenfassend führt die Überexpression von HER-2/neu zu einer vermehrten CREB-Aktivierung durch den PI3K-AKT-Weg, während die H/K-Ras^{V12}-Transformation CREB über den MEK-ERK-Weg und PI3K-AKT-Weg beeinflusst (Abb. 4.1A,B). In den NIH3T3-Zellen ist CREB nur schwach phosphoryliert, wenn die Zellen unter Standardbedingungen mit 10 % FKS kultiviert werden. Unter diesen Bedingungen zeigten die verwendeten Inhibitoren daher kaum Potential (Abb. 4.1C). Durch Stimulation mit Forskolin kann der cAMP/PKA-Weg jedoch aktiviert werden, was auch mit den p38-MSK1-Weg korreliert (Delghandi et al., 2005). Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation der PKA durch Dibutyryl-cAMP in den NIH3T3-Zellen nicht zu einer Aktivierung von CREB (Seternes et al., 1999). Diese Resultate weisen ebenfalls auf eine gewebespezifische Aktivierung von CREB hin.

Besonders effizient zeigte sich der PKC-Inhibitor Ro31-8220, der in den Onkogen-transformierten Zellen zu einem kompletten Verlust der CREB-Phosphorylierung führte. Dies kann jedoch auch auf

die inhibitorische Wirkung von Ro31-8220 auf die Rsk-2- und p70S6-Kinasen zurückzuführen sein (Alessi, 1996), welche als Kinasen direkt CREB phosphorylieren können (de Cesare et al., 1998). Ebenso hemmt H89 die Kinasen MSK1 und S6K1 (Lochner und Moolman, 2006), wodurch eine Beteiligung des cAMP-PKA-Weges bei Verwendung dieses Inhibitors nicht eindeutig festgestellt werden kann. Zyklische Nucleotide wie Rp-cAMPs stellen wirksame und mehr spezifische Alternativen als PKA-Inhibitoren dar.

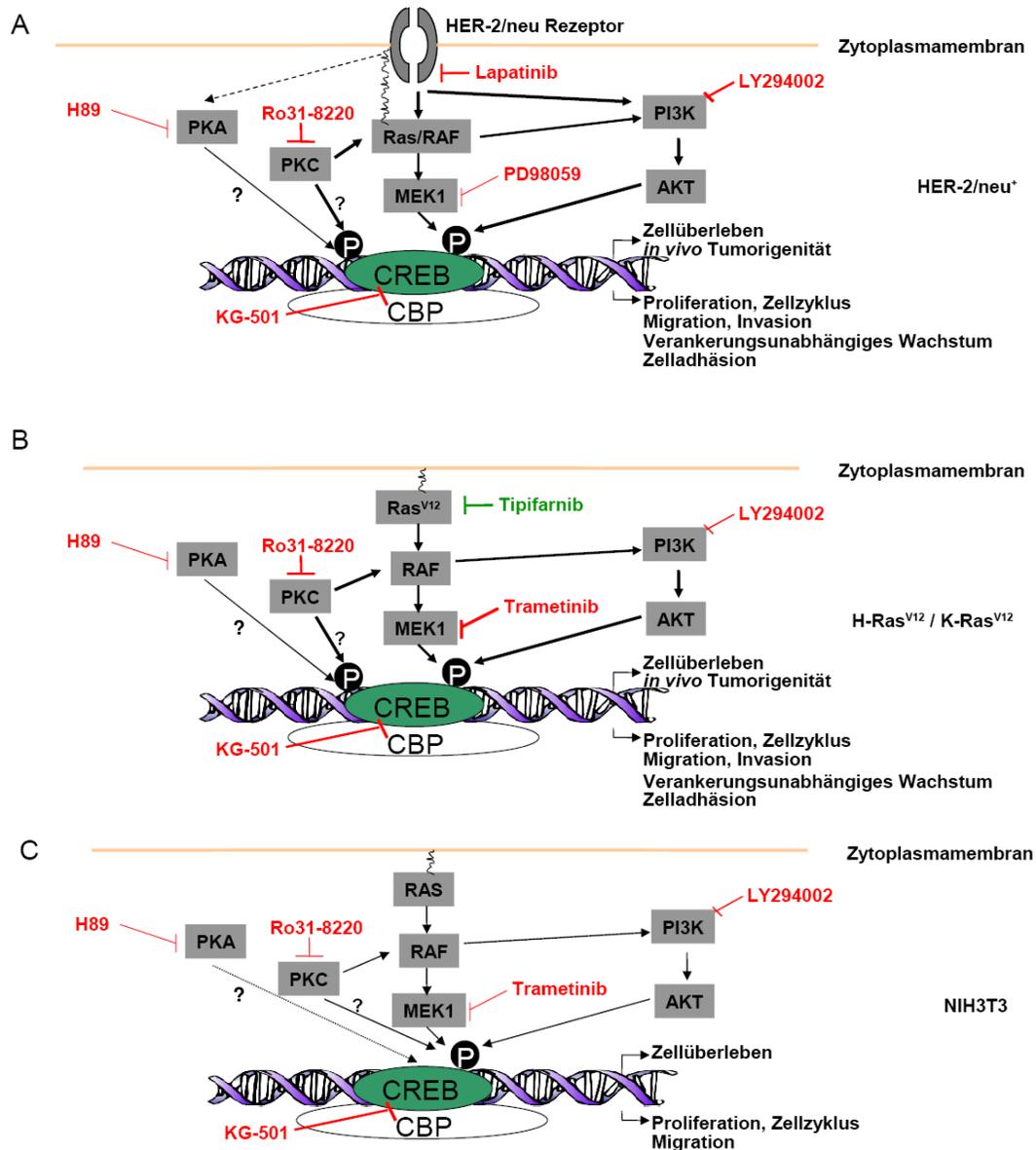


Abbildung 4.1: Unterschiedliche CREB-ansteuernde Signaltransduktionswege in Onkogen-transformierten Zelllinien. Für die Onkogen-transformierten HER-2/neu- (A.) und H-/K-Ras^{V12}-Zelllinien (B.) sowie die NIH3T3-Zelllinie (C.) sind die in dieser Arbeit ermittelten Signaltransduktionswege angegeben (NIH3T3 verändert nach Delghandi et al., 2005). Signaltransduktionsinhibitoren, die die CREB-Aktivität hemmen, sowie der Inhibitor KG-501 sind an ihrem Wirkungsort rot hinterlegt. Tipifarnib (grün) wirkt dabei langfristig nur bei H-Ras^{V12}. Die Stärke der Pfeile gibt die Intensität der Signaltransduktionswege bzw. der Inhibitorwirkung an. P kennzeichnet die Phosphorylierung an Ser¹³³, wobei die stärkere Phosphorylierung bei den Tumorzellen durch zwei P dargestellt ist. ? kennzeichnet Signaltransduktionswege, die wegen der zu unspezifischen Inhibitoren nicht eindeutig identifiziert werden konnten.

Targetieren der HER-2/neu-Aktivität durch RTK-Inhibitoren

Bei den HER-2/neu⁺-Zellen hatte der duale HER-2/EGF-R-Inhibitor Lapatinib auf die CREB-Phosphorylierung einen starken Einfluss. Wegen der dualen Wirkung des Inhibitors kann dessen Effekt auf die CREB-Phosphorylierung nicht komplett dem überexprimierten HER-2/neu zugerechnet werden, da die Heterodimerbildung mit den murinen Formen von EGF-R, HER-3 und HER-4 in dem murinen Modellsystem unklar ist. Lapatinib zeigte jedoch bei den Ras-Transformanten keinen Einfluss auf die CREB-Aktivität. HCT116-Kolonkarzinomzellen mit einer K-Ras^{G13D}-Mutation sind beispielsweise Lapatinib-resistent, was auf der Expression von pro- und anti-apoptischen Genen beruht (Martin et al., 2008). Ob dies auf die K-Ras-Mutation zurückzuführen ist, bleibt dabei offen.

Sorafenib und Sunitinib sind ebenfalls in der Lage, die CREB-Phosphorylierung zu minimieren. Beide Inhibitoren hemmen den VEGF-Rezeptor und Sorafenib zusätzlich die Raf-Kaskade. Ein Zusammenhang zwischen HER-2/neu-Überexpression und VEGF-Sekretion konnte in Brustkrebläsionen und Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt werden (Hsieh et al., 2003; Konecny et al., 2004), wodurch eine Verstärkung des CREB-Signals vermutet werden kann, da VEGF selbst CREB aktiviert (Mayo et al., 2001). Andererseits wird VEGF-A durch CREB reguliert (Rhee et al., 2015).

Interessanterweise kann der EGF-R auch im Zellkern nachgewiesen werden, wo er vermutlich TF direkt ansteuern kann (Brand et al., 2013). Ob in dieser Weise auch die Aktivität von CREB kontrolliert wird, ist nicht bekannt. Wenn dies der Fall sein würde, wären Signaltransduktionsinhibitoren für die Krebstherapie nur sehr eingeschränkt wirksam, da es so zu einer Therapieresistenz kommen könnte. Die Verwendung von Lapatinib oder die Berücksichtigung von CREB als Zielstruktur versprechen dann eine deutlich effizientere Therapie.

Prenylierungsinhibitoren bei Ras-Mutationen

K-Ras^{V12} und H-Ras^{V12} lassen sich durch Rezeptortyrosinkinasen kaum in ihrer Wirkung auf CREB hemmen. Durch posttranslationale Modifikationen werden die Ras-Proteine zur Signaltransduktion prozessiert (Morgan et al., 2003). Dabei wird zunächst durch eine Farnesyltransferase (FT) an dem Cystein der terminalen CAAX-Box eine Farnesylgruppe übertragen, die sich aus Farnesolpyrophosphat speist (Isoprenylierung) (Abb. 4.2). Dies ermöglicht eine Interaktion von Ras mit der ER-Membran, wo die weiteren Modifikationen durchgeführt werden: Durch eine Protease wird anschließend das AAX-Peptid abgespalten (Proteolyse) und das farnesylierte Cystein methyliert (Methylierung). H-Ras und K-Ras4A werden abschließend noch mit einer (K-Ras4A) oder zwei (H-Ras) Palmitingruppen beladen (Palmitoylierung). Dies ermöglicht die Bindung an die Zytoplasmamembran. K-Ras4B verfügt hingegen über sechs hintereinander folgende Lysine, die

ebenfalls die Membranverankerung ermöglichen. Allerdings ist eine Prenylierung des Cystein hierfür notwendig (Ahearn et al., 2012).

Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI), wie Tipifarnib oder Manumycin A, werden in der Klinik zur Behandlung der AML eingesetzt (Thomas und Elhamri, 2007). Bei der FTI-Behandlung von K-Ras-mutierten Zellen kommt es zu einer alternativen Isoprenylierung, bei der eine Geranylgeranyltransferase (GGT) einen Geranylgeranylrest auf das Cystein überträgt (Whyte et al., 1997). Dieses modifizierte Ras wird wie farnesyliertes Ras weiter prozessiert. Nach Inkubation mit Tipifarnib und weiteren FTI zeigten H-Ras^{V12}-Zellen einen kompletten und mindestens 96 Std. andauernden Verlust der CREB-Phosphorylierung, was auch mit einer stark gesteigerten Apoptose einherging (Steven, Manuskript in Vorbereitung). Eine Fraktionierung nach 48 Stunden Behandlung ergab hierbei einen vollständigen Verlust des Ras, was auf einen proteolytischen Abbau des nicht eingebauten Ras schließen lässt. Dadurch bricht die Signaltransduktion zusammen, die CREB-Phosphorylierung verschwindet und durch den Verlust der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL wird Apoptose verursacht. Von den getesteten FTI war Tipifarnib bei K-Ras^{V12}-Zellen hinsichtlich der Unterdrückung der CREB-Phosphorylierung am effizientesten. Diese Effekte waren bei höheren Konzentrationen an Tipifarnib denen in H-Ras^{V12} vergleichbar, allerdings war der Verlust der CREB-Aktivität nur etwa 24 Std. stabil. Bei längerer Inkubation mit Tipifarnib stellte sich die Phosphorylierung bei K-Ras^{V12}-Zellen wieder her und erreichte eine partiell stärkere Induktion als unbehandelte Zellen (Steven, Manuskript in Vorbereitung). Das überexprimierte K-Ras4B^{V12} geht auch hier eine veränderte Prenylierung mit GGT einher, was die Daten von Whyte et al. (1997) bestätigt.

Interessanterweise trat in K-Ras^{V12}-Zellen der Verlust der CREB-Phosphorylierung zeitgleich mit einer vermehrten zytoplasmatischen Translokation von Ras auf. Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar:

(i) Das zytoplasmatisch vorliegende Ras kann aufgrund der Hemmung der FT und der noch nicht vorhandenen GGT-Aktivität nicht ausreichend prenyliert werden und bildet im Zytoplasma mit Raf einen inaktiven Ras-Raf-Komplex aus, der die Signaltransduktion einschränkt. Am Beispiel eines mimetischen Peptides (FTI-277) konnten Lerner et al. (1995) zeigen, dass dieses Peptid bei K-Ras4B in hohen Konzentrationen (100-fach höher als bei H-Ras) zu einem Verlust der Prenylierung und einer zytosolischen Anreicherung von Ras in Form des Ras-Raf-Komplexes führt.

(ii) Es treten Verzögerungen in der posttranslationalen Modifikation des Ras auf. Das überexprimierte K-Ras^{V12} kann dabei nur partiell durch die GGT prenyliert werden, wodurch die weitergehenden Schritte der posttranslationalen Modifikation verlangsamt ablaufen. H-Ras und K-Ras4B unterscheiden sich dabei in der Submembranlokalisierung (Choy et al., 1999) und in dem Transport zur Plasmamembran, bei dem H-Ras über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche

4.3 Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in der onkogenen Transformation muriner Zellen

Kennzeichen und Eigenschaften von Tumorzellen

In grundlegenden Arbeiten wurden von Hanahan und Weinberg die Kennzeichen von Tumorzellen definiert (*Hallmarks of Cancer*, Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011). Dabei sind Tumorzellen in der Lage (i) proliferationsfördernde Signale von sich aus aufzubauen, d.h. unabhängig von äußeren Signalen zu wachsen; (ii) wachstumshemmende Signale und damit einen Proliferationsstopp zu umgehen; (iii) Invasivität aufzubauen, was das Metastasierungspotential erhöht; (iv) unbegrenzte Replikation durchzuführen, in der Zellkultur durch die Umgehung der Hayflickgrenze gekennzeichnet; (v) kontinuierlich die Blutgefäßneubildung (Angiogenese) zu fördern; (vi) Resistenzen gegenüber dem Zelltod aufzubauen; (vii) den zellulären Metabolismus umzustellen (Warburg-Effekt); (viii) der Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen; (ix) genetische Mutationen durch veränderte DNA-Reparaturmechanismen auszuprägen und (x) tumorfördernde Entzündungen im Gewebe zu verursachen (Abb. 4.3).

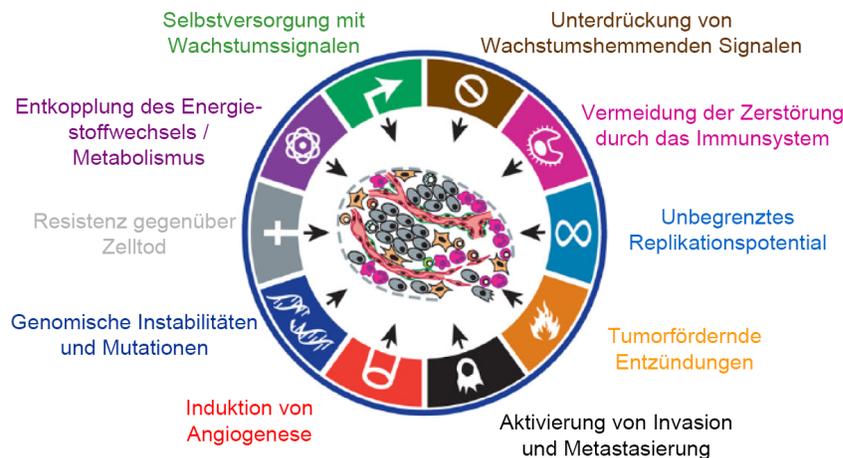


Abbildung 4.3: Übersicht über die Onkogen-regulierten Merkmale von Tumorzellen am Beispiel der *Hallmarks of Cancer*. Die Eigenschaften sind in zehn Kategorien unterteilt, wobei nicht alle Kategorien in den Tumorzellen ausgeprägt sein müssen (Quelle: verändert nach Hanahan und Weinberg, 2011).

Möglichkeiten und Schwierigkeiten der Hemmung der CREB-Expression und Aktivität

Zur Untersuchung der CREB-Funktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine shRNA-vermittelte Stilllegung der CREB-Proteinexpression in den murinen Fibroblasten etabliert. Die Systeme zeigten dabei eine spezifische Herunterregulation von CREB, ohne die Expression der verwandten Transkriptionsfaktoren ATF-1 und CREM signifikant zu ändern. Weiterhin sind die Funktionen der Onkogene nicht eingeschränkt. Allerdings sind bei Verwendung von shRNA-Konstrukten Sekundäreffekte durch den Einbau des Plasmids möglich. Daher wurde die CREB-Expression in CREB-defizienten Zellen durch Überexpression einer durch shRNA gegen CREB nicht targetierbaren Form rekonstituiert (shCREB-del2-Rescue-Konstrukt). Die hiermit gewonnenen Daten finden sich im Anhang (IV.). In der Literatur werden neben shRNA-Konstrukten (Dobroff et al., 2009) auch

dominant negative Formen von CREB zur Blockierung der CREB-Expression/-Aktivität verwendet. Ahn und Mitarbeiter entwickelten ein A-CREB genanntes Konstrukt, bei dem der basische Leucin-Zipper durch eine saure, amphipatische Sequenz ersetzt wurde (Ahn et al., 1998). Dieses Konstrukt ahmt die Ladung der CRE-Sequenz nach und kann mit CREB einen heterodimeren Komplex bilden. Dadurch wird die CREB-Bindung an die CRE-Sequenzen verringert. Eine weitere Möglichkeit dominant negativer Formen ist die Überexpression mutierter CREB-Proteine, bei denen eine Aminosäure der KID ausgetauscht ist. In den meisten Fällen wird Ser¹³³ zu Ala¹³³ mutiert, so dass CREB nicht mehr an dieser Position phosphoryliert werden kann (Amorio et al., 2003). Dieses Prinzip kann auch bei anderen Serinseitenketten verwendet werden (Barton et al., 1996). Ebenfalls wurden Mutationen in der DNA-Bindedomäne eingeführt (Amorio et al., 2003). Transient kann die CREB-Expression durch siRNA supprimiert werden (Kim et al., 2008 (b); Satpathy et al., 2009), wobei langfristige Beobachtungen > 96 Std. nach Transfektion nicht möglich sind. Das auf dem CRISPR/Cas-9 beruhende neuartige Genom-Editing-Verfahren (Jinek et al., 2012) wurde bisher für die Hemmung von CREB nicht eingesetzt. *In vivo* sind CREB-*Knock-out* Mäuse letal und weisen pränatal Entwicklungsdefizite auf (Bleckmann et al., 2002; Lonze et al., 2002).

Signaltransduktionsinhibitoren sind für die funktionellen Untersuchungen wenig hilfreich, da sie die CREB-Phosphorylierung nicht spezifisch blockieren und ihre langfristige Applikation Nebenwirkungen besitzt. Eine Ausnahme dabei ist der CREB-CBP-Inhibitor KG-501.

Effekte von CREB auf die Proliferation

CREB wird in der Literatur als proliferationsfördernd beschrieben, da es unabhängig von dem onkogenen Status das Zellwachstum fördert (Misra et al., 2002; Fujiwara et al., 2014 als Beispiele für NIH3T3-Zellen, Aggarwal et al., 2008; Guan et al., 2015 für Tumorzelllinien). In murinen Fibroblasten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Proliferationsverlust bei NIH3T3-Zellen teilweise höher ist als bei den Onkogen-transformierten Zellen. Es wird angenommen, dass durch die Onkogen-vermittelte neoplastische Transformation alternative Faktoren angesprochen werden, die in den NIH3T3-Zellen nicht aktiviert werden können. In Glioblastomzellen wird CREB z.B. durch ERK und PI3K aktiviert, wobei es die Expression der Cycline B1 und D1 reguliert (Daniel et al., 2014). In Rattenfibroblasten wird die CREB-abhängige Regulation von Cyclin D1 durch MSK1 vermittelt und kann damit durch H89 gehemmt werden (Kwon et al., 2009). Ein Verlust der Cycline B1 und D1 wurde auch in den murinen Fibroblasten nach CREB-Stilllegung gefunden. Humane Tumorzelllinien zeigten zusätzlich eine Regulation von Cyclin A1 durch CREB, wobei die Inhibition mit H89 einen Arrest in der G₀/G₁-Zellzyklusphase der Zellen induzierte (Desdouets et al., 1995). Cyclin A1, das in den murinen Fibroblasten kaum exprimiert ist, ist bei somatischen Zellen für den Übergang G₁/S verantwortlich (Ji et al., 2005). Der *Knock-down* von CREB führte auch in murinen Fibroblasten zu einem Zellzyklus-Arrest in der G₀/G₁-Phase, was mit

der Bedeutung von CREB für die Zellzyklusprogression übereinstimmt (Dworet und Meinkoth, 2006). Interessanterweise ist CREB in der G₁/S auch am stärksten aktiviert (Saeki et al., 1999).

Einfluss von CREB auf das Überleben von Zellen

CREB induziert die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 und kann sowohl der Trichostatin-induzierten Apoptose entgegensteuern (Wang et al., 2010), als auch die Wirkung von TNF- α auf die Zellvitalität hemmen (Barlow et al., 2008). CREB-induziertes Bcl-2 verringert dabei die Wirkung des pro-apoptotischen Bax, indem es die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und somit die Aktivierung von Caspase-3 inhibiert (Malla et al., 2010). Dabei führt ein kurzfristiger Verlust der Bcl-2-Expression noch nicht zu einer Aktivierung von Caspase-3 (Kim et al., 2008 (b)). CREB selber kann dabei ebenfalls durch aktivierte Caspase-3 abgebaut werden (François et al., 2000), was einen weiteren Schritt der Apoptoseaktivierung darstellen kann. Unabhängig von Onkogenen ist der Verlust der CREB-Aktivität und Expression in Mausfibroblasten mit einer gesteigerten Apoptose verknüpft. Diese äußert sich in dem Verlust der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL und einer stärkeren Ausprägung von Bax. Durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wird die Freisetzung von Cytochrom c gefördert, was die Effektor-Caspase-3 aktiviert. Die Apoptose war in den NIH3T3-Zellen deutlich ausgeprägter, da hier die Caspase-3-Aktivierung verstärkt auftrat.

Regulation der Wundheilung, Migration, Invasion und Aufbau der ECM durch CREB

Das CREB-regulierte Protein Bcl-2 wirkt nicht nur anti-apoptotisch, sondern kann auch die Migration von Zellen fördern und somit das Wundheilungspotential beeinflussen (Grutzmacher et al., 2010). Dieses Potential war jedoch vermehrt von der Morphologie der Zellen abhängig: Die als Monolayer wachsenden NIH3T3-Zellen sowie die flächig wachsenden K-Ras^{V12} schlossen Wunden wesentlich schneller als Foci-bildende HER-2/neu und H-Ras^{V12}-Zellen. CREB-*Knock-down* führte in allen Zelllinien zu einem Einbruch der Wundheilung. Dabei ist bei verwundeten Fibroblasten eine Aktivierung von CREB zu beobachten, was mit der Membranreparatur gekoppelt ist (Togo et al., 2003). Die Beweglichkeit von Mausfibroblasten durch eine engporige Membran wird, wie in dieser Arbeit beschrieben, nach CREB-Verlust stark eingeschränkt, was die Literaturdaten bestätigt (Nakayama, 2013; Ono et al., 2004; Park et al., 2010).

CREB vermittelt die Invasion durch MMPs, wie MMP-1, MMP-2 und MMP-9. Diese ermöglichen invasives Verhalten der Zellen durch extrazelluläre Matrices, was die Metastasierung begünstigt. Das invasive Verhalten geht nach CREB-Stillegung durch die verminderte Sekretion von MMP-2 und MMP-9 weitestgehend verloren. Überexpression einer dominant negativen Form von CREB reduzierte die Invasivität in Gehirnetastasenzellen um das 4,5-fache (Aucoin et al., 2004), während die Onkogene H-Ras und K-Ras durch erhöhte Expression von MMP-2 und -9 die

Invasivität verstärkten (Liau et al., 2003; Moon et al., 2000). Hierbei soll auch Bcl-2 die Invasivität durch Induktion von MMP-2 und -9 erhöhen (Choi et al., 2005; Zuo et al., 2010). Neben den beiden Gelatinasen MMP-2 und -9 reguliert CREB auch die Kollagenase MMP-13 positiv, welche eine Rolle bei der Ausbildung von Arthritis spielt (Bui et al., 2012).

Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und kann die Migration von Zellen fördern (Karvinen et al., 2003). Die Synthese von Hyaluronsäure wird durch Hyaluronsäure-Synthasen (HAS) wie HAS1 oder HAS2 ermöglicht (Schiller et al., 2010). Humanes HAS2 erleichtert das Tumorwachstum, während HAS1 die Durchblutung fördert (Jacobsen et al., 2002). Der Promotor von HAS2 besitzt eine CRE-Bindestelle und wird daher, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch CREB reguliert, was ebenfalls in humanen Keratinozyten und humanen embryonalen Nierenzellen nachgewiesen wurde (Makkonen et al., 2009). Ein Verlust der HAS2-Aktivität reduziert die Malignität von Brustkrebszelllinien (Li et al., 2007), was mit einer verringerten Hyaluronsäurebildung einhergeht. Interessanterweise spielt die Hyaluronsäure eine Bedeutung in der Tumorforschung: Der Nacktmull (*Heterocephalus glaber*) zeigt eine für Nagetiere hohe Lebenserwartung von über 20 Jahren und eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Krebserkrankungen (Liang et al., 2010). Durch eine spezielle Form der HAS2 können diese Tiere eine hochmolekulare Variante der Hyaluronsäure bilden, die etwa der fünf-fachen Größe der humanen Form entspricht (Tian et al., 2013). Hyaluronsäure interagiert dabei auch mit CD44 und könnte so die Erkennung der Tumorzellen durch Immunzellen erleichtern (Keane et al., 2014).

CREB potenziert verankerungsunabhängiges Wachstum und Adhäsion

Während MMPs die Invasivität der Zellen erleichtern und somit das Eindringen von Tumorzellen in Blutgefäße ermöglichen, müssen Tumorzellen für die Metastasierung im Blutstrom überleben und wieder anheften können. Da somatische Zellen in der Regel nicht verankerungsunabhängig wachsen können, müssen die Onkogene die Tumorzellen dazu befähigen. NIH3T3-Zellen zeigten kein Wachstum in Weichagar. Überexpression von HER-2/neu oder mutiertem Ras ist mit der Bildung von Weichagarkolonien gekoppelt. Dieser Effekt wurde durch CREB-Stillegung revertiert. Durch die Hemmung der CREB-CBP-Interaktion mit einem KG-501-Analogen konnte ebenfalls das Weichagarwachstum reduziert werden (Lee et al., 2015). Auch bei Knochenmarkzellen ging der Verlust der CREB-Aktivität mit verringerten verankerungsunabhängigen Wachstum einher (Pigazzi et al., 2009).

Zellen, die nicht verankerungsunabhängig wachsen können, gehen unter diesen Bedingungen in den Prozess der Anoikis, einem programmierten Zelltod, über. Phosphoryliertes CREB kann dabei anti-Anoikis-Faktoren, wie PTK6, regulieren (Jin et al., 2013). Onkogen-transformierte Zellen zeigen gegenüber Fibronectin-beschichteten Platten eine beschleunigte Adhäsionsfähigkeit, die bei CREB-Stillegung verloren geht. Dabei ist einerseits eine Beteiligung von H-Ras-Mutationen beschrieben

(Chambers et al., 1993), andererseits sollen zytosolische H-Ras- und K-Ras-Formen ebenfalls die Adhäsion fördern (Fiordalisi et al., 2001). Für die Zell-Zell-Interaktion sind Cadherine und Zell-Adhäsionsmoleküle verantwortlich (Elangbam et al., 1997). In murinen Fibroblasten konnte für ersteres nur die Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden, dessen Oberflächenexpression bei CREB-defizienten Zellen leicht reduziert war. Für ICAM1 ist die Regulation durch CREB beschrieben worden (Hadad et al., 2011). Andere Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM3 und NCAM sollen durch den AKT-Signalweg CREB aktivieren (Park et al., 2010).

Modulation der Immunantwort durch CREB

Bei Immunzellen hat CREB verschiedenste Funktionen (Wen et al., 2010): In Makrophagen kann es das Überleben durch anti-apoptotische Signalwege ändern (Park et al., 2005). CREB vermittelt häufig anti-inflammatorische Immunantworten, wie z.B. die Sekretion von IL-10 (Saraiva und O'Garra, 2010). Mäuse, die eine dominant-negative Form von CREB exprimieren, haben eine defekte IL-2-Produktion und eine verminderte T-Zell-Proliferation (Barton et al., 1996).

In vivo und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass eine inverse Korrelation zwischen der Expression von HER-2/neu und MHC Klasse I auf der Zelloberfläche besteht (Herrmann et al., 2004; Maruyama et al., 2010). Die Oberflächenpräsentation hängt dabei von der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) ab. In den Promotoren verschiedener APM-Komponenten, wie u.a. TAP1, TAP2, Tapasin und LMP7, findet man CRE-Bindungsstellen (Arons et al., 2001), so dass eine Kontrolle der Expression dieser Moleküle durch CREB postuliert wird. Während HER-2/neu die Expression der APM-Komponenten inhibiert, konnte bei CREB-Stillegung eine leicht erhöhte Expression von TAP1 und TAP2 sowie eine deutliche Steigerung der Tapasin mRNA-Menge beschrieben werden. Tapasin spielt bei der Qualitätskontrolle der präsentierten Antigene und MHC-Moleküle eine wichtige Rolle (Park und Ahn, 2003) und könnte durch CREB reguliert werden.

HLA-G besitzt drei CRE-Bindestellen, an die CREB und ATF-1 binden können, wobei ATF-1 einen CREB-Verlust nicht komplett kompensieren kann (Gobin et al., 2002). Die Expression von H-2D^d kann durch ATF-1 und CREB reguliert werden (Ishiguro et al., 1997; Ishiguro et al., 1998). Ishizu und Mitarbeiter (2000) beschrieben das H2-BF1-Motiv, welches Sequenzähnlichkeiten zum CRE-Element besitzt und an das CREB und ATF-1 binden können. Wird deren Bindung durch einen dominant-negativen Repressor gehemmt, erhöht sich die MHC-Klasse I-Expression auf diesen Zellen. Saji et al. (1997) beschreiben CRE ebenfalls als MHC-Klasse I-Silencer. Ob dies generell für alle CRE-Sequenzen gilt, müssen zukünftige Studien zeigen. Die MHC-Oberflächenpräsentation war in den HER-2/neu⁺ CREB-defizienten Zellen im Vergleich zu den HER-2/neu-positiven Zellen leicht erhöht, erreichte jedoch nicht das Niveau der NIH3T3-Zellen. Diese Effekte könnten Stress-korreliert oder vom Zellzyklus abhängig sein (Bukur, persönliche Mitteilung). Auch

sind Puromycin-sensitive Aminopeptidasen bekannt, die die MHC-Klasse I-Präsentation modulieren (Towne et al., 2008). Da Puromycin für die Selektion der NC und shCREB-Zellen verwendet und bei Stammhaltung zugefügt wurde, aber vor den Versuchen abgesetzt wurde, ist nicht bekannt, ob Spätfolgen der Puromycin-Behandlung diese Effekte verursachen können.

Die Komponenten der APM sind dabei als kritische Mediatoren der MHC-Klasse I-Oberflächenpräsentation zu sehen: Besonders Tapasin wird dabei eine bedeutende Rolle zugeordnet (Thuring et al., 2015), das die Beladung des gereiften HLA-I-beta-2-Mikroglobulin steuert (Abb. 4.4).

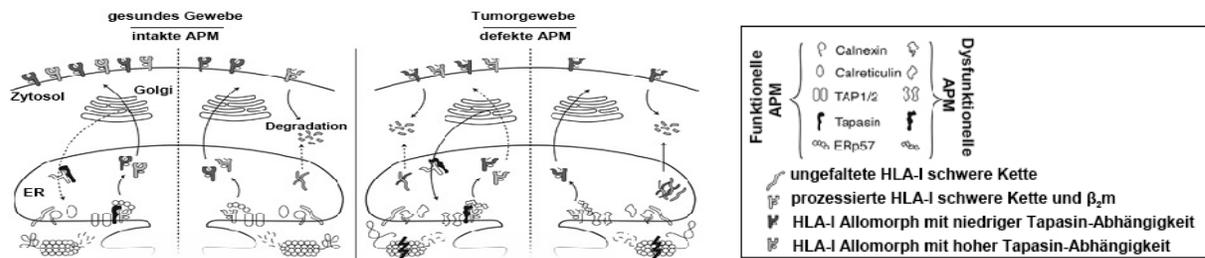


Abbildung 4.4: Beeinflussung von Qualität und Quantität der MHC-Klasse I-Präsentation durch Komponenten der APM. Dargestellt sind die Verhältnisse unter Tapasin-Expression und Tapasinmangel jeweils in gesundem und Tumorgewebe. In Tumorgewebe können dysfunktionalen APM auftreten, die die Qualität der MHC-Klasse I-Peptide beeinträchtigen. Tapasinmangel reduziert die MHC-Klasse I-Präsentation auf der Zelloberfläche merklich (Quelle: verändert nach Thuring et al., 2015).

4.4 Bedeutung von CREB und CREB-Aktivität in *in vivo*-Experimenten

Tumor-fördernde Wirkung von CREB

Zellen mit einer reduzierten CREB-Expression und -Aktivität besaßen eine deutlich verringerte *in vivo* Tumorigenität. Tumore in Tieren, die durch CREB-defizienten Zellen erzeugt wurden, waren durch verringerte Angiogenese deutlich nekrotischer und hypoxischer. Eine verringerte Blutgefäßdichte mit daraus resultierendem reduziertem Tumorwachstum konnte *in vivo* durch eine Punktmutation der Serin¹³³-Seitenkette in einer HCC-Zelllinie erreicht werden (Abramovitch et al., 2004). Hierbei war auch die Proliferation des Gewebes (bestimmt durch die Anzahl der mitotischen Zellen) reduziert, wobei jedoch keine Apoptose auftrat. Dies wurde durch das kleine Tumolvolumen erklärt, bei dem Hypoxie keine starken Auswirkungen zeigte. Tumore aus DBA-1-Mäusen, die durch Injektion mit shCREB-Zellen gewonnen wurden, waren hingegen deutlich apoptotischer/nekrotischer.

In keiner Maus mit Tumor konnten Metastasen in den untersuchten Organen (Lunge, Leber, Niere) nachweisen werden. Hingegen konnte ein *Knock-down* von CREB in Melanomzelllinien die Metastasierung und die *in vivo* Tumorigenität signifikant verringern (Dobroff et al., 2009). Eine verringerte Metastasierung konnte auch durch Jean und Bar-Eli (2000) und Xie et al. (1997) in Melanomzelllinien mit dominant negativen CREB nachgewiesen werden. Ob dies mit einer veränderten Immunantwort gekoppelt ist, kann nicht sicher beantwortet werden, denn die Experimente mit den humanen Zellen wurden in immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt.

Induktion von Nekrose nach CREB-Stillegung in Tumoren

In einem Maussystem konnte an Tumorgewebeschnitten nachgewiesen werden, dass die Aktivität von CREB die Proliferation und die Durchblutung fördert, was durch immunhistochemische Analysen der Expression von Ki-67, VEGF und CD31 gezeigt wurde (Nomura et al., 2006). Dies geht mit den erhaltenen Resultaten in HER-2/neu-positiven murinen Tumoren einher. Daraus ergeben sich Fragestellungen hinsichtlich der Angiogenese im Gewebe. Zu diesem Zweck wurde in *in vivo* Experimenten durch den Matrigel-Plug-Test die Vaskularisierung des polymeren Matrigels untersucht. Hierbei zeigten CREB-defiziente Zellen eine messbar geringere Menge an Hämoglobin, welche mikroskopisch auch weniger Blutgefäße aufwiesen. Daher wird eine Stimulation der Angiogenese durch CREB vermutet. Wurde die CREB-Aktivität durch Mutation von Ser¹³³ herabgesetzt, so war die Angiogenese in BALB/c-Mäusen ebenfalls deutlich reduziert (Abramovitch et al., 2004). CREB kann dabei die Synthese der VEGF-Rezeptoren steuern (Morishita et al., 1995). VEGF selber kann CREB durch den p38 und PKC-Weg aktivieren (Mayo et al., 2001). Die CREB-vermittelte Angiogenese kann dabei durch das pflanzliche Polyphenol Curculigosid A oder auch durch Thrombin stimuliert werden (Chava et al., 2010; Kang et al., 2014). Im Promotor des VEGF finden sich drei CRE-Elemente (Jeon et al., 2007), was dessen Regulation durch CREB erklären könnte.

4.5 Einfluss des Tumormikromilieus auf die CREB-Aktivität

Hypoxie - ein wichtiger Marker für die Prognose von Tumoren

Neben der Aktivierung verschiedener Signalwege durch Onkogene, wie z.B. HER-2/neu, spielen auch soluble und physikalische Faktoren, zu denen u.a. Hypoxie oder Azidose zählen, bei der Initiation und Progression von Tumoren eine wichtige Rolle (Gatza et al., 2011). In der Tat zeigen HER-2/neu-positive Mammakarzinome häufig hypoxische Regionen sowie damit einhergehend erhöhte Spiegel von HIF-1 α -mRNA (Chaudary und Hill, 2007). Dabei könnte eine Assoziation von CREB mit der Regulation von HIF-1 α vorliegen, da HIF-1 α direkt mit CBP interagiert (Ruas et al., 2010). Dies hat auch klinische Relevanz, da 40 % aller Mammakarzinome und 50 % der fortgeschrittenen Mammakarzinome hypoxische Regionen besitzen (Ward et al., 2013) und sowohl Hypoxie als auch HIF-1 α -Expression mit einer schlechten Prognose von Mammakarzinompatientinnen korreliert (Gatenby et al., 2007).

Förderung der CREB-Aktivität durch Hypoxie

Hypoxie und Azidose sind wesentliche Bestandteile des Tumormikromilieus, wobei sich hypoxische Bereiche deutlich von normoxischen Gewebearealen abgrenzen können (Wojtkowiak et al., 2011). Da bei verminderter Angiogenese Hypoxie im Gewebe auftreten kann, wurde der Einfluss von Sauerstoffmangel in den Modellsystemen nach Kultivierung unter 1 % Sauerstoff

untersucht. Kurzfristig wurde dabei eine deutliche Aktivierung von CREB festgestellt, die über mehrere Tage anhielt. Beitner-Johnson und Millhorn (1998) konnten einen vergleichbaren Effekt schon bei 5 % O₂ nachweisen. Unter diesen Bedingungen kann CREB in Kooperation mit NF-κB unter anderem die Invasivität der Zellen durch eine veränderte Expression von MMP-1 regulieren (Nakayama, 2013). Weiterhin kann CREB auch Amphiregulin ansteuern (O'Reilly et al., 2005). *In vivo* war die CREB-Aktivierung im hypoxischen Lungengewebe mit einer Hochregulation von VEGF-R gekoppelt (Leonard et al., 2008).

Unter hypoxischen Bedingungen wurden höhermolekulare Formen von CREB detektiert, die auf eine posttranslationale Modifikation von CREB hinweisen. Eine Bande von etwa 60 kDa, welche innerhalb weniger Stunden auftaucht, wurde als Ubiquitin-markiertes CREB identifiziert. Weitere ubiquitinierte Formen von CREB wurden nach Inhibition des proteasomalen Abbaus identifiziert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer humanen Lungenkarzinomzelllinie nach Kultivierung unter Hypoxie gemacht, wobei hier ein Verlust der Gesamt-CREB-Expression nach 24 Std. sichtbar war und dieser in murinen Fibroblasten nicht so stark ausgeprägt war (Taylor et al., 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass CREB wegen der reduzierten Aktivität der Phosphatase PP1 hyperphosphoryliert vorliegt und daher proteasomal abgebaut wird. Die Phosphorylierung an Ser¹²¹ ist dabei gleichbleibend und vermutlich keine Ursache. Die CREB-Expression kann durch SUMOylierung stabilisiert werden, so dass eine Abnahme der CREB-Expression auch vermindert werden kann (Comerford et al., 2003). Jedoch ist nicht geklärt, welchen Einfluss chronische Hypoxie im Gewebe auf die CREB-Expression besitzt. Ein kompletter Verlust der CREB-Expression mit nachfolgender Nekrose erscheint plausibel und möglich.

Transport von CREB unter Hypoxie in die Mitochondrien

Da der proteolytische Abbau von CREB im Zytosol stattfindet (Garat et al., 2006), wurde die Lokalisation von CREB bestimmt. Mittels Proteinfractionierung wurden größere Mengen an extranukleären, mitochondrial lokalisierten CREB unter Hypoxie nachgewiesen. Wird der proteolytische Abbau gehemmt, kann CREB ebenso im Zytosol nachgewiesen werden. Die zytosolische Anreicherung kann auch durch den unterbundenen Kernimport von CREB bspw. durch das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin erreicht werden (Chalovich et al., 2006).

Mitochondriales CREB wurde in Zellen des Hippocampus nachgewiesen (Camarota et al., 2002). Für den Import sind anscheinend keine Modifikationen des CREB notwendig, da isolierte, intakte Mitochondrien ³⁵S-Methionin-markiertes CREB aufnahmen (de Rasmio et al., 2009). CREB wird dabei durch das Chaperon-Transporter-System mtHSP70-Tim44 und Tom20 in die Mitochondrien importiert (de Rasmio et al., 2009; Szczepanek et al., 2012). Auch andere Transkriptionsfaktoren wie STAT3 können in die Mitochondrien importiert werden (Leight-Brown et al., 2010; Szczepanek et al., 2012).

Innerhalb der Mitochondrien konnte dabei durch Subfraktionierung die Lokalisierung in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen werden. CREB bindet hier an CRE-Sequenzen im D-LOOP der mtDNA (Ryu et al., 2005) und vermittelt die Expression mitochondrialer Gene, was u.a. die Aktivität der NADH-Dehydrogenase beeinflusst (Lee et al., 2005; Papa et al., 2012). Durch die mitochondriale PKA kann CREB dabei an Ser¹³³ phosphoryliert werden und damit das Überleben von Neuronen unter oxidativen Stress erhöhen (Ryu et al., 2005; Valsecchi et al., 2013). In dieser Arbeit konnten die Prozesse der Bindung von CREB an den D-LOOP und die Expression mitochondrialer Gene auch für murine Fibroblasten unter Hypoxie beschrieben werden.

Förderung der Biogenese und Autophagie der Mitochondrien durch CREB

Unter Hypoxie änderte sich die Organisation und Struktur der Mitochondrien. Dabei durchlaufen sie einen als Fission bezeichneten Prozess, bei dem sich einzelne Mitochondrien von dem tubulären, mitochondrialen Netzwerk abspalten können. Diese Prozesse korrelieren häufig mit der Progression von Tumoren (Boland et al., 2013).

Interessanterweise können dysfunktionale Mitochondrien die CREB-Aktivität deutlich steigern (Arnould et al., 2002; Vankoningsloo et al., 2005) und dadurch eventuell die Neusynthese der Mitochondrien durch PPARGC1 α steuern (Than et al., 2011). Dies wird auch dadurch untermauert, dass CREB bei mitochondrialer Dysfunktion durch die Calcium-abhängige CaMKIV-Kinase phosphoryliert wird (Arnould et al., 2002) und durch diese Kinase aktiviertes CREB ebenfalls PPARGC1 α induzieren kann (Handschin et al., 2003). Dieser Zusammenhang konnte in einem Tierexperiment bestätigt werden: Wurden Mäuse für sechs Std. hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, konnte im hippocampalen Gewebe eine gesteigerte Aktivität von CREB und zeitgleich eine verstärkte Expression von PPARGC1 α nachgewiesen werden (Gutsaeva et al., 2008). CREB ist demnach unter Hypoxie an der mitochondrialen Biogenese durch PPARGC1 α und an der Stabilisierung der mitochondrialen Funktionen beteiligt.

Andererseits konnte unter CREB-Mangel in murinen Fibroblasten auch eine Anhäufung von dysfunktionalen Mitochondrien festgestellt werden. Folglich könnte somit die Mitophagie, ein Prozess, der ähnlich der Autophagie abläuft und defekte Mitochondrienvesikel entsorgt, reduziert sein. Hierbei sind Faktoren vergleichbar mit den Autophagiemarkern ATG5 und -7 involviert, deren Expression unter CREB-Stillegung vermindert ist. Dies könnte eine Beteiligung von CREB an der Autophagie und Mitophagie bedeuten. Ähnliches wurde von Lee und Koautoren (2015) gefunden. In Abb. 4.5 sind die CREB-involvierten Prozesse unter Hypoxie zusammengefasst.

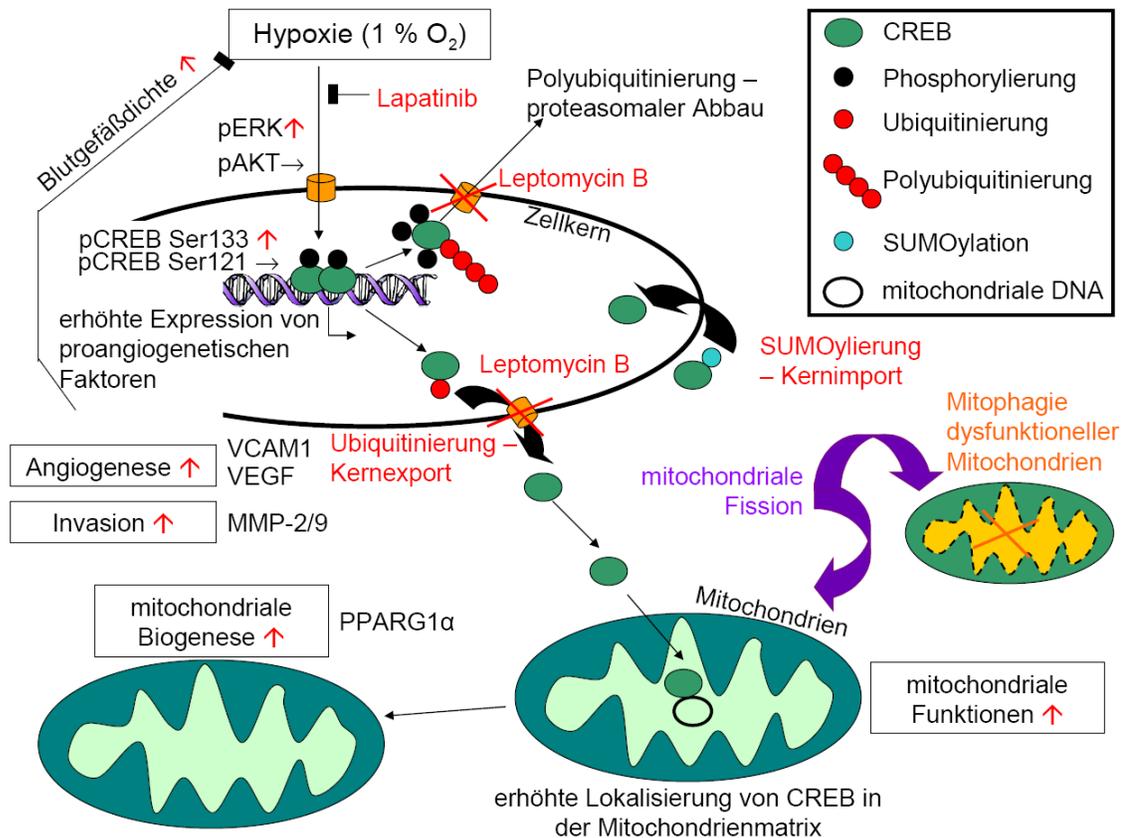


Abbildung 4.5: Zusammenfassende Übersicht über die Prozesse von CREB unter Hypoxie. Sauerstoffmangel aktiviert CREB durch den MEK-ERK-Weg und fördert die Angiogenese durch Aktivierung pro-angiogenetischer Faktoren (VEGF), was dem Sauerstoffmangel entgegenwirken kann. Die verstärkte Phosphorylierung von CREB (Hyperphosphorylierung), kann zu einem proteasomalen Abbau von CREB führen, welcher durch Polyubiquitinierung vermittelt wird. Eine Ubiquitinierung könnte einen Kernexport von CREB ermöglichen, was durch Leptomycin B-Behandlung unterbunden werden kann. Durch SUMOylierung kann zytosolisches CREB wieder in den Kern importiert werden und so vor Abbau geschützt stabilisiert werden. Das exportierte CREB kann durch das mtHSP70-TOM/TIM-System in die mitochondriale Matrix transportiert werden und hier mitochondriale Funktionen und Gene steuern. Unter Hypoxie geht das mitochondriale Netzwerk eine Fission durch, bei der kleinere Partikel abgeschnürt werden. Durch die Mitophagie werden danach dysfunktionale Mitochondrien abgebaut und das verbleibende Material für eine Neusynthese verwendet. Dieser durch PPARGC1 α regulierte Prozess der mitochondrialen Biogenese wird in großem Maßstab von CREB getragen. Die Wirkungsweise von Inhibitoren ist in der Abbildung angegeben. Rote Pfeile zeigen eine Steigerung der Funktion durch CREB bzw. Phosphorylierung durch Hypoxie an (Quelle: Steven et al., 2016 (b)).

Erhöhung des zellulären Überleben durch CREB unter oxidativen Stress

Mitochondriale Dysfunktionen können zur Bildung von ROS führen (Cui et al., 2012). ROS, wie z.B. H₂O₂, stimulieren, wie in dieser Arbeit und auch an Phäochromozytomzellen der Ratte gezeigt wurde, die Aktivierung von CREB (Bedogni et al., 2003). In Kardiomyozyten war die erhöhte CREB-Phosphorylierung unter diesen Bedingungen mit einer Abnahme der Gesamt-CREB-Expression verbunden, was durch proteasomalen Abbau erklärt wurde (Özgen et al., 2009). Ob dieser durch einen PKD-1-vermittelten Prozess ähnlich wie in der Hypoxie auf einer Hyperphosphorylierung von CREB beruht, ist nicht bekannt. Chronische Behandlung mit H₂O₂ über 24 Stunden verringerte die CREB-Expression in hippocampalen Zellen deutlich, was durch den Bcl-2-Verlust zu einer Schädigung der Zellen führte (Pugazhenthii et al., 2003). Die Stimulation von CREB durch unterschiedliche Konzentrationen von H₂O₂ war in HER-2/neu⁺-Zellen von der

AKT-Phosphorylierung abhängig, was die Daten von Bedogni et al. (2003) bestätigt. Dabei zeigte sich bei höheren Konzentrationen ein transientes Verschwinden der Ser¹³³-Phosphorylierung. Dies könnte an der Aktivierung von Entgiftungsmechanismen, wie der Expression von Katalase, beruhen. Tatsächlich waren die Proteinexpression und die Aktivität der Katalase in CREB-defizienten Zellen reduziert, woraus eine positive Regulation durch CREB möglich erscheint. Aufgrund des proteasomalen Abbaus von CREB scheint diese Entgiftung nur kurzfristig auszureichen. Oxidativer Stress soll bei Brustkrebszelllinien vermehrt durch CREB-Aktivität den EMT fördern (Singh et al., 2014), was auch bei Nierenkarzinomzelllinien zutreffen soll (Wang et al., 2015). Bei Neuronen fördert CREB das Überleben bei oxidativen Stress durch die oben geschilderten mitochondrialen Prozesse (Ryu et al., 2005).

4.6 CREB-beeinflusstes Transkriptom und Proteom

Komplexe Kontrolle der gefundenen CREB-regulierten Gene

Da CREB verschiedene Gene regulieren kann, wurde mittels 2D-PAGE das Proteom von HER-2/neu⁺-Zellen mit CREB-defizienten Zellen verglichen. Ähnliche Untersuchungen wurden auch bei myeloischen Leukämiezellen (Pellegrini et al., 2008) und bei murinen HCC unter Normoxie und Hypoxie durchgeführt (Abramovitch et al., 2004). Viele der in den beiden Studien gefundenen und regulierten Gene besitzen in ihren Promotoren keine kompletten CRE-Bindungsstellen sondern oftmals nur Halb-CRE-Sequenzen, die auch wenig konserviert ausgeprägt sein können. Auch die durch CREB regulierten Gene/Proteine in dieser Arbeit, die neben der 2D-PAGE auch durch qPCR identifiziert wurden, wiesen einen hohen Anteil an Promotoren mit einer Halb-CRE-Bindestelle auf (Tab. 4.1). Dies könnte damit begründet werden, dass CREB an einer Halb-CRE-Sequenz eine stärkere Induktion erlaubt als an einer kompletten CRE-Sequenz (Muchardt et al., 1990), da es bei einer kompletten CRE vermutlich stärker mit anderen Transkriptionsfaktoren der CREB-ATF-Familie darum konkurrieren muss. Tatsächlich war die Aktivität der kompletten CRE-Sequenz in Abwesenheit von CREB viel höher als die der Halb-CRE-Sequenzen (Muchardt et al., 1990). Dadurch kann vermutet werden, dass bei CREB-Mangel bspw. ATF-1 diesen teilweise kompensieren kann, was durch die geringere Stabilität der CREM und ATF-1-Homodimere limitiert wird. Allerdings wiesen alle Gene mit einem kompletten CRE sowie fehlender TATA-Box einen starken Verlust der mRNA-Expression unter CREB-Stillegung auf im Gegensatz zu Genen mit einer TATA-Box. Die TATA-Box könnte somit als Verstärker für Transkriptionsfaktoren der ATF X-Familie (ATF-2, ec.) dienen, welche keine Heterodimere mit CREB/ATF-1 bilden können und als intrafamiliäre Heterodimere nur schwach mit CRE interagieren. ATF-2 und ATF-3 können stattdessen Heterodimere mit c-Jun und c-Fos formen, die dadurch an CRE binden können, allerdings auch hier in geringerer Affinität als CREB.

Tabelle 4.1: Einteilung der in der qPCR untersuchten Gene bzw. der in der 2D-PAGE differenziell exprimiert gefundenen Proteine hinsichtlich der Regulation durch putative CREB-Bindestellen. Die Gene wurden mittels der CREB Target Gene Database auf das Vorhandensein von CRE-Seiten in dem Promotorbereich zwischen -5 Kbp und 300 Bp untersucht und in vier Kategorien eingeteilt: CRE und TATA bzw. CRE ohne TATA kennzeichnet Promotoren mit einer vollen CRE-Sequenz (TGACGTCA) und gibt die Anwesenheit oder Abwesenheit einer TATA-Box an. Halb-CRE bezeichnet die Sequenzen TGACG bzw. CGTCA oder Varianten davon unabhängig der TATA-Box. Kein CRE umfasst Promotoren ohne CRE. Die mRNA-Expression der grün unterlegten Gene ist nach CREB-Knock-down in HER-2/neu⁺-Zellen herunterreguliert, bei rot hinterlegten Genen hochreguliert und bei schwarzen Genen unverändert. Da die Datenbank keine mitochondrial kodierten Gene umfasst, sind diese nicht angegeben. Ebenfalls fehlen die differenziell regulierten Proteine der 2D-PAGE, bei denen keine Validierung durch qPCR durchgeführt wurde (bspw. Vimentin).

CRE und TATA	CRE ohne TATA	Halb-CRE	Kein CRE
HAS1	Cyclin D1	Cyclin A1	MMP-2
PPAGRC1 α	ATG-5	Cyclin B1	ICAM1
PEPCK	ATG-7	MMP-9	Angiopoietin2
Bad	Bcl-2	MMP-13	ATF-1
Laktatdehydrogenase 3	TAP1	Bcl-xL	E-Cadherin ²
Cofilin 1	Glut-1	Bax	HER-2/neu
	VEGF-A	TAP2	Hexokinase 1
	Oxoglutaratdehydrogenase	Tapasin	
	Laktatdehydrogenase 1	Citratsynthase	
	Hexokinase 2	Katalase	
		Esterase D	
		Glutathionsynthetase	
		VCAM1	
		PECAM1	
		HAS2	
		Angiopoietin1	
		PPEP	
		HSP90aa1	
		α -Crystallin, B Kette ¹	
		Phosphoglyceratkinase 1	
		Phosphoglyceratmutase 1	
		Pyruvatkinase, Muskel 1/2	
		Peroxiredoxin 4	
		α -Enolase 1	

¹ – α -Crystallin, B Kette war in der 2D-PAGE als sehr stark hochreguliert gefunden worden, die detektierbare Menge an mRNA jedoch vermindert.

² – Reduzierte Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche, aber keine Änderung der mRNA-Expression.

Andererseits bevorzugt CREB das zentrale CpG-Dinukleotid des CRE, was die fehlende Bindung von CREB an die dem CRE ähnliche AP-1-Sequenz erklärt (Smith et al., 2007). Ein methyliertes CpG-Dinukleotid kann von CREB nicht mehr gebunden, aber stattdessen von C/EBP α erkannt werden (Rishi et al., 2010). Mitglieder der Jun-Fos-Familie binden bevorzugt an die AP-1-Sequenz, können allerdings bei Heterodimerisierung mit Mitgliedern der ATF X-Familie an CRE binden, jedoch nicht an das Halb-CRE-Element (Hai und Curran, 1991). Dadurch ergibt sich, dass CREB mit den Heterodimeren von Jun-Fos/ATF X um CRE, nicht jedoch um Halb-CRE konkurriert. Die ATF-1 und CREM-Homodimere sind wesentlich instabiler als das CREB-Homodimer (Shaywitz und Greenberg, 1999) und können die Aktivierung der Halb-CRE bei CREB-Verlust nicht kompensieren. Dieses Modell ist in Abb. 4.6 zusammengefasst. Die Bindungen von CREB an die 8 Bp-große CRE-Sequenz und die variablen Halb-CRE sollen über verschiedene Mechanismen ablaufen (Craig et al., 2001). Zu unterschiedlichen Halb-CRE-Motiven kann CREB dabei eine die dem CRE vergleichbare Dissoziationskonstante erreichen (Wu et al., 1998).

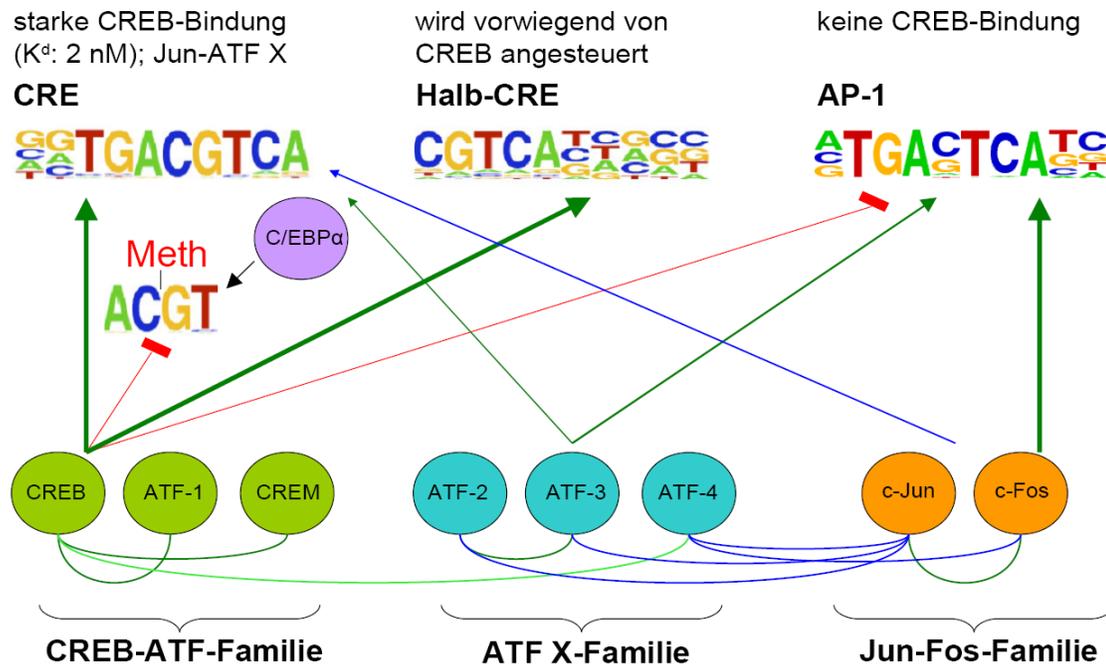


Abbildung 4.6: Heterodimerisierung von bZIP-Transkriptionsfaktoren und ihre Bindung an DNA-Sequenzmotiven. Dargestellt sind drei bZIP-Transkriptionsfaktorfamilien (CREB-ATF, ATF X, Jun-Fos) mit ausgewählten Beispielen. Die Möglichkeiten zur Heterodimerisierung sind mit den gebogenen Linien angegeben: Dunkelgrüne Linien kennzeichnen die intrafamiliäre Heterodimerisierung, in dunkelblau ist die Heterodimerisierung zwischen ATF X und Jun-Fos dargestellt, während Heterodimerisierungen zwischen der CREB-ATF- und ATF X-Familie selten sind (hellgrün). Die Pfeile zeigen die Bindung der Homo- und Heterodimere an die Sequenzen CRE, Halb-CRE und AP-1 an, wobei die Dicke der Linien die Bindungsaffinitäten und die Linienfarbe die Komplexspezifität angeben. Jun und Fos können nur als Heterodimer mit ATF X an CRE binden (blauer Pfeil). CREB-ATF kann nicht an die CpG-methylierten CRE und an AP-1 binden (rote Pfeile). An ein CpG-methyliertes CRE kann jedoch C/EBP α binden (schwarzer Pfeil). Bei den Sequenzen ist die Konservierung der Motive angegeben. Diese entstammt der HOMER-Datenbank. Die Möglichkeiten zur Dimerbildung wurden aus Vlahopoulos et al. (2008) entnommen. Die einzelnen Sequenzen der Bindemotive finden sich im Anhang (Kapitel V.).

Indirekte Genregulation durch CREB

CREB-regulierte Proteine und Gene ohne CRE können durch die Regulation von CREB-abhängigen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Ets und c-Fos, erklärt werden. Dies ist unter dem Aspekt interessant, als dass in dieser Arbeit und auch in anderen Studien (Satpathy et al., 2009) MMP-2 als CREB-reguliertes Gen beschrieben wurde, der murine Promotor jedoch keine konservierte CRE-Sequenz aufweist. An die in dieser Arbeit gefundene putative CREB-Bindestelle des MMP-2-Promotors konnte im Gegensatz zu einer im MMP-9-Promotor keine Bindung von CREB nachgewiesen werden. Daher wird vermutet, dass CREB MMP-2 nicht direkt sondern durch einen anderen Transkriptionsfaktor regulieren kann. Andererseits konnte in EMSA-Studien die Bindung von CREB auch an nicht-CRE-Sequenzen, wie AP-1 oder SP-1, gezeigt werden (Moll et al., 2002). Dabei scheint die Magnesiumkonzentration einen entscheidenden Einfluss zu besitzen, so dass die Bindungseigenschaften im EMSA keine physiologischen Ähnlichkeiten mit dem zellulären Mikromilieu aufweisen müssen, was die Wertung und Interpretation der erhaltenen Ergebnisse erschwert.

4.7 Rolle des CREB für Tumormetabolismus und seine Folgen

Die meisten der gefundenen, differentiell exprimierten Proteine nach CREB-Stillegung regulieren den Metabolismus oder sind Strukturproteine. Letzteres würde die Änderungen der Morphologie der CREB-defizienten HER2/neu⁺-Zellen von einer runden, Foci-reichen Wachstumsform zu einer einzelligigen, Fibroblasten-ähnlichen Struktur erklären, da Tubuline die Zellmorphologie entscheidend prägen (Spiegelman und Farmer, 1982). Der Metabolismus von Tumorzellen wird hingegen stark von der Glykolyse geprägt. Dieser als Warburg-Effekt bezeichnete Prozess führt zu einer Laktatsekretion, was mit einem *Immunescape* von Tumorzellen gekoppelt ist. CREB-Knock-down führte zu einer reduzierten Aufnahme von Glukose, da weniger Glut-1-mRNA exprimiert wurde. Ebenfalls war die Menge an Pyruvat und Citrat verringert, was Konsequenzen für den Energiehaushalt hat. Mitochondriale Störungen können dabei die Menge an verfügbaren ATP reduzieren. Die Rolle von CREB in der Glykolyse ist kaum erforscht. Van der Sligte et al. (2015) zeigten den Effekt von CREB-Knock-down auf glykolytische Enzyme, bei denen GPI, ALDOC, PKM2 reduziert waren. Auch die Expression von Enzymen des Citronensäure-Zyklus und der Glukoneogenese (PEPCK) war nach CREB-Inhibition verringert (Herzig et al., 2001; Xie et al., 1997). PKM und Aldolase waren in murinen Zellen nach CREB-Stillegung differenziell reguliert.

Unter Azidose, welche im Tumor unter Hypoxie durch Laktat-Sekretion oder wegen des Warburg-Effektes verursacht wird, kann CREB durch den p38-Weg und den MAPK-Weg aktiviert werden (Riemann et al., 2011). Das Zusammenspiel von Metabolismus, tumorfördernden Eigenschaften und der Immunantwort ist hinsichtlich Laktat und CREB-Knock-down in Abb. 4.7 wiedergegeben.

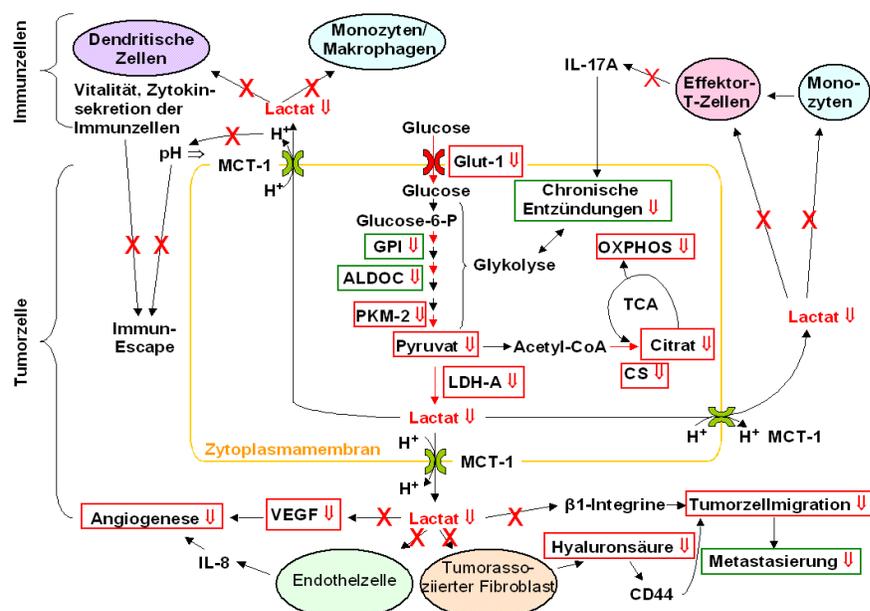


Abbildung 4.7: Zusammenfassende Übersicht über die veränderten metabolischen Prozesse bei CREB-Defizienz und Einflüsse auf das Tumormikromilieu unter Berücksichtigung der Laktat-Sekretion. Proteine, Metabolite und Eigenschaften in roten Kästen wurden in dieser Arbeit als durch CREB reguliert gefunden, grüne in der Literatur beschrieben. Rote Pfeile kennzeichnen verringerte Reaktionswege und rote Kreuze die durch reduzierte Laktat-Sekretion ausbleibenden Stimulationen bzw. Sekretionen nach CREB k.d. (Quelle: verändert nach Hirschhäuser et al., 2011).

4.8 CREB als therapeutische Zielstruktur für die Behandlung von Tumoren?

Mögliche Therapieansätze mit der Zielstruktur CREB

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Entwicklung, Aufrechterhaltung sowie der Progression von Tumoren (Tab. 4.2) wird CREB als exzellente Zielstruktur für die Behandlung von Tumoren diskutiert. Dies wird u.a. durch die Expressionsanalyse des frühen, induzierbaren cAMP-Repressors (ICER; *inducible cyclic AMP early repressor*), einem Inhibitor von CREB unterstützt, der in Knochenmarkszellen von AML-Patienten herunterreguliert ist (Pigazzi et al., 2009). Ein weiterer Vorteil von CREB als Zielstruktur ist seine Regulation durch verschiedene Signalwege, die häufig in Tumoren aberrant aktiviert sind.

Es wurden unterschiedliche Strategien eingesetzt, um die CREB-Funktion in Tumorzellen zu inhibieren: (i) Initiale Studien fokussierten sich auf den Einsatz von dominant-negativen CREB-Mutanten (KCREB), um die CREB-Transkription zu blockieren. KCREB bindet nicht an CRE-Sequenzen, aber heterodimerisiert mit Wildtyp-CREB. Überexpression von KCREB in metastasierenden Tumorzellen führt zu einem verminderten Metastasierungspotential *in vitro* und *in vivo* (Linnerth et al., 2005). (ii) Es wurden CRE *Decoy*-Oligonukleotide entwickelt, die effizient die CREB-vermittelte Gentranskription inhibieren und damit auch das Tumorwachstum negativ beeinflussen (Alper et al., 2001). (iii) Die CREB-Expression wurde durch RNA-Interferenz stillgelegt, was nicht nur die Zellviabilität und Wachstumseigenschaften moduliert, sondern auch die Apoptose verstärkt. So war die shRNA-vermittelte Blockierung der CREB-Expression mit einem verminderten Wachstum von Tumorzellen, einer verstärkten Apoptose, Inhibition des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase sowie einer Suppression des verankerungsunabhängigen Wachstums gekoppelt (Tan et al., 2012 (b)). Da diese *Proof of concept*-Studien einen therapeutischen Effekt zeigten, wurden/werden alternative Strategien zur Inhibierung der CREB-vermittelten Gentranskription mit Hilfe von *small molecules* entwickelt. Zu diesen zählen Kinase-Inhibitoren, die die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von CREB verhindern sowie chemische Inhibitoren, die die CREB-CRE- oder die CREB-CBP-Interaktion blockieren (Best et al., 2004; Jiang et al., 2012; Li et al., 2012; Xie et al., 2013). So blockiert z. B. die Substanz 2-Naphthol-AS-E-Phosphat (KG-501) reversibel und Dosis-abhängig die Interaktion zwischen der KID-Domäne von CREB und der KIX-Domäne von CBP, aber nicht die Forskolin-stimulierte Phosphorylierung von CREB an Ser¹³³. Jedoch wurde die cAMP-abhängige Expression von CREB-Zielgenen durch mikromolare Konzentrationen von KG-501 ohne einer *off-target*-Inhibierung der Transkriptionsmaschinerie moduliert. Eine weitere Strategie für die Behandlung und Prävention von CREB-überexprimierenden Tumoren stellt auch die Modulation von CREB-regulierenden miRs dar (Sakamoto und Frank 2009).

Tabelle 4.2: Übersicht über die CREB-regulierten Merkmale von Tumorzellen. Beispiele der zugrundeliegenden Mechanismen der einzelnen Kennzeichen sind aus Fiaschi und Chiarugi (2012) übernommen worden. Die Spalte CREB-reguliert kennzeichnet, ob ein Bezug zu dem jeweiligen Mechanismus in dieser Arbeit gefunden wurde (✓) oder keiner besteht (X). Wurde in der Literatur eine Regulation durch CREB beschrieben, so ist dies in der letzten Spalte angegeben. --- zeigt an, dass bisher keine Verbindungen zu CREB beschrieben sind.

Kennzeichen (Hallmarks of Cancer)	Zugrundeliegender Mechanismus	CREB-reguliert?	Zusätzliche CREB-bezügliche Literaturreferenzen
Selbstversorgung mit Wachstumssignalen	Liganden-unabhängige RTK Transaktivierung	X	---
	Reduzierte RTK-Aktivierungsschwelle	X	---
Unterdrückung von wachstumshemmenden Signalen	P53-Aktivierung		Giebler et al., 2000; Okoshi et al., 2009
	Verlust der Kontaktinhibition	✓	?
	verankerungsunabhängiges Wachstum	✓	Lee et al., 2015; Pigazzi et al., 2009
Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem	Ausschalten von immunmodulatorischen Komponenten, welche die Tumorzellen eliminieren können		Wen et al., 2010
Unbegrenzt Replikationspotential	Expression von Telomerase	1	---
Tumorfördernde Entzündungen	Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-6 oder IL-8		Westbom et al., 2014
Aktivierung von Invasion und Metastasierung	Met-Überexpression		---
	MMP-Sekretion	✓	Melnikova et al., 2006; Park et al., 2010
	Invadopodienbildung		---
	Plastizität der Zellbeweglichkeit	✓	?
	EMT		Wang et al., 2015; Wu et al., 2007
Induktion von Angiogenese	Freisetzung von VEGF	✓	Kang et al., 2014; Nomura et al., 2006; Rhee et al., 2015
	Rekrutierung von perivaskulären Zellen	2	---
	Signale durch VEGF und Angiopoietin	✓	Anisimov et al., 2013
Genomische Instabilitäten und Mutationen	erhöhte Mutationsrate	X	---
	erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mutagenen Agenzien und UV-Licht		Amorino et al., 2003; Rozenberg et al., 2009
	Kompromittierung des Reparatursystems		Amorino et al., 2003; Shanware et al., 2010
Resistenz gegenüber Zelltod	PTEN-Inaktivierung	✓	Tan et al., 2012; Gu et al., 2011 ³
	Anoikis-Resistenz	✓	Jin et al., 2013
	Src-Aktivierung		---
	NF-κB-Aktivierung		?
Entkopplung des Energiestoffwechsels / Metabolismus	Warburg-Effekt	✓	van der Sligte et al., 2015
	Verstärkte Expression von Glukosetransportern	✓	Jin et al., 2013
	Aktivierung von Onkogenen und Mutation von Tumorsuppressoren	X	---
	erhöhte Expression von HIF-1	X	---

1 – NIH3T3-Zellen bzw. ihre Transfektanten sind durch Telomerase-Aktivität immortalisiert (Holt et al., 1996). Daher kann dies nicht in dem murinen Zellsystem untersucht werden.

2 – Es wurden keine Ko-Kultivierungen durchgeführt.

3 – CREB selbst ist dabei Substrat der PTEN-Phosphatase.

Vermittlung von Resistenzmechanismen durch CREB

Eine Herunterregulation von CREB führt zu einer veränderten Expression von BRAC1 und einer erhöhten Expression von Aromatase, einem Schlüsselenzym der Östrogen-Biosynthese, welches durch CREB transkriptionell reguliert wird und mit einer Resistenzentwicklung von Mammakarzinomzellen gegenüber Tamoxifen assoziiert ist (Phuong et al., 2014). Interessanterweise wird

die Resistenz gegenüber der MAPK-Inhibition durch eine Reaktivierung von CREB in Mammakarzinomen induziert, was mit einem veränderten Histon-Acetylierungsmuster einhergeht (Johannessen et al., 2013).

Aberrante CREB-Signale spielen bei der Karzinogenese und Tumorprogression durch die deregulierte Expression von nachgeschalteten Genen, die die Proliferation, Apoptose, Angiogenese, Metastasierung, Immunüberwachung, maligne Transformation, den Metabolismus und die Aufrechterhaltung von Tumorstammzellen kontrollieren, eine wichtige Rolle (Abb. 4.8). Dies ist oft mit einem verstärkten Tumorzellwachstum, einer verminderten Apoptoserate, verstärkter Angiogenese und Inhibierung der Bestrahlungs-induzierten Differenzierung gekoppelt (Suarez et al., 2014) und geht mit klinisch relevanten Parametern, wie Tumorstadium und -grad, Metastasierung, erhöhter Rezidivrate und schlechter Prognose von Tumorpatienten, einher (Cheng et al., 2007; Chhabra et al., 2007; Deng et al., 2008; Sakamoto und Frank 2009; Seo et al., 2008). Ebenfalls spielt pCREB bei der Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber Inhibitoren des Raf-MEK-ERK- und PI3K/AKT-Signalwegs eine Rolle (Johannessen et al., 2013; Phuong et al., 2014). Wegen der Beteiligung von CREB an einer Vielzahl von onkogenen Merkmalen und der Induktion bei Resistenzen scheint CREB ein vielversprechendes Ziel für therapeutische Ansätze bei Tumorerkrankungen unter Beteiligung von HER-2/neu-Überexpression und Ras-Mutationen zu sein.

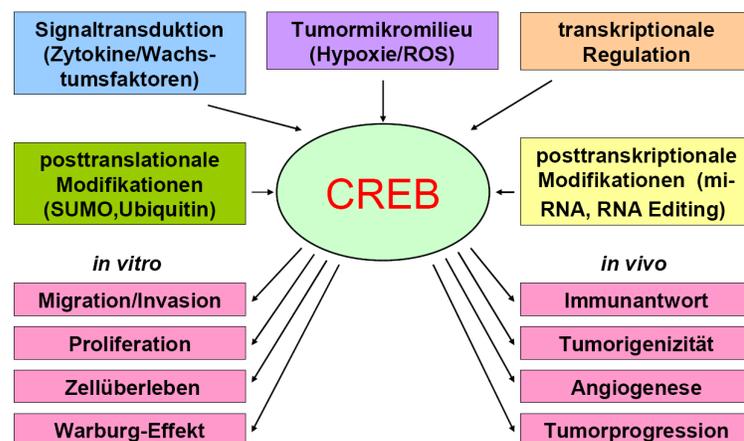


Abbildung 4.8: Regulation der CREB-Expression und Aktivität und Bedeutung von CREB für die Karzinogenese. Es sind Beispiele für die post-transkriptionale und post-translationale Regulation von CREB dargestellt. Die Wirkung von CREB auf physiologische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* ist angegeben (Quelle: verändert nach Steven et al., 2016 (a)).

Bedeutung von CREB für das Überleben von Tumorpatienten

In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine Korrelation zwischen einer verstärkten CREB-Expression und einer deutlich schlechteren Prognose festgestellt werden. So haben bei ALL die Patienten mit einer CREB-Phosphorylierung an Ser¹³³ über dem Mittelwert ein verringertes Gesamtüberleben und eine höhere Wahrscheinlichkeit der Tumorrückkehr, bei einer verstärkten CREB-Expression ist ebenfalls das Gesamtüberleben negativ beeinträchtigt (van der Sligte et al., 2015). Ähnliche Daten wurden auch für AML gefunden (Cheng et al., 2007).

Mittels der Internetdatenbank KMplot wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven für vier Tumorentitäten unter Berücksichtigung der CREB-Expression und klinischen Faktoren erstellt (Tab. 4.3). Dabei konnte in Lungen- und Magenkrebs eine deutlich verschlechterte Prognose bei erhöhter CREB-Expression gefunden werden. Interessanterweise war dies bei Lungenkrebs auf das Adenokarzinom beschränkt und zeigte bei frühen Tumorstadien eine Beteiligung von CREB. Bei Magenkrebs ist ein verkürztes Überleben im Falle von CREB-Überexpression bei Männern und verringerten HER-2/neu-Mengen feststellbar. Hierbei sind auch spätere Stadien mit einer schlechteren Prognose und einer CREB-Überexpression korreliert. Bei Brustkrebs korreliert CREB mit der Metastasierung bei HER-2/neu-Expression und späteren Tumorstadien. Ebenfalls ist ein verbessertes Rezidiv-freies Überleben für den luminalen Typ A unter verstärkter CREB-Expression nachgewiesen worden. Das Überleben bei Ovarialkrebs ist unabhängig der CREB-Expression.

Tabelle 4.3: Einfluss der erhöhten CREB-Expression auf das Überleben von Krebspatienten. Dargestellt ist das Gesamtüberleben (Gesamt), Rezidiv-freies Überleben (Rezidiv), Metastasen-freies Überleben (Metast) und Progressions-freies Überleben (Progres) von Krebspatienten (Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Ovarialkrebs) in Abhängigkeit einer erhöhten CREB-Expression. Grün zeigt ein signifikant ($P < 0,05$) verlängertes Überleben bei verstärkter CREB-Expression in der jeweiligen Gruppe an, schwarz keinen Effekt und rot ein signifikant ($P < 0,05$) verringertes Überleben bei erhöhter CREB-Expression. Die Gruppen sind im Einzelnen: Alle = Alle verfügbaren Patientendaten bei einer Krebsart; basal = Basaler Typ (triple negativ in Bezug auf Hormonrezeptoren ER und PR sowie HER-2 negativ), Standardtherapie: Chemotherapie, schlechte Prognose; Lumi A = Luminaler Typ A (Hormonrezeptor-positiv mit niedriger Proliferation, HER-2 negativ und ER positiv, Ki67 niedrig), Standardtherapie: oftmals endokrine Therapie mit Tamoxifen, insgesamt bessere Prognose; Lumi B = Luminaler Typ B (Hormonrezeptor-positiv mit hoher Proliferation, HER-2 positiv oder negativ, und ER positiv, Ki67 hoch), Standardtherapie: adjuvante Chemotherapie, endokrine Therapie, ggf. Trastuzumab-Behandlung, aggressiver als Lumi A; HER2 = HER-2/neu-Typ (HER-2/neu positiv und Hormonrezeptor-negativ), Standardtherapie: Trastuzumab-Behandlung; HER2^{+/+} = durch IHC bestimmte HER-2-Expression, Grad 2/3 = Differenzierungsgrad mäßig/gering; Rauch. = Raucher und Ex-Raucher, Nichtr. = Nichtraucher, ♀ = weiblich; ♂ = männlich; St. X = Stadieneinteilung nach TNM-Kriterien; Adeno. = Adenokarzinom (maligner Tumor des Drüsengewebes); Squa. = Plattenepithelkarzinom (maligner Tumor der Schleimhaut); N1,2,3 = Ausprägung regionaler Lymphknotenmetastasen; M0 = Fehlen von Fernmetastasen; P53 M = Mutation des Tumorsuppressorgens p53; P53 W = p53 Wildtyp; Endo = endometrialer Tumor (Schleimhaut); Serous = seröser Tumor. Zur Erstellung wurde die KMplot-Datenbank verwendet (Györfy et al., 2010). Die erstellten Kaplan-Meier-Kurven finden sich im Anhang (Kapitel VII).

Tumor										
Brust	Alle	basal	Lumi A	Lumi B	HER2	HER2 ⁺	HER2 ⁻	Grad 2	Grad 3	
Gesamt										
Rezidiv										
Metast										
Lunge	Alle	Rauch.	Nichtr.	♀	♂	St. 1	St. 2	St. 3	Adeno.	Squa.
Gesamt										
Progres										
Magen	Alle	♀	♂	HER2 ⁺	HER2 ⁻	St. 1	St. 2	St. 3	N1,2,3	M0
Gesamt										
Progres										
Ovar	Alle	P53 M	P53 W	Endo	Serous					
Gesamt										
Progres										

Aus den Daten kann geschlossen werden, dass CREB eine deutliche Varianz bei den untersuchten Tumorentitäten aufweist. Vor allem innerhalb der Mammakarzinome ist eine Förderung der

Metastasierung bei HER-2/neu⁺ oder schlecht differenzierten Tumoren durch CREB ableitbar, während es bei dem luminalen Typ A das Rezidiv-freie Überleben sogar fördert. Ob dies durch dessen niedrige Expression von HER-2/neu und einer geringeren CREB-Aktivität/Phosphorylierung verursacht wird, ist unbekannt. Dieser Mammakarzinomsubtyp zeigt aber ein gutes Ansprechen auf die antihormonelle (endokrine) Therapie und bedingt eine bessere Prognose (Sørli et al., 2001). Luminaler Typ B mit HER-2/neu-Beteiligung hingegen äußert sich in einem aggressiveren Verlauf mit Invasion in die Lymphknoten und stärkeren Tumorwachstum und tritt überwiegend bei jüngeren Frauen auf (Cheang et al., 2009). Eine ebenfalls schlechte Prognose bietet der basale Typ (triple negativ). Durch die Trastuzumab-Behandlung ist der HER-2-Typ heute besser kontrollierbar. CREB begünstigt die Entstehung von Metastasen, hat jedoch bei allen Mammakarzinomen außer dem luminalen Typ A keinen Einfluss auf das (Rezidiv-freie) Überleben. Eventuell stellen die deutlich verbesserten Möglichkeiten der Früherkennung durch Mammographie hierbei einen Ausgleich dar (Robert-Koch-Institut, 2015).

Patienten mit Bronchialkarzinom wiesen ein verringertes Gesamtüberleben bei gesteigerter CREB-Expression auf, allerdings nur bei Frauen und nur beim Adenokarzinom. In Plattenepithelkarzinom wurde kein Einfluss gefunden, während eine andere Studie die Aktivität und Expression von CREB bei undifferenzierten Tumoren sowie bei Rauchern mit einer verbesserten Prognose beschrieb (Liu et al., 2014). Fallahi et al. (2014) zeigten eine Korrelation des Tumorsuppressors Tristetraprolin, welcher in Brust- und Lungenkrebs bei CREB-Überexpression vermindert exprimiert wird.

Bei Magenkrebs ist der negative Einfluss der CREB-Expression auf das Überleben ebenfalls deutlich sichtbar. Dementgegen steht eine Studie von Chang et al. (2015), die eine verstärkte Phosphorylierung von CREB an Ser¹³³ mit einer günstigeren Prognose verband. Da in diesem System eine Korrelation mit dem Rezeptor ROR1 besteht, könnte es von den in dieser Arbeit verwendeten Modellzelllinien und den Brust- sowie Lungenkarzinomen in diesem Punkt davon abweichen. Interessanterweise ist in Brustkrebszelllinien ebenfalls eine verstärkte CREB-Aktivität bei ROR1-Expression nachweisbar, die allerdings als Tumorwachstumsfördernd beschrieben wurde (Zhang et al., 2010). Gesteigerte CREB-Expression korrelierte mit der schlechteren Prognose bei Männern und der auffällig ungünstigeren Prognose bei verringerter HER-2/neu-Expression. HER-2/neu kann als Marker für die Prognose bei Magenkrebs eingesetzt werden und stellt ein Therapieziel dar (Gravalos und Jimeno, 2008). Ob dabei die Entstehung von Magenkrebs durch Infektion mit *Helicobacter pylori* eine Beeinflussung der CREB-Aktivität auslöst, ist nicht bekannt.

Generell sind Ursachen für eine verstärkte Expression von CREB in Gewebe und Zellen bislang nur wenig erforscht. Eine Möglichkeit zur Regulation sind miRs, von denen etwa sechs in der Literatur als Regulatoren für die CREB-Expression beschrieben wurden (Chen et al., 2012; Tan et al., 2012 (b)).

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass onkogene Transformation mit HER-2/neu oder K-/H-Ras^{V12} zu einer gesteigerten Expression von CREB führt. Allerdings bleibt der verursachende Mechanismus unklar. Eine Erklärung dafür sind einerseits CREB-regulierende miRs, die an den 3'-UTR der mRNA binden und so die Proteinexpression beeinflussen können. Die bisher in der Literatur beschriebenen miRs sollten zunächst mit der onkogenen Transformation abgeglichen werden und nach miR-Überexpression der CREB-Status kontrolliert werden. Zur Identifizierung neuer putativ CREB-bindender miRs kann die neu etablierte miTRAP-Technik verwendet werden, bei der durch an Amylose-Kugeln immobilisierte 3'-UTR-Sequenzen eine Affinitätschromatographische Aufreinigung der spezifisch bindenden miRs erreicht wird.

Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen von CREB seine Aktivität und Expression verändern können. Dabei ist die Phosphorylierung bislang nur an der Serinseitenkette 133 sehr gut erforscht. Welche Funktion die weiteren Serin-, Tyrosin- und Threoninseitenketten der KID in der onkogenen Transformation haben, ist bisher wenig beschrieben. Daher sollte das Phosphorylierungsmuster unter bestimmten Kultivierungsbedingungen untersucht werden und analog den in dieser Arbeit verwendeten Techniken die Signaltransduktion und die Funktionen aufgeklärt werden. Für Letzteres bieten sich dominant negative Mutationen der einzelnen Seitenketten durch einen Serin-Alanin-Austausch an, so dass eine CREB-Aktivierung durch Phosphorylierung nicht mehr möglich ist. Durch diese Technik können auch weitere Modifikationsstellen wie für die Ubiquitinierung oder die Glykosylierung verändert und deren Funktion aufgeklärt werden.

Neben der Aktivität von CREB kann die Transkription der „CRE-ausgestatteten“ Gene auch durch den Methylierungsstatus der „CpG-Insel“ verändert werden. Da die meisten der in dieser Arbeit gefundenen, CREB-regulierten Gene nach CREB-*Knock-down* verringert exprimiert werden, sollte bei den davon divers regulierten Genen, welche eine gesteigerte Expression aufweisen, dieser Methylierungsstatus verglichen werden.

Ebenso ist die Interaktion von CREB mit Ko-Aktivatoren in dieser Arbeit als ein Therapieziel beschrieben worden, da KG-501 eine Interaktion mit den HATs p300 und CBP unterbindet. Weitere Interaktionspartner von CREB könnten durch spezifische Affinitätschromatographie mit CRE-Konsensussequenzen isoliert und nach anschließender 1D-SDS-PAGE durch MALDI-MS identifiziert werden. An diese Untersuchungen sollten sich Validierungsexperimente bezüglich der CREB-Interaktion von den identifizierten Proteinen mittels *Two-Hybrid*-Analysen anschließen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors CREB für die onkogene Transformation durch HER-2/neu-Überexpression und dominant positiven H-/K-Ras-Mutationen beschrieben. In murinen Modellsystemen mit onkogener Transformation von HER-2/neu sowie H-/K-Ras-Mutationen und humanen Tumorzelllinien konnte dabei eine verstärkte Expression von CREB nachgewiesen werden. Die erhöhte CREB-Aktivität (gemessen durch die Phosphorylierung an Serin 133) wurde dabei vorwiegend durch den PI3K/AKT-Weg (HER-2/neu) bzw. durch PI3K/AKT-Weg und MEK/ERK-Weg (Ras-Mutationen) vermittelt. Eine spezifische shRNA-medierte CREB-Stillegung verursachte eine Abnahme der Proliferation, Migration sowie Invasion und erhöhte die Apoptosesensitivität durch Caspase-3-Aktivierung. *In vivo-Experimente* zeigten eine verringerte Tumorigenität der CREB-defizienten Zellen, was u.a. mit einer verstärkten Nekrose und reduzierter Blutgefäßneubildung einherging. Unter Sauerstoffmangel war eine verstärkte Aktivität von CREB feststellbar, was auch zu einer Modifikation von CREB durch SUMOylierung und Ubiquitinierung führte. Letzteres verursachte einen proteasomalen Abbau von CREB, aber auch eine gesteigerte Lokalisation von CREB in der mitochondrialen Matrix. Dabei wurde eine Bindung von CREB an den D-LOOP der mitochondrialen DNA detektiert, was die mitochondriale Funktionen sowie die mitochondriale Biogenese regulierte. Eine Regression von CREB führte zu verminderter Expression mehrerer glykolytischer Enzyme, was die metabolischen Eigenschaften der Tumorzellen revertierte.

Zusammenfassend stellt CREB eine mögliche Zielstruktur für die Krebstherapie dar, wobei eine Anwendung beim Patienten bei Ausprägung von dominant-positiven Ras-Mutationen oder HER-2/neu-Überexpression am Vielversprechendsten erscheint.

7. Literaturverzeichnis

Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E, Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1338-46.

Aggarwal S, Kim SW, Ryu SH, Chung WC, Koo JS. Growth suppression of lung cancer cells by targeting cyclic AMP response element-binding protein. *Cancer Res.* 2008 Feb 15;68(4):981-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0249.

Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Dec 22;13(1):39-51. doi: 10.1038/nrm3255.

Ahmed BY, Husnain O, Stafford R, Howard M, Gujar AS, Moradiya V, Patel KK, Sihotra S. Hyperphosphorylation of CREB in human dopaminergic neurons: a kinetic study of cellular distribution of total CREB and phospho-CREB following oxidative stress. *Neuroreport.* 2013 Sep 11;24(13):757-62. doi: 10.1097/WNR.0b013e328364d616.

Ahn S, Olive M, Aggarwal S, Krylov D, Ginty DD, Vinson C. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):967-77.

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 1987 Jun 15;47(12):3239-45.

Alessi DR. The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 1997 Feb 3;402(2-3):121-3.

Alexa A, Baderca F, Zăhoi DE, Lighezan R, Izvernariu D, Raica M. Clinical significance of Her2/neu overexpression in urothelial carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(2):277-82.

Alper O, Bergmann-Leitner ES, Abrams S, Cho-Chung YS. Apoptosis, growth arrest and suppression of invasiveness by CRE-decoy oligonucleotide in ovarian cancer cells: protein kinase A downregulation and cytoplasmic export of CRE-binding proteins. *Mol Cell Biochem.* 2001 Feb;218(1-2):55-63.

Altieri F, Paolo Arcari, P, Emilia Rippa, E. Gastric Cancer: Molecular Pathology State. In: *Current Topics in Gastritis - 2012, 2012.* Gyula Mozsik (Hrg.), DOI: 10.5772/53757

Amorino GP, Mikkelsen RB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Dominant-negative cAMP-responsive element-binding protein inhibits proliferating cell nuclear antigen and DNA repair, leading to increased cellular radiosensitivity. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29394-9. Epub 2003 May 6.

Angel L, Isingrini M, Bouazzaoui B, Taconnat L, Allan K, Granjon L, Fay S. The amount of retrieval support modulates age effects on episodic memory: evidence from event-related potentials. *Brain Res.* 2010 Jun 4;1335:41-52. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.040. Epub 2010 Mar 24.

Anisimov A, Tvorogov D, Alitalo A, Leppänen VM, An Y, Han EC, Orsenigo F, Gaál EI, Holopainen T, Koh YJ, Tammela T, Korpisalo P, Keskitalo S, Jeltsch M, Ylä-Herttuala S, Dejana E, Koh GY, Choi C, Saharinen P, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-angiopoietin chimera with improved properties for therapeutic angiogenesis. *Circulation*. 2013 Jan 29;127(4):424-34. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.127472.

Antonescu CR, Nafa K, Segal NH, Dal Cin P, Ladanyi M. EWS-CREB1: a recurrent variant fusion in clear cell sarcoma--association with gastrointestinal location and absence of melanocytic differentiation. *Clin Cancer Res*. 2006 Sep 15;12(18):5356-62.

Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol*. 2000 Apr;20(7):2475-87.

Arnould T, Vankoningsloo S, Renard P, Houbion A, Ninane N, Demazy C, Remacle J, Raes M. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J*. 2002 Jan 15;21(1-2):53-63.

Arons E, Kunin V, Schechter C, Ehrlich R. Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):3942-51.

Asscher Y, Pleban S, Ben-Shushan M, Levin-Khalifa M, Yao Z, Seger R. Leptomycin B: An important tool for the study of nuclear export. *Cell Biology* 2002 Vol2 I2.

Aucoin R, Reiland J, Roy M, Marchetti D. Dominant-negative CREB inhibits heparanase functionality and melanoma cell invasion. *J Cell Biochem*. 2004 Oct 1;93(2):215-23.

Barlow CA, Kitiphongspattana K, Siddiqui N, Roe MW, Mossman BT, Lounsbury KM. Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. *Apoptosis*. 2008 May;13(5):681-92. doi: 10.1007/s10495-008-0203-z.

Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M, Fischer C, Clendenin C, Leiden JM. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):81-5.

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):463-75. doi: 10.1038/nrc2656. Epub 2009 Jun 18.

Beckers J, Herrmann F, Rieger S, Drobyshv AL, Horsch M, Hrabé de Angelis M, Seliger B. Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2005 Apr 20;114(4):590-7.

Bedogni B, Pani G, Colavitti R, Riccio A, Borrello S, Murphy M, Smith R, Eboli ML, Galeotti T. Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganese superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival. *J Biol Chem*. 2003 May 9;278(19):16510-9. Epub 2003 Feb 27.

Beitner-Johnson D, Millhorn DE. Hypoxia induces phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein by a novel signaling mechanism. *J Biol Chem*. 1998 Jul 31;273(31):19834-9.

Berndt B, Haverkamp S, Reith G, Keil S, Niggemann B, Zänker KS, Dittmar T. Fusion of CCL21 non-migratory active breast epithelial and breast cancer cells give rise to CCL21 migratory active tumor hybrid cell lines. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e63711. doi: 10.1371/journal.pone.0063711. Print 2013.

Best JL, Amezcua CA, Mayr B, Flechner L, Murawsky CM, Emerson B, Zor T, Gardner KH, Montminy M. Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17622-7. Epub 2004 Dec 7.

Birkeland E, Wik E, Mjøs S, Hoivik EA, Trovik J, Werner HM, Kusonmano K, Petersen K, Raeder MB, Holst F, Øyan AM, Kalland KH, Akslen LA, Simon R, Krakstad C, Salvesen HB. KRAS gene amplification and overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer. *Br J Cancer*. 2012 Dec 4;107(12):1997-2004. doi: 10.1038/bjc.2012.477. Epub 2012 Oct 25.

Bleckmann SC, Blendy JA, Rudolph D, Monaghan AP, Schmid W, Schütz G. Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development *Mol Cell Biol*. 2002 Mar;22(6):1919-25.

Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol*. 2013 Dec 2;3:292. doi: 10.3389/fonc.2013.00292.

Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989 Sep 1;49(17):4682-9.

Brauer RR, Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, Bar-Eli M. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2011 Apr;21(2):83-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.12.007. Epub 2010 Dec 13.

Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013 Sep;108(3):370-7. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.010. Epub 2013 Jul 3.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*. 1981 May;41(5):1751-6.

Brattain MG, Levine AE, Chakrabarty S, Yeoman LC, Willson JK, Long B. Heterogeneity of human colon carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 1984;3(3):177-91.

Bui C, Barter MJ, Scott JL, Xu Y, Galler M, Reynard LN, Rowan AD, Young DA. cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J*. 2012 Jul;26(7):3000-11. doi: 10.1096/fj.12-206367. Epub 2012 Apr 13.

Bullock, W., Fernandez, J.M., Short, J.M. XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase section. *Biotechniques* 1987;5, 376–9.

Buzzi N, Colicheo A, Boland R, de Boland AR. MAP kinases in proliferating human colon cancer Caco-2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2009 Aug;328(1-2):201-8. doi: 10.1007/s11010-009-0090-9. Epub 2009 Mar 20.

Cammarota M, Paratcha G, Bevilaqua LR, Levi de Stein M, Lopez M, Pellegrino de Iraldi A, Izquierdo I, Medina JH. Cyclic AMP-responsive element binding protein in brain mitochondria. *J Neurochem.* 1999 Jun;72(6):2272-7.

Campbell KM, Lumb KJ. Structurally distinct modes of recognition of the KIX domain of CBP by Jun and CREB. *Biochemistry.* 2002 Nov 26;41(47):13956-64.

Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Nov;86(21):8323-7.

Caysa, H. Untersuchungen zum Monitoring von Tumorxenograftmodellen mittels nicht invasivem in vivo Multispektral-Fluoreszenz imaging. 2013 Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Chalovich EM, Zhu JH, Caltagarone J, Bowser R, Chu CT. Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. *J Biol Chem.* 2006 Jun 30;281(26):17870-81. Epub 2006 Apr 18.

Chambers AF, Hota C, Prince CW. Adhesion of metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells to osteopontin, fibronectin, and laminin. *Cancer Res.* 1993 Feb 1;53(3):701-6.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Aug;79(16):4848-52.

Chang H, Jung WY, Kang Y, Lee H, Kim A, Kim BH. Expression of ROR1, pAkt, and pCREB in gastric adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2015 Oct;19(5):330-4. doi: 10.1016/j.anndiagnpath.2015.06.010. Epub 2015 Jul 11.

Chaudary N, Hill RP. Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis.* 2006-2007;26:55-64.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082. Epub 2009 May 12.

Chen J, Xu L, Chen S, Yang J, Jiang H. Transcriptional regulation of platelet-derived growth factor-B chain by thrombin in endothelial cells: involvement of Egr-1 and CREB-binding protein. *Mol Cell Biochem.* 2012 Jul;366(1-2):81-7. doi: 10.1007/s11010-012-1285-z. Epub 2012 Apr 10.

Chen YC, Hsu WL, Ma YL, Tai DJ, Lee EH. CREB SUMOylation by the E3 ligase PIAS1 enhances spatial memory. *J Neurosci.* 2014 Jul 16;34(29):9574-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4302-13.2014.

Cheng JC, Esparza S, Sandoval S, Shankar D, Fu C, Sakamoto KM. Potential role of CREB as a prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Future Oncol.* 2007 Aug;3(4):475-80.

Cheng JC, Kinjo K, Judelson DR, Chang J, Wu WS, Schmid I, Shankar DB, Kasahara N, Stripecke R, Bhatia R, Landaw EM, Sakamoto KM. CREB is a critical regulator of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1182-92. Epub 2007 Nov 1.

Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncol Rep.* 2007 Oct;18(4):953-8.

Cho EC, Mitton B, Sakamoto KM. CREB and leukemogenesis. *Crit Rev Oncog.* 2011;16(1-2):37-46.

Choi J, Choi K, Benveniste EN, Rho SB, Hong YS, Lee JH, Kim J, Park K. Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5554-60.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell.* 1999 Jul 9;98(1):69-80.

Comerford KM, Leonard MO, Karhausen J, Carey R, Colgan SP, Taylor CT. Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4;100(3):986-91. Epub 2003 Jan 27.

Cox AD, Hisaka MM, Buss JE, Der CJ. Specific isoprenoid modification is required for function of normal, but not oncogenic, Ras protein. *Mol Cell Biol.* 1992 Jun;12(6):2606-15.

Craig JC, Schumacher MA, Mansoor SE, Farrens DL, Brennan RG, Goodman RH. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):11719-28. Epub 2000 Dec 27.

Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:646354. doi: 10.1155/2012/646354. Epub 2011 Oct 2.

Daniel P, Filiz G, Brown DV, Hollande F, Gonzales M, D'Abaco G, Papalexis N, Phillips WA, Malaterre J, Ramsay RG, Mantamadiotis T. Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis.* 2014 Jun 30;3:e108. doi: 10.1038/oncsis.2014.21.

D'Amato V, Raimondo L, Formisano L, Giuliano M, De Placido S, Rosa R, Bianco R. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015 Dec;41(10):877-83. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.08.001. Epub 2015 Aug 8.

Darnell JE Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):740-9.

Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7491-6. Epub 2003 Jun 13.

De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12202-7.

De Rasmio D, Signorile A, Roca E, Papa S. cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS J.* 2009 Aug;276(16):4325-33. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07133.x. Epub 2009 Jul 15.

Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal.* 2005 Nov;17(11):1343-51. Epub 2005 Mar 16.

Deng X, Liu H, Huang J, Cheng L, Keller ET, Parsons SJ, Hu CD. Ionizing radiation induces prostate cancer neuroendocrine differentiation through interplay of CREB and ATF2: implications for disease progression. *Cancer Res.* 2008 Dec 1;68(23):9663-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2229.

Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Jun;79(11):3637-40.

Desdouets C, Matesic G, Molina CA, Foulkes NS, Sassone-Corsi P, Brechot C, Sobczak-Thepot J. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol.* 1995 Jun;15(6):3301-9.

Destatis. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2015, Pressemitteilung Nr. 034 vom 02.02.2015: Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15_034_232.html (Zugriff vom 19.10.2015)

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science.* 1987 Jul 10;237(4811):178-82.

Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol.* 2010 Jan;186(1):1-6. doi: 10.1007/s00066-009-2026-4. Epub 2009 Dec 28.

Dobroff AS, Wang H, Melnikova VO, Villares GJ, Zigler M, Huang L, Bar-Eli M. Silencing cAMP-response element-binding protein (CREB) identifies CYR61 as a tumor suppressor gene in melanoma. *J Biol Chem.* 2009 Sep 18;284(38):26194-206. doi: 10.1074/jbc.M109.019836. Epub 2009 Jul 24.

Dodson GE, Tibbetts RS. DNA replication stress-induced phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein mediated by ATM. *J Biol Chem.* 2006 Jan 20;281(3):1692-7. Epub 2005 Nov 17.

Dogan I, Cumaoglu A, Aricioglu A, Ekmekci A. Inhibition of ErbB2 by herceptin reduces viability and survival, induces apoptosis and oxidative stress in Calu-3 cell line. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jan;347(1-2):41-51. doi: 10.1007/s11010-010-0610-7. Epub 2010 Oct 10.

Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32377-9.

Dworet JH, Meinkoth JL. Interference with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein stimulates apoptosis through aberrant cell cycle progression and checkpoint activation. *Mol Endocrinol.* 2006 May;20(5):1112-20. Epub 2006 Jan 12.

Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol.* 1997 Jan;34(1):61-73.

Everett LJ, Le Lay J, Lukovac S, Bernstein D, Steger DJ, Lazar MA, Kaestner KH. Integrative genomic analysis of CREB defines a critical role for transcription factor networks in mediating the fed/fasted switch in liver. *BMC Genomics.* 2013 May 17;14:337. doi: 10.1186/1471-2164-14-337.

Fallahi M, Amelio AL, Cleveland JL, Rounbehler RJ. CREB targets define the gene expression signature of malignancies having reduced levels of the tumor suppressor tristetrarolin. *PLoS One.* 2014 Dec 26;9(12):e115517. doi: 10.1371/journal.pone.0115517. eCollection 2014.

Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:762825. doi: 10.1155/2012/762825. Epub 2012 May 13.

Finkbeiner S. Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Mar;57(3):394-401.

Fiol CJ, Williams JS, Chou CH, Wang QM, Roach PJ, Andrisani OM. A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem.* 1994 Dec 23;269(51):32187-93.

Fiordalisi JJ, Holly SP, Johnson RL 2nd, Parise LV, Cox AD. A distinct class of dominant negative Ras mutants: cytosolic GTP-bound Ras effector domain mutants that inhibit Ras signaling and transformation and enhance cell adhesion. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):10813-23. Epub 2002 Jan 17.

Fogh J, Trempe G In: *Human Tumor Cells In Vitro* (J. Fogh, ed.), Plenum, 1975, 115-141

Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, Menzies A, Teague JW, Futreal PA, Stratton MR. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet.* 2008 Apr;Chapter 10:Unit 10.11. doi: 10.1002/0471142905.hg1011s57.

Forwood JK, Lam MH, Jans DA. Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin-beta 1 and Ran but is independent of importin-alpha. *Biochemistry.* 2001 May 1;40(17):5208-17.

François F, Godinho MJ, Grimes ML. CREB is cleaved by caspases during neural cell apoptosis. *FEBS Lett.* 2000 Dec 15;486(3):281-4.

Frazier SB, Roodhouse KA, Hourcade DE, Zhang L. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open Glycosci.* 2008 Jan 1;1:31-39.

Fujiwara T, Kanazawa S, Ichibori R, Tanigawa T, Magome T, Shingaki K, Miyata S, Tohyama M, Hosokawa K. L-arginine stimulates fibroblast proliferation through the GPRC6A-ERK1/2 and PI3K/Akt pathway. *PLoS One.* 2014 Mar 20;9(3):e92168. doi: 10.1371/journal.pone.0092168. eCollection 2014.

Galardo MN, Riera MF, Regueira M, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Meroni SB. Different signal transduction pathways elicited by basic fibroblast growth factor and interleukin 1 β regulate CREB phosphorylation in Sertoli cells. *J Endocrinol Invest.* 2013 May;36(5):331-8. doi: 10.3275/8582. Epub 2012 Aug 29.

Garat CV, Fankell D, Erickson PF, Reusch JE, Bauer NN, McMurtry IF, Klemm DJ. Platelet-derived growth factor BB induces nuclear export and proteasomal degradation of CREB via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2006 Jul;26(13):4934-48.

Garrett JT, Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther.* 2011 May 1;11(9):793-800. Epub 2011 May 1.

Gatza ML, Kung HN, Blackwell KL, Dewhirst MW, Marks JR, Chi JT. Analysis of tumor environmental response and oncogenic pathway activation identifies distinct basal and luminal features in HER2-related breast tumor subtypes. *Breast Cancer Res.* 2011 Jun 7;13(3):R62. doi: 10.1186/bcr2899.

Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worrall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer.* 2007 Sep 3;97(5):646-53. Epub 2007 Aug 7.

Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem.* 1999 Sep 10;273(2):149-55.

Geryk-Hall M, Yang Y, Hughes DP. Driven to death: Inhibition of farnesylation increases Ras activity and promotes growth arrest and cell death [corrected]. *Mol Cancer Ther.* 2010 May;9(5):1111-9. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0833. Epub 2010 Apr 20.

Giebler HA, Lemasson I, Nyborg JK. p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4849-58.

Gobin SJ, Biesta P, de Steenwinkel JE, Datema G, van den Elsen PJ. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39525-31. Epub 2002 Aug 14.

Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W 3rd, Vale WW, Montminy MR. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature.* 1989 Feb 23;337(6209):749-52.

Grabowski J, Vazquez DE, Costantini T, Cauvi DM, Charles W, Bickler S, Talamini MA, Vega VL, Coimbra R, De Maio A. Tumor necrosis factor expression is ameliorated after exposure to an acidic environment. *J Surg Res.* 2012 Mar;173(1):127-34. doi: 10.1016/j.jss.2010.08.005. Epub 2010 Sep 27.

Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.* 2008 Sep;19(9):1523-9. doi: 10.1093/annonc/mdn169. Epub 2008 Apr 25.

Grutzmacher C, Park S, Elmergreen TL, Tang Y, Scheef EA, Sheibani N, Sorenson CM. Opposing effects of bim and bcl-2 on lung endothelial cell migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 Nov;299(5):L607-20. doi: 10.1152/ajplung.00390.2009. Epub 2010 Jul 23.

Gu T, Zhang Z, Wang J, Guo J, Shen WH, Yin Y. CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res.* 2011 Apr 15;71(8):2821-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3399. Epub 2011 Mar 8.

Guan H, Liang W, Liu J, Wei G, Li H, Xiu L, Xiao H, Li Y. Transmembrane protease serine 4 promotes thyroid cancer proliferation via CREB phosphorylation. *Thyroid.* 2015 Jan;25(1):85-94. doi: 10.1089/thy.2014.0155.

Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, Demchenko IT, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA. Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Neurosci.* 2008 Feb 27;28(9):2015-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5654-07.2008.

Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):725-31. doi: 10.1007/s10549-009-0674-9. Epub 2009 Dec 18.

Györfy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer, *PLoS One*, 2013 Dec 18;8(12):e82241. doi: 10.1371/journal.pone.0082241.

Hadad N, Tuval L, Elgazar-Carmom V, Levy R, Levy R. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2 α via both NF- κ B and CREB transcription factors. *J Immunol.* 2011 Feb 1;186(3):1816-27. doi: 10.4049/jimmunol.1000193. Epub 2011 Jan 3.

Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 1;88(9):3720-4.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):557-80.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):7111-6. Epub 2003 May 22.

Hansel DE, Swain E, Dreicer R, Tubbs RR. HER2 overexpression and amplification in urothelial carcinoma of the bladder is associated with MYC coamplification in a subset of cases. *Am J Clin Pathol.* 2008 Aug;130(2):274-81. doi: 10.1309/41VLTFX3YPP1HF6F.

Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 Dec;28(3):370-490.

Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, Sutter G, Hengstler J, Wollscheid U, Seliger B. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):215-20.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):179-83.

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*. 2011 Nov 15;71(22):6921-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.

Hjerpe R, Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Lang V, England P, Rodriguez MS. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep*. 2009 Nov;10(11):1250-8. doi: 10.1038/embor.2009.192. Epub 2009 Oct 2.

Holt SE, Wright WE, Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol*. 1996 Jun;16(6):2932-9.

Hsieh CY, Chen CA, Chou CH, Lai KP, Jeng YM, Kuo ML, Wei LH. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis. *J Biomed Sci*. 2004 Mar-Apr;11(2):249-59.

Huang W, Liu X, Cao J, Meng F, Li M, Chen B, Zhang J. miR-134 regulates ischemia/reperfusion injury-induced neuronal cell death by regulating CREB signaling. *J Mol Neurosci*. 2015 Apr;55(4):821-9. doi: 10.1007/s12031-014-0434-0. Epub 2014 Oct 16.

Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Oct;84(20):7159-63.

Ishiguro N, Brown GD, Meruelo D. Activation transcription factor 1 involvement in the regulation of murine H-2Dd expression. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):15993-6001.

Ishiguro N, Brown GD, Ishizu A, Meruelo D. The regulation of murine H-2Dd expression by activation transcription factor 1 and cAMP response element binding protein. *J Immunol*. 1998 Jun 15;160(12):5907-14.

Ishizu A, Sawai K, Ikeda H, Hirano T, Ishiguro N, Meruelo D. Transduction of a murine dominant negative activation transcription factor 1 increases cell surface expression of the class I MHC on a human epidermoid tumor cell line. *Int Immunol*. 2000 Feb;12(2):161-8.

Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, Heldin P. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors. *Int J Cancer*. 2002 Nov 20;102(3):212-9.

Jean D, Bar-Eli M. Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol Cell Biochem*. 2000 Sep;212(1-2):19-28.

Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, Yie SW, Eom SH, Kim PH. The PKA/CREB pathway is closely involved in VEGF expression in mouse macrophages. *Mol Cells*. 2007 Feb 28;23(1):23-9.

Ji P, Agrawal S, Diederichs S, Bäumer N, Becker A, Cauvet T, Kowski S, Beger C, Welte K, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. *Oncogene*. 2005 Apr 14;24(16):2739-44.

Jiang M, Li BX, Xie F, Delaney F, Xiao X. Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally constrained analogues of naphthol AS-E as inhibitors of CREB-mediated gene transcription. *J Med Chem.* 2012 Apr 26;55(8):4020-4. doi: 10.1021/jm300043c. Epub 2012 Apr 9.

Jin L, Li D, Lee JS, Elf S, Alesi GN, Fan J, Kang HB, Wang D, Fu H, Taunton J, Boggon TJ, Tucker M, Gu TL, Chen ZG, Shin DM, Khuri FR, Kang S. p90 RSK2 mediates antiancoikis signals by both transcription-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2013 Jul;33(13):2574-85. doi: 10.1128/MCB.01677-12. Epub 2013 Apr 22.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28.

Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? *Cell Signal.* 2004 Nov;16(11):1211-27.

Johannessen M, Moens U. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:1814-32.

Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, Narayan R, Flaherty KT, Wargo JA, Root DE, Garraway LA. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. *Nature.* 2013 Dec 5;504(7478):138-42. doi: 10.1038/nature12688. Epub 2013 Nov 3.

Kaleem A, Hoessli DC, Haq IU, Walker-Nasir E, Butt A, Iqbal Z, Zamani Z, Shakoori AR; Nasir-ud-Din. CREB in long-term potentiation in hippocampus: role of post-translational modifications-studies In silico. *J Cell Biochem.* 2011 Jan;112(1):138-46. doi: 10.1002/jcb.22909.

Kang Z, Zhu H, Luan H, Han F, Jiang W. Curculigoside A induces angiogenesis through VCAM-1/Egr-3/CREB/VEGF signaling pathway. *Neuroscience.* 2014 May 16;267:232-40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.050. Epub 2014 Mar 12.

Karvinen S, Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JM, Pienimäki JP, Törrönen K, Jokela TA, Tammi MI, Tammi R. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem.* 2003 Dec 5;278(49):49495-504. Epub 2003 Sep 23.

Keane M, Craig T, Alföldi J, Berlin AM, Johnson J, Seluanov A, Gorbunova V, Di Palma F, Lindblad-Toh K, Church GM, de Magalhães JP. The Naked Mole Rat Genome Resource: facilitating analyses of cancer and longevity-related adaptations. *Bioinformatics.* 2014 Dec 15;30(24):3558-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btu579. Epub 2014 Aug 28.

Khelwatty SA, Essapen S, Bagwan I, Green M, Seddon AM, Modjtahedi H. Co-expression of HER family members in patients with Dukes' C and D colon cancer and their impacts on patient prognosis and survival. *PLoS One.* 2014 Mar 7;9(3):e91139. doi: 10.1371/journal.pone.0091139. eCollection 2014.

Kim JW, Kim HP, Im SA, Kang S, Hur HS, Yoon YK, Oh DY, Kim JH, Lee DS, Kim TY, Bang YJ. The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2008 (a) Dec 18;272(2):296-306. doi: 10.1016/j.canlet.2008.07.018. Epub 2008 Sep 6.

Kim SJ, Nian C, Widenmaier S, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide-mediated up-regulation of beta-cell antiapoptotic Bcl-2 gene expression is coordinated by cyclic AMP (cAMP) response element binding protein (CREB) and cAMP-responsive CREB coactivator 2. *Mol Cell Biol.* 2008 (b) Mar;28(5):1644-56. Epub 2007 Dec 17.

Kim CK, Choi YK, Lee H, Ha KS, Won MH, Kwon YG, Kim YM. The farnesyltransferase inhibitor LB42708 suppresses vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by inhibiting ras-dependent mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathways. *Mol Pharmacol.* 2010 Jul;78(1):142-50. doi: 10.1124/mol.110.063586. Epub 2010 Apr 20.

Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M, Stieber P, Vernes JM, Gutierrez J, Hong K, Beryt M, Hepp H, Slamon DJ, Pegram MD. Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 1;10(5):1706-16.

Kwon YJ, Sun Y, Kim NH, Huh SO. Phosphorylation of CREB, a cyclic AMP responsive element binding protein, contributes partially to lysophosphatidic acid-induced fibroblast cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Mar 13;380(3):655-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.159. Epub 2009 Jan 29.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lavaud P, Andre F. Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: focus on new data from clinical trials. *BMC Med.* 2014 Aug 12;12:132. doi: 10.1186/s12916-014-0132-3.

Lee JS, Zhang X, Shi Y. Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):17666-74.

Lee J, Kim CH, Simon DK, Aminova LR, Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Lonze BE, Kim KS, Ginty DD, Ferrante RJ, Ryu H, Ratan RR. Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem.* 2005 Dec 9;280(49):40398-401. Epub 2005 Oct 5.

Lee JW, Park HS, Park SA, Ryu SH, Meng W, Jürgensmeier JM, Kurie JM, Hong WK, Boyer JL, Herbst RS, Koo JS. A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting CREB-CBP Complex Possesses Anti-Cancer Effects along with Cell Cycle Regulation, Autophagy Suppression and Endoplasmic Reticulum Stress. *PLoS One.* 2015 Apr 21;10(4):e0122628. doi: 10.1371/journal.pone.0122628. eCollection 2015.

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1976 Dec;36(12):4562-9.

Leigh-Brown S, Enriquez JA, Odom DT. Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria. *Genome Biol.* 2010;11(7):215. doi: 10.1186/gb-2010-11-7-215. Epub 2010 Jul 29.

Leonard MO, Howell K, Madden SF, Costello CM, Higgins DG, Taylor CT, McLoughlin P. Hypoxia selectively activates the CREB family of transcription factors in the in vivo lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Nov 1;178(9):977-83. doi: 10.1164/rccm.200712-1890OC. Epub 2008 Aug 8.

Lerner EC, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sebti SM. Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):26802-6.

Lerner EC, Zhang TT, Knowles DB, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM. Inhibition of the prenylation of K-Ras, but not H- or N-Ras, is highly resistant to CAAX peptidomimetics and requires both a farnesyltransferase and a geranylgeranyltransferase I inhibitor in human tumor cell lines. *Oncogene.* 1997 Sep;15(11):1283-8.

Li Y, Li L, Brown TJ, Heldin P. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2007 Jun 15;120(12):2557-67.

Li BX, Xiao X. Discovery of a small-molecule inhibitor of the KIX-KID interaction. *Chembiochem.* 2009 Nov 23;10(17):2721-4. doi: 10.1002/cbic.200900552.

Li BX, Yamanaka K, Xiao X. Structure-activity relationship studies of naphthol AS-E and its derivatives as anticancer agents by inhibiting CREB-mediated gene transcription. *Bioorg Med Chem.* 2012 Dec 1;20(23):6811-20. doi: 10.1016/j.bmc.2012.09.056. Epub 2012 Oct 4.

Liang S, Mele J, Wu Y, Buffenstein R, Hornsby PJ. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Aging Cell.* 2010 Aug;9(4):626-35. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00588.x. Epub 2010 Jun 9.

Liao J, Wolfman JC, Wolfman A. K-ras regulates the steady-state expression of matrix metalloproteinase 2 in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31871-8. Epub 2003 Jun 12.

Linnerth NM, Baldwin M, Campbell C, Brown M, McGowan H, Moorehead RA. IGF-II induces CREB phosphorylation and cell survival in human lung cancer cells. *Oncogene.* 2005 Nov 10;24(49):7310-9.

Liu W, Wu Y, Wang L, Gao L, Wang Y, Liu X, Zhang K, Song J, Wang H, Bayer TA, Glaser L, Sun Y, Zhang W, Cutaia M, Zhang DY, Ye F. Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis. *Am J Cancer Res.* 2014 May 26;4(3):256-69. eCollection 2014.

Lin XP, Feng L, Xie CG, Chen DB, Pei Z, Liang XL, Xie QY, Li XH, Pan SY. Valproic acid attenuates the suppression of acetyl histone H3 and CREB activity in an inducible cell model of Machado-Joseph disease. *Int J Dev Neurosci.* 2014 Nov;38:17-22. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.07.004. Epub 2014 Jul 25.

Liu Y, Zhao Z, Yang F, Gao Y, Song J, Wan Y. microRNA-181a is involved in insulin-like growth factor-1-mediated regulation of the transcription factor CREB1. *J Neurochem.* 2013 Sep;126(6):771-80. doi: 10.1111/jnc.12370. Epub 2013 Aug 6.

Lochner A, Moolman JA. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006 Fall-Winter;24(3-4):261-74.

Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron.* 2002 Apr 25;34(3):371-85.

Loriaux MM, Brennan RG, Goodman RH. Modulatory function of CREB·CREM α heterodimers depends upon CREM α phosphorylation. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28839-43.

Makkonen KM, Pasonen-Seppänen S, Törrönen K, Tammi MI, Carlberg C. Regulation of the hyaluronan synthase 2 gene by convergence in cyclic AMP response element-binding protein and retinoid acid receptor signaling. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18270-81. doi: 10.1074/jbc.M109.012492. Epub 2009 May 5.

Malla R, Gopinath S, Alapati K, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Mohanam S, Rao JS. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13731. doi: 10.1371/journal.pone.0013731.

Martin AP, Miller A, Emad L, Rahmani M, Walker T, Mitchell C, Hagan MP, Park MA, Yacoub A, Fisher PB, Grant S, Dent P. Lapatinib resistance in HCT116 cells is mediated by elevated MCL-1 expression and decreased BAK activation and not by ERBB receptor kinase mutation. *Mol Pharmacol.* 2008 Sep;74(3):807-22. doi: 10.1124/mol.108.047365. Epub 2008 Jun 10.

Maruyama T, Mimura K, Sato E, Watanabe M, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Ando T, Kinouchi H, Fujii H, Kono K. Inverse correlation of HER2 with MHC class I expression on oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2010 Aug 10;103(4):552-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605772. Epub 2010 Jul 13.

Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25184-9. Epub 2001 May 2.

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):599-609.

Medina PJ, Goodin S. Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clin Ther.* 2008 Aug;30(8):1426-47. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.08.008.

Melnikova VO, Dobroff AS, Zigler M, Villares GJ, Braeuer RR, Wang H, Huang L, Bar-Eli M. CREB inhibits AP-2alpha expression to regulate the malignant phenotype of melanoma. *PLoS One.* 2010 Aug 27;5(8):e12452. doi: 10.1371/journal.pone.0012452.

Mimura K, Ando T, Poschke I, Mougiakakos D, Johansson CC, Ichikawa J, Okita R, Nishimura MI, Handke D, Krug N, Choudhury A, Seliger B, Kiessling R. T cell recognition of HLA-A2 restricted tumor antigens is impaired by the oncogene HER2. *Int J Cancer.* 2011 Jan 15;128(2):390-401. doi: 10.1002/ijc.25613. Epub 2010 Oct 13.

Misra UK, Akabani G, Pizzo SV. The role of cAMP-dependent signaling in receptor-recognized forms of alpha 2-macroglobulin-induced cellular proliferation. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36509-20. Epub 2002 Jul 11.

Moll JR, Acharya A, Gal J, Mir AA, Vinson C. Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 1;30(5):1240-6.

Møller, H.J., Poulsen, J.H. 2002 Staining of Glycoproteins/Proteoglycans in SDS-Gels. In: *The Protein Protocols Handbook*, 2nd Edition. Walker, J.M (Hrg.). Humana Press Inc., Totowa, NJ

Montminy MR, Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature.* 1987 Jul 9-15;328(6126):175-8.

Moon A, Kim MS, Kim TG, Kim SH, Kim HE, Chen YQ, Kim HR. H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. *Int J Cancer*. 2000 Jan 15;85(2):176-81.

Morgan MA, Ganser A, Reuter CW. Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003 Aug;17(8):1482-98.

Morishita K, Johnson DE, Williams LT. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27948-53.

Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*. 1985 Apr 20;116(16):431-6.

Mouravlev A, Young D, During MJ. Phosphorylation-dependent degradation of transgenic CREB protein initiated by heterodimerization. *Brain Res*. 2007 Jan 26;1130(1):31-7. Epub 2006 Dec 13.

Mu J, Krafft PR, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand? *Med Gas Res*. 2011 Jun 27;1(1):14. doi: 10.1186/2045-9912-1-14.

Muchardt C, Li C, Kornuc M, Gaynor R. CREB regulation of cellular cyclic AMP-responsive and adenovirus early promoters. *J Virol*. 1990 Sep;64(9):4296-305.

Nakayama K. cAMP-response element-binding protein (CREB) and NF- κ B transcription factors are activated during prolonged hypoxia and cooperatively regulate the induction of matrix metalloproteinase MMP1. *J Biol Chem*. 2013 Aug 2;288(31):22584-95. doi: 10.1074/jbc.M112.421636. Epub 2013 Jun 17.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988 Jun;9(6):255-62.

Nichols M, Weih F, Schmid W, DeVack C, Kowenz-Leutz E, Luckow B, Boshart M, Schütz G. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J*. 1992 Sep;11(9):3337-46.

Nomura T, Huang WC, Zhau HE, Wu D, Xie Z, Mimata H, Zayzafoon M, Young AN, Marshall FF, Weitzmann MN, Chung LW. Beta2-microglobulin promotes the growth of human renal cell carcinoma through the activation of the protein kinase A, cyclic AMP-responsive element-binding protein, and vascular endothelial growth factor axis. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 15;12(24):7294-305.

Okoshi R, Ando K, Suenaga Y, Sang M, Kubo N, Kizaki H, Nakagawara A, Ozaki T. Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation. *Genes Cells*. 2009 Dec;14(12):1429-40. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01359.x. Epub 2009 Nov 20.

Oliva JL, Zarich N, Martínez N, Jorge R, Castrillo A, Azañedo M, García-Vargas S, Gutiérrez-Eisman S, Juarranz A, Boscá L, Gutkind JS, Rojas JM. The P34G mutation reduces the transforming activity of K-Ras and N-Ras in NIH 3T3 cells but not of H-Ras. *J Biol Chem*. 2004 Aug 6;279(32):33480-91. Epub 2004 Jun 4.

O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol.* 2005 Nov-Dec;7(6):388-92.

Ono H, Ichiki T, Fukuyama K, Iino N, Masuda S, Egashira K, Takeshita A. cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Sep;24(9):1634-9. Epub 2004 Jul 8.

O'Reilly SM, Leonard MO, Kieran N, Comerford KM, Cummins E, Pouliot M, Lee SB, Taylor CT. Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Feb;290(2):C592-600. Epub 2005 Oct 5.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer.* 2004 Apr;5(1):63-9.

Özgen N, Guo J, Gertsberg Z, Danilo P Jr, Rosen MR, Steinberg SF. Reactive oxygen species decrease cAMP response element binding protein expression in cardiomyocytes via a protein kinase D1-dependent mechanism that does not require Ser133 phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 2009 Oct;76(4):896-902. doi: 10.1124/mol.109.056473. Epub 2009 Jul 20.

Papa S, Rasmussen DD, Technikova-Dobrova Z, Panelli D, Signorile A, Scacco S, Petruzzella V, Papa F, Palmisano G, Gnoni A, Micelli L, Sardanelli AM. Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett.* 2012 Mar 9;586(5):568-77. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.019. Epub 2011 Sep 19.

Papavassiliou AG. The CREB/ATF family of transcription factors: modulation by reversible phosphorylation. *Anticancer Res.* 1994 Sep-Oct;14(5A):1801-5.

Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature.* 1982 Jun 10;297(5866):474-8.

Parcej D, Tampé R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition *Nature Chemical Biology* 6, 572–580 2010 doi:10.1038/nchembio.410.

Park B, Ahn K. An essential function of tapasin in quality control of HLA-G molecules. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14337-45. Epub 2003 Feb 11.

Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, Hoffmann A, Montminy M, Karin M. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity.* 2005 Sep;23(3):319-29.

Park JK, Park SH, So K, Bae IH, Yoo YD, Um HD. ICAM-3 enhances the migratory and invasive potential of human non-small cell lung cancer cells by inducing MMP-2 and MMP-9 via Akt and CREB. *Int J Oncol.* 2010 Jan;36(1):181-92.

Pellegrini M, Cheng JC, Voutilainen J, Judelson D, Taylor J, Nelson SF, Sakamoto KM. Expression profile of CREB knockdown in myeloid leukemia cells. *BMC Cancer.* 2008 Sep 18;8:264. doi: 10.1186/1471-2407-8-264.

Phuong NT, Lim SC, Kim YM, Kang KW. Aromatase induction in tamoxifen-resistant breast cancer: Role of phosphoinositide 3-kinase-dependent CREB activation. *Cancer Lett.* 2014 Aug 28;351(1):91-9. doi: 10.1016/j.canlet.2014.05.003. Epub 2014 May 13.

Pigazzi M, Manara E, Baron E, Basso G. miR-34b targets cyclic AMP-responsive element binding protein in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2009 Mar 15;69(6):2471-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3404. Epub 2009 Mar 3.

Pigazzi M, Manara E, Bresolin S, Tregnago C, Beghin A, Baron E, Giarin E, Cho EC, Masetti R, Rao DS, Sakamoto KM, Basso G. MicroRNA-34b promoter hypermethylation induces CREB overexpression and contributes to myeloid transformation. *Haematologica.* 2013 Apr;98(4):602-10. doi: 10.3324/haematol.2012.070664. Epub 2012 Oct 25.

Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 1996 May 15;15(10):2452-67.

Pins GD, Collins-Pavao ME, Van De Water L, Yarmush ML, Morgan JR. Plasmin triggers rapid contraction and degradation of fibroblast-populated collagen lattices. *J Invest Dermatol.* 2000 Apr;114(4):647-53.

Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol.* 2003 Jan 20;160(2):165-70. Epub 2003 Jan 13.

Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *Biol Chem.* 2000 Apr 14;275(15):10761-6.

Pugazhenth S, Nesterova A, Jambal P, Audesirk G, Kern M, Cabell L, Eves E, Rosner MR, Boxer LM, Reusch JE. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2003 Mar;84(5):982-96.

Pulciani S, Santos E, Long LK, Sorrentino V, Barbacid M. ras gene Amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol.* 1985 Oct;5(10):2836-41.

Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res.* 1979 Dec;39(12):4914-24.

Quinn PG. Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J Biol Chem.* 1993 Aug 15;268(23):16999-7009.

Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol.* 1999;112:9-19.

Ransone LJ, Wamsley P, Morley KL, Verma IM. Domain swapping reveals the modular nature of Fos, Jun, and CREB proteins. *Mol Cell Biol.* 1990 Sep;10(9):4565-73.

Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2015 May;15(5):290-301. doi: 10.1038/nrc3911. Epub 2015 Apr 16.

Recktenwald CV, Mendler S, Lichtenfels R, Kellner R, Seliger B. Influence of Ki-ras-driven oncogenic transformation on the protein network of murine fibroblasts. *Proteomics.* 2007 Feb;7(3):385-98.

Recktenwald CV, Kellner R, Lichtenfels R, Seliger B. Altered detoxification status and increased resistance to oxidative stress by K-ras transformation. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10086-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0360.

Recktenwald, CV. Proteomanalysen zur Identifizierung K-RAS-modulierter Zielstrukturen im in vitro-Modell der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3. 2009 Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Rehm, H. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.* 2006 Springer Akademischer Verlag.

Rhee SH, Ma EL, Lee Y, Taché Y, Pothoulakis C, Im E. Corticotropin Releasing Hormone and Urocortin 3 Stimulate Vascular Endothelial Growth Factor Expression through the cAMP/CREB Pathway. *J Biol Chem.* 2015 Oct 23;290(43):26194-203. doi: 10.1074/jbc.M115.678979. Epub 2015 Sep 8.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp.* 2011 Apr 24;(50). pii: 2597. doi: 10.3791/2597.

Riemann A, Schneider B, Ihling A, Nowak M, Sauvant C, Thews O, Gekle M. Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells. *PLoS One.* 2011;6(7):e22445. doi: 10.1371/journal.pone.0022445. Epub 2011 Jul 26.

Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, Rozenberg J, Zhao J, Glass K, Fitzgerald P, Vinson C. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBPalpha binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 23;107(47):20311-6. doi: 10.1073/pnas.1008688107. Epub 2010 Nov 8.

Robert-Koch-Institut, 2015, Zentrum für Krebsregisterdaten, Brustkrebs http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (Zugriff vom 3.12.2015)

Robles-Martínez L, Guerra-Sánchez MG, Flores-Herrera O, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-Del Valle MG, Pardo JP. The mitochondrial respiratory chain of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Arch Microbiol.* 2013 Jan;195(1):51-61. doi: 10.1007/s00203-012-0845-7. Epub 2012 Oct 12.

Roy S, Wyse B, Hancock JF. H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(14):5128-40.

Rozenberg J, Rishi V, Orosz A, Moitra J, Glick A, Vinson C. Inhibition of CREB function in mouse epidermis reduces papilloma formation. *Mol Cancer Res.* 2009 May;7(5):654-64. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0011. Epub 2009 May 12.

Ruas JL, Berchner-Pfannschmidt U, Malik S, Gradin K, Fandrey J, Roeder RG, Pereira T, Poellinger L. Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* 2010 Jan 22;285(4):2601-9. doi: 10.1074/jbc.M109.021824. Epub 2009 Oct 30.

Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S3-8.

Ryu H, Lee J, Impey S, Ratan RR, Ferrante RJ. Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13915-20. Epub 2005 Sep 16.

Saeki K, Yuo A, Takaku F. Cell-cycle-regulated phosphorylation of cAMP response element-binding protein: identification of novel phosphorylation sites. *Biochem J*. 1999 Feb 15;338 (Pt 1):49-54.

Saji M, Shong M, Napolitano G, Palmer LA, Taniguchi SI, Ohmori M, Ohta M, Suzuki K, Kirshner SL, Giuliani C, Singer DS, Kohn LD. Regulation of major histocompatibility complex class I gene expression in thyroid cells. Role of the cAMP response element-like sequence. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20096-107.

Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2583-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1137. Epub 2009 Apr 7.

Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711. Epub 2010 Feb 15.

Satpathy M, Shao M, Emerson R, Donner DB, Matei D. Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5;284(23):15390-9. doi: 10.1074/jbc.M808331200. Epub 2009 Mar 26.

Schägger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 1991 Dec;199(2):223-31.

Schiffer IB, Gebhard S, Heimerdinger CK, Heling A, Hast J, Wollscheid U, Seliger B, Tanner B, Gilbert S, Beckers T, Baasner S, Brenner W, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Schreiber WG, Zabel B, Thelen M, Lehr HA, Oesch F, Hengstler JG. Switching off HER-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission. *Cancer Res*. 2003 Nov 1;63(21):7221-31.

Schiller M, Dennler S, Anderegg U, Kokot A, Simon JC, Luger TA, Mauviel A, Böhm M. Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-beta/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):409-21. doi: 10.1074/jbc.M109.038620. Epub 2009 Oct 26.

Schmick M, Vartak N, Papke B, Kovacevic M, Truxius DC, Rossmannek L, Bastiaens PI. KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell*. 2014 Apr 10;157(2):459-71. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.051.

Schroeder RL, Stevens CL, Sridhar J. Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer. *Molecules*. 2014 Sep 23;19(9):15196-212. doi: 10.3390/molecules190915196.

Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem*. 2000 Nov 10;275(45):35242-7.

Seliger B, Kruppa G, Schäfer R, Redmond SM, Pfizenmaier K. Gamma interferon regulates long terminal repeat-controlled oncogene expression in transformed mouse fibroblasts at the level of mRNA transcription. *J Virol.* 1988 Feb;62(2):619-21.

Seliger B, Kiessling R. The two sides of HER2/neu: immune escape versus surveillance. *Trends Mol Med.* 2013 Nov;19(11):677-84. doi: 10.1016/j.molmed.2013.08.003. Epub 2013 Sep 12.

Semple TU, Quinn LA, Woods LK, Moore GE. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res.* 1978 May;38(5):1345-55.

Sennerstam R, Auer G. Partition of protein and DNA during cytokinesis in human breast cancer cell lines. *Cytometry.* 1990;11(2):292-9.

Seo HS, Liu DD, Bekele BN, Kim MK, Pisters K, Lippman SM, Wistuba II, Koo JS. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6065-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5376.

Seo AN, Kwak Y, Kim DW, Kang SB, Choe G, Kim WH, Lee HS. HER2 status in colorectal cancer: its clinical significance and the relationship between HER2 gene amplification and expression. *PLoS One.* 2014 May 30;9(5):e98528. doi: 10.1371/journal.pone.0098528. eCollection 2014.

Seternes OM, Sørensen R, Johansen B, Moens U. Activation of protein kinase A by dibutyryl cAMP treatment of NIH 3T3 cells inhibits proliferation but fails to induce Ser-133 phosphorylation and transcriptional activation of CREB. *Cell Signal.* 1999 Mar;11(3):211-9.

Shankar DB, Cheng JC, Sakamoto KM. Role of cyclic AMP response element binding protein in human leukemias. *Cancer.* 2005 Nov 1;104(9):1819-24.

Shanware NP, Williams LM, Bowler MJ, Tibbetts RS. Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190. *BMB Rep.* 2009 Mar 31;42(3):142-7.

Shanware NP, Zhan L, Hutchinson JA, Kim SH, Williams LM, Tibbetts RS. Conserved and distinct modes of CREB/ATF transcription factor regulation by PP2A/B56gamma and genotoxic stress. *PLoS One.* 2010 Aug 13;5(8):e12173. doi: 10.1371/journal.pone.0012173.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.

She H, Yang Q, Shepherd K, Smith Y, Miller G, Testa C, Mao Z. Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients. *J Clin Invest.* 2011 Mar;121(3):930-40. doi: 10.1172/JCI43871.

Sherwin SA, Minna JD, Gazdar AF, Todaro GJ. Expression of epidermal and nerve growth factor receptors and soft agar growth factor production by human lung cancer cells. *Cancer Res.* 1981 Sep;41(9 Pt 1):3538-42.

Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):5898-903. Epub 2004 Apr 8.

Singh R, Shankar BS, Sainis KB. TGF- β 1-ROS-ATM-CREB signaling axis in macrophage mediated migration of human breast cancer MCF7 cells. *Cell Signal*. 2014 Jul;26(7):1604-15. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.03.028. Epub 2014 Apr 3.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Smith B, Fang H, Pan Y, Walker PR, Famili AF, Sikorska M. Evolution of motif variants and positional bias of the cyclic-AMP response element. *BMC Evol Biol*. 2007 Feb 8;7 Suppl 1:S15.

Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005 Jan;38(1):73-83.

Somlo G, Martel CL, Lau SK, Frankel P, Ruel C, Gu L, Hurria A, Chung C, Luu T, Morgan R Jr, Leong L, Koczywas M, McNamara M, Russell CA, Kane SE. A phase I/II prospective, single arm trial of gefitinib, trastuzumab, and docetaxel in patients with stage IV HER-2 positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb;131(3):899-906. doi: 10.1007/s10549-011-1850-2. Epub 2011 Nov 1.

Son J, Lee JH, Kim HN, Ha H, Lee ZH. cAMP-response-element-binding protein positively regulates breast cancer metastasis and subsequent bone destruction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 23;398(2):309-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.087. Epub 2010 Jun 25.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1409-16.

Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*. 1982 May;29(1):53-60.

Stehle F, Leisz S, Schulz K, Schwurack N, Weber N, Massa C, Kalich J, Fahldieck C, Seliger B. VHL-dependent alterations in the secretome of renal cell carcinoma: Association with immune cell response? *Oncotarget*. 2015 Oct 12. doi: 10.18632/oncotarget.5560. [Epub ahead of print]

Steven A, Leisz S, Massa C, Iezzi M, Lattanzio R, Lamolinara A, Bukur J, Müller A, Hiebl B, Holzhausen HJ, Seliger B. HER-2/neu mediates oncogenic transformation via altered CREB expression and function. *Mol Cancer Res*. 2013 Nov;11(11):1462-77. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0125. Epub 2013 Sep 11.

Steven A, Heiduk M, Recktenwald CV, Hiebl B, Wickenhauser C, Massa C, Seliger B. Colorectal Carcinogenesis: Connecting K-RAS-Induced Transformation and CREB Activity In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Res*. 2015 Aug;13(8):1248-62. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0590. Epub 2015 May 1.

Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. 2016 (a) Jun 7;7(23):35454-65. doi: 10.18632/oncotarget.7721.

Steven A, Leisz S, Sychra K, Hiebl B, Wickenhauser C, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Hypoxia-mediated alterations and their role in the HER-2-neu-regulated CREB status and localization. *Oncotarget*. 2016 (b) Aug 9;7(32):52061-52084. doi: 10.18632/oncotarget.10474.

Suarez CD, Deng X, Hu CD. Targeting CREB inhibits radiation-induced neuroendocrine differentiation and increases radiation-induced cell death in prostate cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2014 Nov 19;4(6):850-61. eCollection 2014.

Sun B, Rong R, Jiang H, Zhang H, Wang Y, Bai X, Zhang M, Ma J, Xia S, Shu W, Zhang L, Leng J. Prostaglandin E2 receptor EP1 phosphorylate CREB and mediates MMP2 expression in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2013 Jun;378(1-2):195-203. doi: 10.1007/s11010-013-1610-1. Epub 2013 Mar 15.

Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M. The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature*. 1984 Sep 20-26;311(5983):273-5.

Szczepanek K, Lesnefsky EJ, Larner AC. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol*. 2012 Aug;22(8):429-37. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.001. Epub 2012 Jun 14.

Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2770-5. doi: 10.1073/pnas.0807694106. Epub 2009 Feb 5.

Tan X, Wang S, Yang B, Zhu L, Yin B, Chao T, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. The CREB-miR-9 negative feedback minicircuitry coordinates the migration and proliferation of glioma cells. *PLoS One*. 2012(a);7(11):e49570. doi: 10.1371/journal.pone.0049570. Epub 2012 Nov 20.

Tan X, Wang S, Zhu L, Wu C, Yin B, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. cAMP response element-binding protein promotes gliomagenesis by modulating the expression of oncogenic microRNA-23a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012(b) Sep 25;109(39):15805-10. Epub 2012 Sep 10.

Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt K, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):12091-6.

Thakur JK, Yadav A, Yadav G. Molecular recognition by the KIX domain and its role in gene regulation. *Nucleic Acids Res*. 2014 Feb;42(4):2112-25. doi: 10.1093/nar/gkt1147. Epub 2013 Nov.

Than TA, Lou H, Ji C, Win S, Kaplowitz N. Role of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator 3 (CRTC3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):22047-54. doi: 10.1074/jbc.M111.240481. Epub 2011 May 2.

Thomas X, Elhamri M. Tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukemia. *Biologics*. 2007 Dec;1(4):415-24.

Thuring C, Follin E, Geironson L, Freyhult E, Junghans V, Harndahl M, Buus S, Paulsson KM. HLA class I is most tightly linked to levels of tapasin compared with other antigen-processing proteins in glioblastoma. *Br J Cancer*. 2015 Sep 15;113(6):952-62. doi: 10.1038/bjc.2015.297. Epub 2015 Aug 27.

Tian X, Azpurua J, Hine C, Vaidya A, Myakishev-Rempel M, Ablueva J, Mao Z, Nevo E, Gorbunova V, Seluanov A. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature*. 2013 Jul 18;499(7458):346-9. doi: 10.1038/nature12234. Epub 2013 Jun 19.

Tietz A, Ochoa S. Fluorokinase and pyruvic kinase. *Arch Biochem Biophys*. 1958 Dec;78(2):477-93.

Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 1963 May;17:299-313.

Togo T, Alderton JM, Steinhardt RA. Long-term potentiation of exocytosis and cell membrane repair in fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2003 Jan;14(1):93-106.

Towne CF, York IA, Neijssen J, Karow ML, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Neefjes JJ, Rock KL. Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1704-12.

Trahey M, McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*. 1987 Oct 23;238(4826):542-5.

Triebel S, Bläser J, Reinke H, Tschesche H. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett*. 1992 Dec 21;314(3):386-8.

Tsimberidou AM, Chandhasin C, Kurzrock R. Farnesyltransferase inhibitors: where are we now? *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Dec;19(12):1569-80. doi: 10.1517/13543784.2010.535516. Epub 2010 Nov 18.

Valsecchi F, Ramos-Espiritu LS, Buck J, Levin LR, Manfredi G. cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)*. 2013 May;28(3):199-209. doi: 10.1152/physiol.00004.2013.

van der Sligte NE, Kampen KR, ter Elst A, Scherpen FJ, Meeuwssen-de Boer TG, Guryev V, van Leeuwen FN, Kornblau SM, de Bont ES. Essential role for cyclic-AMP responsive element binding protein 1 (CREB) in the survival of acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):14970-81.

Vankoningsloo S, De Pauw A, Houbion A, Tejerina S, Demazy C, de Longueville F, Bertholet V, Renard P, Remacle J, Holvoet P, Raes M, Arnould T. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*. 2006 Apr 1;119(Pt 7):1266-82. Epub 2006 Mar 14.

Vinson CR, Hai T, Boyd SM. Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev*. 1993 Jun;7(6):1047-58.

Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays*. 2008 Apr;30(4):314-27. doi: 10.1002/bies.20734.

Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):17164-70.

Wang P, Xu J, Zhang C. CREB, a possible upstream regulator of Bcl-2 in trichosanthin-induced HeLa cell apoptosis. *Mol Biol Rep.* 2010 Apr;37(4):1891-6. doi: 10.1007/s11033-009-9629-9. Epub 2009 Jul 21.

Wang F, Marshall CB, Ikura M. Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Nov;70(21):3989-4008. doi: 10.1007/s00018-012-1254-4. Epub 2013 Jan 11.

Wang X, Ren Y, Zhuang H, Meng X, Huang S, Li Y, Hehir M, Wang P. Decrease of phosphorylated proto-oncogene CREB at Ser 133 site inhibits growth and metastatic activity of renal cell cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Jul;19(7):985-95. doi: 10.1517/14728222.2015.1053208. Epub 2015 Jun 3.

Ward C, Langdon SP, Mullen P, Harris AL, Harrison DJ, Supuran CT, Kunkler IH. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013 Apr;39(2):171-9. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.08.004. Epub 2012 Oct 12.

Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol.* 2010 Dec 1;185(11):6413-9. doi: 10.4049/jimmunol.1001829.

Westbom CM, Shukla A, MacPherson MB, Yasewicz EC, Miller JM, Beuschel SL, Steele C, Pass HI, Vacek PM, Shukla A. CREB-induced inflammation is important for malignant mesothelioma growth. *Am J Pathol.* 2014 Oct;184(10):2816-27. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.06.008. Epub 2014 Aug 8.

Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010 Jan;5(1):51-66. doi: 10.1038/nprot.2009.197. Epub 2009 Dec 17.

Whelan KA, Schwab LP, Karakashev SV, Franchetti L, Johannes GJ, Seagroves TN, Reginato MJ. The oncogene HER2/neu (ERBB2) requires the hypoxia-inducible factor HIF-1 for mammary tumor growth and anoikis resistance. *J Biol Chem.* 2013 May 31;288(22):15865-77. doi: 10.1074/jbc.M112.426999. Epub 2013 Apr 12.

Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN, Nunez-Oliva I, James L, Catino JJ, Bishop WR, Pai JK. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):14459-64.

Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1582-90. doi: 10.1038/nprot.2009.151. Epub 2009 Oct 8.

Williams JS, Dixon JE, Andrisani OM. Binding constant determination studies utilizing recombinant delta CREB protein. *DNA Cell Biol.* 1993 Mar;12(2):183-90.

Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm.* 2011 Dec 5;8(6):2032-8. doi: 10.1021/mp200292c. Epub 2011 Oct 26.

Wu X, Spiro C, Owen WG, McMurray CT. cAMP response element-binding protein monomers cooperatively assemble to form dimers on DNA. *J Biol Chem.* 1998 Aug 14;273(33):20820-7.

Wu D, Zhau HE, Huang WC, Iqbal S, Habib FK, Sartor O, Cvitanovic L, Marshall FF, Xu Z, Chung LW. cAMP-responsive element-binding protein regulates vascular endothelial growth factor expression: implication in human prostate cancer bone metastasis. *Oncogene*. 2007 Aug 2;26(35):5070-7. Epub 2007 Feb 19.

Xie S, Price JE, Luca M, Jean D, Ronai Z, Bar-Eli M. Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997 Oct 23;15(17):2069-75.

Xie F, Li BX, Broussard C, Xiao X. Identification, synthesis and evaluation of substituted benzofurazans as inhibitors of CREB-mediated gene transcription. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Oct 1;23(19):5371-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.07.053. Epub 2013 Jul 31.

Xiao X, Li BX, Mitton B, Ikeda A, Sakamoto KM. Targeting CREB for cancer therapy: friend or foe. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Jun;10(4):384-91.

Xing L, Gopal VK, Quinn PG. cAMP response element-binding protein (CREB) interacts with transcription factors IIB and IID. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17488-93.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37.

Yun YD, Dumoulin M, Habener JF. DNA-binding and dimerization domains of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-responsive protein CREB reside in the carboxyl-terminal 66 amino acids. *Mol Endocrinol*. 1990 Jun;4(6):931-9.

Zagouri F, Sergantani TN, Chrysikos D, Zografos CG, Filipits M, Bartsch R, Dimopoulos MA, Psaltopoulou T. Pertuzumab in breast cancer: a systematic review. *Clin Breast Cancer*. 2013 Oct;13(5):315-24. doi: 10.1016/j.clbc.2013.05.002. Epub 2013 Jun 27.

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4459-64. Epub 2005 Mar 7.

Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang HY, Yu J, Wang-Rodriguez J, Tang L, Chen G, Basak GW, Kipps TJ. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth. *PLoS One*. 2012;7(3):e31127. doi: 10.1371/journal.pone.0031127. Epub 2012 Mar 5.

Zhang J, Ye J, Ma D, Liu N, Wu H, Yu S, Sun X, Tse W, Ji C. Cross-talk between leukemic and endothelial cells promotes angiogenesis by VEGF activation of the Notch/Dll4 pathway. *Carcinogenesis*. 2013 Mar;34(3):667-77. doi: 10.1093/carcin/bgs386. Epub 2012 Dec 13.

Zimmer SN, Lemieux ME, Karia BP, Day C, Zhou T, Zhou Q, Kung AL, Suresh U, Chen Y, Kinney MC, Bishop AJ, Rebel VI. Mice heterozygous for CREB binding protein are hypersensitive to γ -radiation and invariably develop myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm. *Exp Hematol*. 2012 Apr;40(4):295-306.e5. doi: 10.1016/j.exphem.2011.12.004. Epub 2011 Dec 20.

Zuo J, Ishikawa T, Boutros S, Xiao Z, Humtsoe JO, Kramer RH. Bcl-2 overexpression induces a partial epithelial to mesenchymal transition and promotes squamous carcinoma cell invasion and metastasis. *Mol Cancer Res*. 2010 Feb;8(2):170-82. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0354. Epub 2010 Feb 9.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Außerdem habe ich die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

André Steven

Halle (Saale), den 19.01.2016

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit vom September 2009 bis Oktober 2015 am Institut für Medizinische Immunologie unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Barbara Seliger entstanden. In dieser Zeit habe ich eine großartige Unterstützung erfahren und möchte den folgenden Personen für ihre hilfreichen Ratschläge und Ideen danken.

Ich möchte Frau Prof. Barbara Seliger für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung der Realisierung eigener Ideen und die wissenschaftliche Freiheit, neue Methoden im Labor zu etablieren, danken. Ihre fördernde und auch fordernde Anleitung trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn PD Dr. Ralph Golbik danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. Carsten Denkert danke ich ebenfalls für die Übernahme des Gutachtens sowie für die Bereitstellung der immunhistochemischen Bilder.

Den Post-Doktoranden des Institutes für Medizinische Immunologie, v.a. Dr. Jürgen Bukur danke ich für die ausführlichen Gespräche, die Mentorentätigkeit und die stets offenen Ohren für alle Laborproblemlagen. Frau Dr. Dagmar Riemann danke ich ferner für die unkomplizierten und geduldigen Erklärungen bezüglich der Durchflusszytometrie sowie für die Sortierung der Zellen. Bei Frau Dr. Chiara Massa bedanke ich mich für die Analyse von Mäuseblut auf Leukozyten.

Allen TAs, Diplomanden, Doktoranden, Studenten und Sekretärinnen v.a. Nicole und Simon danke ich für die angenehme Labor- und Büroatmosphäre und die tolle Zeit zusammen. Ein besonderer Dank gilt meiner fast stetigen Ko-Autorin Sandra für die Unterstützung bei den Tierversuchen, dem regen wissenschaftlichen Austausch, die ermunternden Worte, sowie für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Kristin danke ich für die Unterstützung bei den 2D-Gelen. Ebenfalls danke ich Rudi, Claudia und Jette von R.103 für die lustige und immer angenehme (Büro-)Atmosphäre und den fruchtbaren Austausch. Ich hoffe noch auf einige gemeinsame Jahre!

Meinen Bachelorstudenten Isabel, Max und Henrik, meiner Praktikantin Sarah und meinen Medizindoktoranden Lisa und Tobias danke ich für die gemeinsame Zeit und die erfolgreichen Projekte.

Herrn Dr. Hiebl und den Tierpflegerinnen, v.a. Conny und Martina danke ich für die unkomplizierten Gespräche und die stetigen Arbeiten mit den Tieren.

Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser und ihren Mitarbeitern vom Institut für Pathologie danke ich für die Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, den molekularbiologischen Charakterisierungen und der Bereitstellung der klinischen Daten.

Ebenso danke ich Frau Dr. Manuela Iezzi vom CESI in Chieti, Italien für die Bereitstellung der Brustkrebsdaten.

Der Roux-Forschungsgruppe „CREB und Signaltransduktion“ danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen in der Anfangszeit dieser Dissertation sowie für die Finanzierung der ersten drei Jahre.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Unterstützung in den letzten Jahren.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: André Steven
 Geburtsdatum und -ort: 22.06.1981 in Essen
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Anschrift: Erlenweg 13, 06120 Halle (Saale)
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 – 1991 GGS Winz-Niederwenigern in Hattingen
 1991 – 1993 Schulzentrum Saterland
 1993 – 1994 Albertus-Magnus-Gymnasium in Friesoythe
 1994 – 2001 Thomas-Morus-Gymnasium in Daun
 Juni 2001 Abschluss: Abitur (Note: 2,4)

Hochschulbildung:

Oktober 2001 – Oktober 2007 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Diplomstudiengang Biochemie
 - September 2003 Vordiplom Biochemie (Note: 2,1)
 - Oktober 2003 – Oktober 2006 Hauptstudium mit den Schwerpunkten Enzymologie, Ökologische Biochemie, Mikrobiologie, Organische Chemie
 Berufspraktikum am Department Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig-Halle
 - Februar 2006 – Mai 2006 Anfertigung der Diplomarbeit am Department Umweltmikrobiologie und Department Umweltbiotechnologie des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig-Halle (Direktor: Prof. Dr. Hauke Harms)
 Thema: „Lokalisierung und Charakterisierung von Laccasen aus dem aquatischen Hyphomyceten *Clavariopsis aquatica*“
 - Oktober 2007 Abschluss: Diplom Biochemie (Note: 1,8)
 Oktober 2007 – September 2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Bachelorstudiengang Bioinformatik
 September 2009 – heute Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Promotion am Institut für Medizinische Immunologie (Direktor: Prof. Dr. Barbara Seliger)
 Thema: „Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors CREB für die onkogene Transformation“

Sonstige Qualifikationen:

2005 Sachkundenachweis gemäß § 5 Abs. 2 der Chemikalienverbotsverordnung
 2012 Weiterbildung Tierschutz / Versuchstierkunde (FELASA-B Kurs)

Wissenschaftliche Konferenzbeiträge:

2012 Tumor Immunology meets Oncology VIII, Halle (Vortrag)
 2013 Tumor Immunology meets Oncology IX, Halle (Vortrag)
 2013 17. International Meeting of the STS, Weimar (Poster)
 2014 18. International Meeting of the STS, Weimar (Poster)
 2015 19. International Meeting of the STS, Weimar (Poster)

Publikationsverzeichnis

1. Recktenwald CV, Leisz S, Steven A, Mimura K, Müller A, Wulfänger J, Kiessling R, Seliger B. HER-2/neu-mediated down-regulation of biglycan associated with altered growth properties. *J Biol Chem.* 2012 Jul 13;287(29):24320-9. doi: 10.1074/jbc.M111.334425. Epub 2012 May 11. PUBMED-ID: 22582394
2. Steven A, Leisz S, Massa C, Iezzi M, Lattanzio R, Lamolinara A, Bukur J, Müller A, Hiebl B, Holzhausen HJ, Seliger B. HER-2/neu mediates oncogenic transformation via altered CREB expression and function. *Mol Cancer Res.* 2013 Nov;11(11):1462-77. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0125. Epub 2013 Sep 11. PUBMED-ID: 24025972
3. Mao Y, Sarhan D, Steven A, Seliger B, Kiessling R, Lundqvist A. Inhibition of tumor-derived prostaglandin-e2 blocks the induction of myeloid-derived suppressor cells and recovers natural killer cell activity. *Clin Cancer Res.* 2014 Aug 1;20(15):4096-106. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0635. Epub 2014 Jun 6. PUBMED-ID: 24907113
4. Steven A, Heiduk M, Recktenwald CV, Hiebl B, Wickenhauser C, Massa C, Seliger B. Colorectal Carcinogenesis: Connecting K-RAS-Induced Transformation and CREB Activity In Vitro and In Vivo. *Mol Cancer Res.* 2015 Aug;13(8):1248-62. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0590. Epub 2015 May 1. PUBMED-ID: 25934695
5. Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget.* 2016 (a) Feb 25. doi:10.18632/oncotarget.7721. [Epub ahead of print], PUBMED-ID: 26934558, Review.
6. Steven A, Leisz S, Sychra K, Hiebl B, Wickenhauser C, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Hypoxia-mediated alterations and their role in the HER-2-neu-regulated CREB status and localization. *Oncotarget.* 2016 (b) Aug 9;7(32):52061-52084. doi: 10.18632/oncotarget.10474. PMID: 27409833
7. Steven A, Leisz S, Wickenhauser C, Rahn J, Schulz K, Mougiakakos D, Kiessling R, Denkert C, Seliger B. Role of CREB in the HER-2/neu-mediated changes of the metabolism. *Oncotarget* 2016 (c) unter Begutachtung.
8. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, Kastenberger M, Bogdan C, Schleicher U, Mackensen A, Ullrich E, Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Mack M, Ritter U, Schmid M, Blank C, Dettmer K, Oefner PJ, Hoffmann P, Walenta S, Geissler EK, Pouyssegur J, Villunger A, Steven A, Seliger B, Schreml S, Haferkamp S, Kohl E, Karrer S, Berneburg M, Herr W, Mueller-Klieser W, Renner K, Kreutz M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016 Nov 8;24(5):657-671. PMID: 27641098
9. Steven A, Stoppe S, Mixdorf T, Rahn J, Seliger B. „CREB as a putative target in H-Ras and K-Ras mutated cancer.“ (Arbeitstitel) Manuskript in Vorbereitung.

Anhang

I. Verwendete Materialien

Chemikalien

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamin		Avanti
2,6-Dichloroindophenol	≥ 97 %	Sigma
2',7'-Dichlorofluorescindiacetat	≥ 97 %	Sigma
2-Butanol	z.A.	Appllichem
2-NBDG	≥ 98 %	Cayman
2-Propanol	z.A.	Sigma-Aldrich
3,3'-Diaminobenzidin – Tetrahydrochlorid	≥ 97 %	Appllichem
5(6)-CFDA,SE		Invitrogen
6 x DNA-Ladepuffer		Fermentas
6-Aminohexansäure	≥ 98,5 %	Sigma
7-Aminoactinomycin D	~ 97 %	Sigma
α-Cyano-4-hydroxymizimtsäure		Bruker
Aceton	z.A.	Sigma-Aldrich
Acetonitril	z.S.	Appllichem
Acridinorange	Farbanteil ~ 80 %	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid	37,5:1	Serva
Adenosin-5'-diphosphat, bakteriell	≥ 95 %	Sigma
AG 501-X8D Resin	8% Crosslinkage, ~1000 MW limit	Bio Rad
Agarose	Research grade	Serva
Agarose Beads	A und G	Santa Cruz
Agar Noble	special, low ash	Difco
Albumin aus Rinderserum Fraktion V	≥ 92 %	Fluka
Alcianblau 8GS		Kepec
Alcianblau	0,5 % in 3 % Essigsäure	Morphisto
Altromin 1324 Labortierfutter	Haltungsdiät Maus/Ratte, TPF	Altromin
Ammoniumcarbonat	99,999 %	Sigma-Aldrich
Ammoniumeisen(II)sulfat	99 %	Sigma-Aldrich
Ammoniummolybdat	z.A.	VEB Laborchemie Apolda
Ammoniumpersulfat	≥ 98 %	Appllichem
Ammoniumsulfat	≥ 99,5 %	Appllichem
Ampuwa	Reinstwasser, steril, Nuklease-frei	Kabi Fresenius
Ampicillin	91 – 102 %	Appllichem
Annexin V-FITC		BD
Annexin V-Binding Buffer	10 x	BD
Apigenin	≥ 95 %	Sigma
ATP	40 µmol	Roche
BCECF,AM	99 %	AAT Bioquest
Benzonase Nuclease	> 90 %, 1 × 10 ⁶ U/mg Protein	Novagen
β-Mercaptoethanol	Molekularbiologische Reinheit	Appllichem
Biotin-11-UTP	≥ 95 % pH 7,5	Jena Bioscience
BisTris	≥ 98 %	Appllichem
Borsäure	≥ 99,8 %	Roth
Bromphenolblau	Farbanteil ~ 90 %	Sigma-Aldrich
BSA	Zellkultur getestet, 30 % in DPBS, steril	Sigma
Calcein AM	85 %	Molecular Probes
Calciumchlorid	99 %	Sigma
Carbazol	95 %	abcr
Chloroform	≥ 99,5 %, enthält 100 – 200 ppm Pentene als Stabilisator	Sigma
Collagen	Typ 1 aus Rattenschwänzen	BD
Complete mini Proteaseinhibitor	EDTA-frei	Roche
Coomassie Blue Brilliant G250 /R250	Farbanteil ~ 90 %	Appllichem
Cytochrom c	≥ 95 %, basierend auf Molekulargewicht, aus Rinderherzen	Sigma

DAPI	≥ 90 %	Calbiochem
Dimethylformamid	≥ 99,8 %, wasserfrei	Sigma
Dimethylsulfoxid	≥ 99,5 %, für Pflanzenzellkultur getestet	Sigma-Aldrich
Dinatriumtetraborat	99,5 %	Roth
DMEM	1 x	Cambrex
DMEM <i>low Glucose</i> (0,5 g/L)	mit Na-Pyruvat, Glutamin	Cell Concepts
di-Natriumhydrogenphosphat 2 H ₂ O	≥ 99,5 %	Roth
DNA Ligase Set	DNA Ligase Enzym, DNA Ligase Puffer	Gibco
dNTP-Mix	Jeweils 10 mM	Peqlab
DTNB	99 %	Sigma
DTT	für die Molekularbiologie	Appllichem
Dulbecco's PBS	1 x	PAA
EDTA	99 %	Sigma
EGTA	für die Molekularbiologie	Appllichem
EMEM	ohne Phenolrot (2 x)	Cambrex
EMEM	mit Phenolrot (1 x)	Cambrex
Erythrozytenlysepuffer	1 x	C-C-Pro
Essigsäure	z.A.	Roth
Ethanol	absolut	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	1 %ige Lösung	Appllichem
F-12K Medium	mit L-Glutamin, Kaighn's	ATCC
FACS Clean Solution		BD
FACS Flow		BD
FACS Rinse		BD
Fetales Rinderserum	Herkunft Südamerika	PAA
Fibronektin	lysophilisiertes Pulver	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	37 %ige Lösung	Appllichem
Formalin, HistoFix	4,5 %, phosphatgepuffert, neutraler pH	Roth
G-418 sulfat		PAA
Gelatine	Typ A, für Gelelektrophoresen	Merck
<i>Geltrex Basement Membrane Matrix</i>	Wachstumsfaktorreduziert	Invitrogen
Glycerin	99 %, wasserfrei	Appllichem
Glycin	99,5 %	Appllichem
Guanidin-HCl	99 %	Amresco
Hanks BBS	1 x	PAA
Harnstoff	99,5 %	Appllichem
Hefeextrakt		Roth
HEPES-Puffer	1 M	Ccpro
Insulin-Transferrin-Selenium		Gibco
Iodacetamid	≥ 99 %	Appllichem
Iodmethan	99 %, enthält Kupfer als Stabilisator	Sigma
Iodnitrotetrazoliumchlorid	>97 %	Sigma
Isoamylalkohol	≥ 98,5 %	Roth
Isofluran		Abbott
Kaliumcyanid	z.A.	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (II)	99,0 –102,0 %	Merck
Kaliumhexacyanoferrit		Roth
Kristallviolett	Für die Mikroskopie	Merck
L-Ascorbinsäure	≥ 99 %	Sigma
L-Glutamin	200 mM Lösung	Sigma
LB-Agar	für die Molekularbiologie	Roth
LB-Medium	für die Molekularbiologie	Roth
Lignocel Einstreu	F14	Altromin
<i>LumiLight Western-Blotting Substrat</i>		Roche
Magnesiumchlorid	> 98,5 %, wasserfrei	Roth
Magnesiumsulfat	≥ 99 %, wasserfrei	Merck
Malachitgrün	≥ 80 % Farbanteil	Roth
MEM mit Earle's Salzen		PAA
meta-Phosphorsäure	> 33,5 %	Sigma
Methanol	≥ 99 %	Roth
Methyliodid		Sigma
Methylenblau	≥ 85 % Farbanteil	Roth
Milchpulver	entfettet	Difco

<i>MitoTracker Green FM</i>		Cell Signaling
<i>MitoTracker Red CMXRos</i>		Invitrogen
MOPS	+ 99 %	Sigma
N-Ethylmaleimid	≥ 99 %	Applichem
n-Dodecyl-β-D-maltosid	≥ 99 %	Applichem
NADH	≥ 97 %	Sigma
NADPH	≥ 96 %	Applichem
Natriumacetat	≥ 99 %	Merck
Natriumazid	≥ 99 %	Applichem
Natriumchlorid	z.A.	Applichem
Natriumcitrat	p.A.	Roth
Natriumhydroxid	≥ 99 %	Roth
Natriumsuccinat	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
NDSB-256	≥ 99 %	Calbiochem
Nigericin	≥ 99 %	Adipogen
Nonidet P40		Roche
ortho-Phosphorsäure	85 %	Merck
Paraformaldehyd	95 %, Pulver	Aldrich
Periodsäure	3 %ige Lösung	Morphisto
Penicillin-Streptomycin	10.000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin in 0,9 % NaCl	Sigma
Pharmalytes	pH 3-10	VWR
Phenazinmethosulfat	≥ 98 %	Applichem
Phenol	99 %	Sigma
Phosphoenolpyruvat	≥ 98 %	Applichem
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2		Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3		Sigma-Aldrich
PI(3,4,5)P3 diC 8		Echelon
Polyfect Transfektionsreagenz		Qiagen
Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)säure	doppelsträngig alternierend	Sigma
PolyHEMA	90 %	Applichem
Ponceau S	≥ 80 % Farbbanteil	Applichem
Propidiumiodid	> 94 %	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail		Sigma
Puromycin	≥ 98 %, für die Zellkultur, aus <i>Streptomyces alboniger</i>	Sigma
Reagenz Bradford-Assay		BioRAD
RPMI 1640	ohne Phenolrot, ohne Glutamin	GE Healthcare
<i>Reporter lysis buffer</i>	5 x	Promega
Rotiphorese 40	37,5:1	Roth
Rubidiumchlorid	≥ 99 %, für die Molekularbiologie	Sigma
Salzsäure	32 % reinst	Roth
Saponin	≥ 10 %, aus <i>Quillaja saponaria</i>	Sigma-Aldrich
<i>ScaI</i> -Puffer		Fermentas
Schwefelsäure		Merck
SDS	≥ 99 %	Applichem
Silbernitrat	für die Molekularbiologie	Applichem
Sorbitol	≥ 98 %	Sigma
Streptavidin HRP		Pierce
<i>Strip Holder Cleaning Solution</i>		VWR
Sucrose	Research grade	Serva
TCA	≥ 99 %	Applichem
TEMED	≥ 99 %, geeignet für die Elektrophorese	Sigma
Thioharnstoff	≥ 99 %	Applichem
Tris	≥ 99 %	Applichem
Triton X-100	für die Molekularbiologie	Merck
Trizol Reagenz		Invitrogen
Trypanblau	0,4 %ige Lösung	GibCo
Trypsin-EDTA	10 x, 0,5 %ige Lösung	GibCo
Trypton		Roth
TUBE 1 Agarose		Tebu
TUBE 2 Agarose		Tebu

Tween 20		Applichem
VECTASHIELD Mounting Medium		Biozol
Wachstums-Supplement für Endothelzellen	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i> , hEGF, hbFGF, Hydrocortison	BD
Wasserstoffperoxid	30 %	Merck
X-Gal	≥ 99 %	Applichem
Xylenolorange	z.A.	Roth
Zinkchlorid	≥ 99 %	Sigma
Zitronensäure	≥ 99,5 %	Roth

Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Ausführung	Hersteller
96-Lochplatte	schwarze Wände, klarer, flacher Boden	BD
96-Lochplatte	weiße Wände, klarer, flacher Boden	BD
Aufkonzentrierungsröhrchen	vivaspin 2, MWCO: 10.000	Sartorius
<i>CombiTips</i>	1 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf
EDTA-Monovette für Blutentnahme	S-Monovette, K3 EDTA 1,2 ml	Sarstedt
Einbettkassetten	L 40 x B 28 x H 6,8 mm	Roth
FACS-Röhrchen	mit Deckel (steril) / ohne Deckel	Falcon / Sarstedt
Filterspitzen	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml	Greiner
Einfrierbox	„Mr. Frosty“, für 18 Kryoröhrchen	NUNC
Gelkassetten	1,5 mm	Invitrogen
<i>Gel safer tip II</i>	1 – 200 µl	Kisker
IPG-Streifen	Immobiline dryStrip pH 3 – 10 NL, 18 cm	GE Healthcare
Kämme	1,5 mm, 10 Taschen, 15 Taschen	Invitrogen
Kryoröhrchen	1,2 ml	Sarstedt
Laborfolie	Parafilm M	Neolabs
Lumineszenzmikrotiterplatte	weiß	Berthold
Membranfilter	Cellulose Acetat, 0,2 µm Porendurchmesser	VWR
Multiloehplatten	6, 12, 24, 96, klarer, flacher Boden	Sarstedt
Neubauerzählkammer	0,0025 cm ²	Marienfeld
Nitrocellulosemembran	0,45 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Nylonmembran	<i>positively charged</i>	Roche
Objektträger und Deckgläschen	76x26 mm	Engelbrecht
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	Hirschmann
Petrischalen	10 cm Durchmesser	Roth
pH-Test Strips	pH 4.5 – 10.0	Sigma-Aldrich
Pipetten, serologische	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße PCR	0,5 ml	Starlab
Reaktionsgefäße PCR	0,2 ml	Greiner
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Skalpelle	Cutfix	Roth
<i>Transwell</i> Migrations-Einsätze	8 µm Porendurchmesser	Corning
<i>Ultra low Attachment</i> Platten	24 Loch	Corning
UV-Küvetten micro	70 µl	Brand
Wattestäbchen		Noba Verbandsmittel
Whatmanpapier	GB005	Schleicher & Schuell
Zellkulturschaber		TCC
Zellkulturschalen	3,5 cm Durchmesser	Greiner
Zellkulturschalen	10 cm Durchmesser	Sarstedt
Zellkulturflaschen	T25, T75, T150	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner

Vor Gebrauch wurden Kunststoffmaterialien wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen bei 121°C und 2 bar für 20 Min. autoklaviert und dann im Trockenschrank bei 90°C getrocknet. Glaspasteurpipetten wurden bei 180°C trockener Hitze für vier Std. im Sterilschrank sterilisiert.

Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
<i>Active Ras Pull-down Kit</i>	Pierce	Präzipitation von GTP-Ras
<i>AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit</i>	Mobitec	Apoptose- und Nekrose-Bestimmung
<i>Apo-One Homogeneous Caspase-3/7-Assay Kit</i>	Promega	Messung der aktiven Caspase-3 und 7

<i>ApopTag plus peroxidase in situ apoptosis detection</i>	Merck	Apoptose-Bestimmung im Gewebe
<i>BCA-Protein-Assay Kit</i>	Pierce	Proteinbestimmung
<i>Beta-Glo Assay Kit</i>	Promega	Beta-Galaktosidase-Bestimmung
<i>Biotin 3'End DNA Labeling Kit</i>	Pierce	Biotin-Markierung von Oligonukleotiden
<i>cAMP-Glo Assay Kit</i>	Promega	cAMP-Messung
<i>Cell Fractionation Kit</i>	Cell Signaling	Proteinfractionierung
<i>Cell Proliferation Kit ELISA, BrdU (colorimetric)</i>	Roche	Zellproliferation
<i>Cell Proliferation Kit II – XTT</i>	Roche	Zellproliferation
<i>Cell Titer Glo</i>	Promega	ATP-Bestimmung
<i>ChIP IT Express Enzymatic Kit</i>	Active Motive	ChIP
<i>Citrate Assay Kit</i>	Biovision	Citrat-Bestimmung
<i>Cleaved-Caspase-3-Kit</i>	BD	Messung der aktiven Caspase-3
<i>Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit</i>	Promega	Messung der Zytotoxizität durch LDH
<i>Effectene Transfektionsreagenz</i>	Qiagen	Transfektionsreagenz
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen	Endotoxinfreie Plasmidpräparation
<i>GSH/GSSG Ratio Assay Kit</i>	Merck	Messung der GSH-Konzentration
<i>Hyaluronan ELISA, mausspezifisch</i>	Echelon	Hyaluronsäure-Bestimmung
<i>Lactate Assay Kit</i>	Sigma	Laktat-Bestimmung
<i>Light Shift Kit</i>	Thermo	EMSA
<i>Luciferase Assay System</i>	Promega	Lumineszenz-Messung
<i>MMP-2 ELISA, mausspezifisch</i>	Raybio	MMP-2-Bestimmung
<i>MitoProbe JC-1 Kit</i>	Invitrogen	Messung des mitochondrialen Membranpotentials
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Macherey-Nagel	RNA-Isolation
<i>PepTag Assay for non-radioactive detection of PKA</i>	Promega	Bestimmung der PKA-Aktivität
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit</i>	Invitrogen	qPCR
<i>PyroMark PCR kit</i>	Qiagen	Pyrosequenzierung
<i>Pyruvate Assay Kit</i>	BioVision	Pyruvat-Bestimmung
<i>Qiaquick Gel Extraktion Kit</i>	Qiagen	Nukleinsäure-Extraktion aus Agarosegelen
<i>QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene	Einführung von Punktmutationen
<i>ReblotPlus Kit</i>	Chemicon	“Strippen” von Blotmembranen
<i>RevertAid cDNA Kit</i>	Fermentas	cDNA-Synthese
<i>SERVAGel N Native Gel Starter Kit</i>	Serva	Native Gelelektrophorese
<i>SUMO-Qapture-T Kit</i>	Enzo	Präzipitation von SUMOylierten Proteinen
<i>Ubiquitinated Protein Enrichment Kit</i>	Calbiochem	Präzipitation von ubiquitinierten Proteinen

Gerätschaften

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
-150°C-Gefrierschrank	MDF-6C2156	Sanyo
-80°C-Gefrierschränke	MDF-U73V	Sanyo
1D-Gelelektrophoresesystem		
- Laufkammern	Xcell Sure Lock	Invitrogen
- Stromversorgung	Power Ease 500	Invitrogen
2D-Gelelektrophoresesystem		
- Laufkammern	EPS 2A200	Hoefer
- Glaskassetten	DALT 25 x 20 cm, 1,5 mm	Amersham Pharmacia Biotech
- IEF-Einheit	Ettan IPGphor II	Amersham Pharmacia Biotech
Ausstanzautomat für 2D-Gele	Spot Hunter	Herolab
Brutschrank für Bakterien	B6420	Heraeus
CO ₂ -Inkubator	B5060EK	Heraeus
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD
	FACSScan	BD
ELISA-Plattenlesegerät	MRX-TC	Dynex Technologies
Färbeautomat	Large Dodeca stainer	BIO RAD
Feinwaage	Analytic AC 2105	Sartorius
Fluoreszenz-Lesegerät	Infinte M200 Pro	Tecan
Fluoreszenzmikroskop	BD Pathway 855	BD
Fluoreszenzmikroskop	DM IRB	Leica
- Filterrad	MAC5000	Visitron
- Stromversorgung Quecksilberlampe	RT Power Supply	Diagnostic
- Vorschaltgerät Quecksilberlampe	Ebx 75	EJI
Geldokumentation	Image Station 440CF	Kodak

Gelelektrophoreseskammer		
- Agarosegel-Laufkammer	Wide mini subcell	BIO RAD
- Stromversorgung	Power Pac Basic	BIO RAD
Gewebeinfiltrationsautomat	ASP200 S	Leica
Gewebeeinbettautomat	EG1150	Leica
Heizschrank	T6760	Heraeus
HPLC	D-7000	Merck Hitachi
Hybridisierungs-ofen	BFD 53	Binder
Hypoxie-Inkubator	CB 150	Binder
Inkubationsschüttler für Bakterien	Innova 4000	New Brunswick
Lichtmikroskop	DM IL	Leica
Luminometer	MicroLumat Plus CB 96V	Berthold Technologies
Kleintier-Fluoreszenzkamera	Maestro	CRI
MALDI-Platte	MTP 384 ground steel target	Bruker Daltonics
Massenspektrometer	UltrafleXtreme	Bruker Daltonics
Mikrotom	RM2235	Leica
Mini-Schüttel-/Hybridisierungs-ofen	OV3	Biometra
PCR	T3 Thermocycler	Biometra
pH-Meter	PH 525	WTW
Real-time-PCR	Rotorgene 2000	Corbett
Reinstwasseranlage	Ultra Clear UV Plus	SG
Rollmischer	SRT 9D	Stuart
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Julabo
Sequenziergerät	PyroMark Q24	Qiagen
Spektrometer	Ultrospec 3300 Pro	Amersham Bioscience
Sicherheitswerkbank Klasse II		Nuaire
Taumelschüttler	WT 12	Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Tierhaltungseinrichtung	IVC-Käfig / Trinkflaschen	Ehret
Tischzentrifuge		Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus	Bandelin
Vortemperiergerät		UniEquip
„Vortex“-Tischschüttelgerät	VF2	IKA
Wasserbad	WB 7	Memmert
Western-Blot-Kamera	LAS 3000 CCD camera system	FUJIFILM
Western-Blot-Kammer	OWL HEP-1	Thermo Scientific
Ultraschallbad	Transsonic T460	Elma
Ultra-Turrax	T25	IKA
UV-Tisch	Might Bright	Hoefer
Zellsortiergerät	FACSAria	BD
Zentrifugen	Rotina 46R	Hettich
	Micro 200	Hettich
	ZR16MK	Hermle

Softwareprogramme

Programm	Hersteller	Version	Gerät	Nutzung
AIDA	Raytest	4.11.021	Rechnergestützt	Densitometrische Auswertung
AttoVision	BD	1.6.2.02	BD Pathway 855	Fluoreszenzmikroskopie
BioDC	Biochrom	2.00	Spektrometer	Spektrometer
CellQuest Pro	BD	4.0.2	FACSCalibur	Durchflusszytometrie
CellQuest Pro	BD	4.0.1	FACSScan	Durchflusszytometrie
Delta 2D	Decodon	4.1	Rechnergestützt	Auswertung 2D-Gele
Easy4science	Herolab		Spot Hunter	Detektion von Proteinspots
Mdrive Control	Herolab	1.22.0.0	Spot Hunter	Kontrollprogramm
flexAnalysis	Bruker Dalton.	3.3.80.0	UltrafleXtreme	Auswertung Massenspektren
flexControl	Bruker Dalton.	3.3	UltrafleXtreme	Aufnahme von Massenspektren
i-control	Tecan	1.11	Infinite M200 Pro	Fluoreszenz-Lesegerät
IS440CF	Kodak	2.0.5	Kodak Image Station 440CF	Agarosegel-Kamera
LAS-3000	Fujifilm	2.1	LAS-3000	Blot-Kamera
Maestro	CRI	2p22 Update 2.43	Maestro	<i>In vivo</i> Imaging
MetaVue	Molecular Devices	5.0r6	Fluoreszenzmikroskop Leica	Fluoreszenzmikroskopie

ModFit LT	Verity Software	V.2.0	FACSCalibur	Auswertung Zellzyklusanalyse
Revelation	Dynex	G 3.2	Dynex MRX TC II	ELISA-Lesegerät
Rotorgene	Corbett	1.7	Rotorgene 2000	qPCR
ScanWizard Bio	Microtek	1.50	Microtek Bio-5000 plus	Gel- und Proben-Scanner
Wave Xfe 2.10	Seahorse	2.1.0	Seahorse XF96e	Extrazelluläre Flussmessungen
WinGlow	Berthold Tech.	1.25.00003	MicroLumat Plus LB 96V	Lumineszenzmessungen

Internetdatenbanken

Datenbank	Internetadresse	Nutzung	Version	Letzter Zugriff
CREB Target Gene	http://natural.salk.edu/CREB/	Identifizierung von CRE-Sequenzen	02.05.2005	11.2015
HOMER	http://homer.salk.edu/homer/motif/motifDatabase.html	DNA-Bindemotive		30.11.2015
JASPAR	http://jaspar.genereg.net/	Bindemotive für TF	2016 Server	30.11.2015
KM-Plot	http://kmplot.com	Überlebenskurven von Krebspatienten	2015.10.24.	21.11.2015
MASCOT	http://matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>		20.02.2014
NCBI Primerblast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	Ableiten von qPCR Oligonukleotiden		10.06.2015
NEB Cutter	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/	<i>In silico</i> Restriktionsverdau von DNA	V2.0	14.02.2015
NEB Double Digest Finder	https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder	Doppelter <i>In silico</i> Restriktionsverdau von DNA		14.02.2015
PANTHER Gene List Analysis	http://pantherdb.org/	Analyse von Proteinen/Genen und Funktionen	9.0	25.05.2015
Primer X	http://bioinformatics.org/primerx/	Ableiten von Mutageneseprimern	14.08.2006	06.12.2013
TFSEARCH	http://diyhl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/TFSEARCH.html	Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen	1.3	29.08.2014, offline ab 2015

Inhibitoren

Tabelle A.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.

Inhibitor	Reinheit	Hersteller	Zielstruktur	Konzentration	Inkubationszeit
AKT Inhibitor ¹	≥ 98 %	Calbiochem	AKT	5 µM	24 Std.
Axitinib	≥ 99 %	LC Labs	Tyrosinkinase	10 µM	24 Std.
Doxorubicin	98 – 102 %	Sigma	DNA-Replikation	10 µM	24 Std.
Epoxomicin	≥ 95 %	Calbiochem	Proteasom	10 µM	24 Std.
Esomeprazol	≥ 98 %	Sigma	Protonenpumpen	10 µM	24 Std.
FPT 3 Inhibitor ²	≥ 90 %	Calbiochem	Farnesyltransferase	100 µM	48 Std.
FT Inhibitor ³	n/a	Santa Cruz	Farnesyltransferase	2 µg/ml	48 Std.
Genistein	≥ 98 %	Santa Cruz	Tyrosinkinase	100 µM	24 Std.
GM-6001	≥ 95 %	Calbiochem	MMP	5 µM	24 Std.
H89	≥ 99 %	Calbiochem	PKA ⁵	10 µM	24 Std.
KG-501 ⁴	für die Histologie	Sigma	KID/KIX	1,25, 2,5, 5, 10 µM	24, 48, 72, 96 Std.
Lapatinib	≥ 99 %	LC Labs	HER-2/neu, EGFR	10 µM	24 Std.
Leptomycin B	≥ 99 %	LC Labs	nukleärer Export	50 ng/ml	24 Std.
LY294002	≥ 99 %	LC Labs	PI3K	5 µM	24 Std.
Manumycin A	≥ 96 %	Enzo	Farnesyltransferase	10 µM	48 Std.
MG-132	≥ 98 %	Calbiochem	Proteasom	10, 20, 50 µM	4 Std.
Paclitaxel	≥ 99 %, aus <i>Taxus brevifolia</i> isoliert	Sigma	Spindelapparat	10 µM	24 Std.
Pazopanib	≥ 98 %	GSK	Tyrosinkinase	10 µM	24 Std.
PD98059	≥ 99 %	LC Labs	MEK1	10 µM	24 Std.
PYR-41	≥ 98 %	Sigma	Ubiquitin E1	10, 25, 50 µM	4, 24 Std.
RAD-001	≥ 99 %	LC Labs	mTOR	5 µM	24 Std.
Ro31-8220	≥ 98 %	Cayman	PKC ⁶	5 µM	24 Std.
SB203580	100 %	Axxora	p38	10 µM	24 Std.

SN50	≥ 97 %	Enzo	NFκB	10 μM	24 Std.
Sorafenib	≥ 95 %	Bayer	Tyrosinkinase, raf	10 μM	24 Std.
Staurosporin	≥ 99 %	Calbiochem	PKC	10 μM	24 Std.
Sunitinib	≥ 99 %	LC Labs	Tyrosinkinase	10 μM	24 Std.
Tipifarnib	≥ 99 %	LC Labs	Farnesyltransferase	1,25, 2,5, 5, 10 μM	24, 48 Std., 72 Std.
Trametinib	≥ 99 %	LC Labs	MEK1/2	100 nM	24 Std.
U0126	≥ 98 %	Axxora	MEK1/2	10 μM	24 Std.
Wortmannin	≥ 99 %	LC Labs	PI3K	1 μM	24 Std.

¹ – 1L-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2[(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonat]

² – (E,E)-[2-Oxo-2-[[[3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl]oxy]amino]ethyl]phosphonsäure, (2,2-Dimethyl-1-oxopropoxy)methyl Ester, Na

³ – N-[(2S)-((2R)-2-Amino-3-mercaptopropylamino)-3-methylbutyl]-L-phenylalanyl-L-methionin

⁴ – Naphthol-AS-E-phosphat

⁵ – H89 hemmt auch mehrere Kinasen u.a. MSK1

⁶ – Ro31-8220 hemmt auch mehrere Kinasen u.a. CaMK II

Enzyme

Enzym	EC-Nummer	Hersteller	Aktivität	Quelle
Coenzym Q2	1.10.2.2	Sigma	≥ 90 %	Künstlich
DNase I	3.1.21.1	Invitrogen	>10.000 U/mg Protein	Rinderpankreas
Heparin	---	Biochrom	170 E/mg	Schweinemukosa
Katalase	1.11.1.6	Sigma	2000 – 5000 U/mg Protein	Rinderleber
Proteinase K	3.4.21.64	Appllichem	min. 30 mUnits/mg Protein	<i>Tritirachium album</i>
RNase A, Typ IA	3.1.27.5	Sigma	> 50 Kunitz U/mg Protein	Rinderpankreas
T4-Polynukleotidkinase	2.7.1.78	Promega	10 U pro Ansatz	<i>E. coli</i> , rekombinant
Taq-DNA-Polymerase	2.7.7.7	Invitrogen	10 U/μl	<i>E. coli</i> , isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i>
Trypsin	3.4.21.4	Promega	17.000 U/mg Protein	Schwein

Restriktionsenzyme

Tabelle A.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme. Die Restriktionsenzyme wurden in einer Konzentration von 20 U verwendet und BSA in einer Endkonzentration von 100 μg/ml.

Restriktionsenzym (Hersteller)	Zielsequenz (Plasmid)	Inkubations-Puffer	Inkubationszeit	Inkubations-Temperatur	Inaktivierung
<i>ScaI</i> (Fermentas)	5'...AGT [▼] ACT...3' 3'...TCA [▲] TGA...5' (pClip)	<i>ScaI</i> -Puffer	16 Std.	37°C	80°C, 20 Min.
<i>SmaI</i> (NEB)	5'...CCC [▼] GGG...3' 3'...GGG [▲] CCC...5' (mCherry)	NEB 4 + BSA	12 Std.	25°C	65°C, 20 Min.
<i>BsaI</i> (NEB)	5'...C [▼] CNNGG...3' 3'...GGN [▲] NC...5' Validierung	NEB 2 + BSA	12 Std.	60°C	80°C, 20 Min.
<i>NlaIII</i> (NEB)	5'...CATG [▼] ...3' 3'...GTAC [▲] ...5' Validierung	NEB 4 + BSA	16 Std.	37°C	65°C, 20 Min.
<i>Taq^qI</i> (NEB)	5'...T [▼] CGA...3' 3'...AGC [▲] T...5' Validierung	NEB 3 + BSA	12 Std.	65°C	80°C, 20 Min.

Tabelle A.3: Angaben für Doppelverdau. Alle Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer wurden von NEB bezogen.

Restriktionsenzyme	Zielsequenzen	Inkubations-Puffer	Inkubationszeit	Inkubations-Temperatur	Inaktivierung
<i>XhoI</i> / <i>NheI</i>	5'...CTCGAG...3' 5'...GCTAGC...3' 3'...GAGCTC...5' 3'...CGATCG...5'	NEB 2 + BSA	> 8 Std.	37°C	65°C, 20 Min.
<i>XhoI</i> / <i>KpnI</i>	5'...CTCGAG...3' 5'...GGTACC...3' 3'...GAGCTC...5' 3'...CCATGG...5'	NEB 1 + BSA	> 8 Std.	37°C	--- ¹

<i>XhoI / HindIII</i>	5'...CTCGAG...3' / 3'...GAGCTC...5' 5'...AAGCTT...3' / 3'...TTCGAA...5'	NEB 2 + BSA	> 8 Std.	37°C	65°C, 20 Min.
<i>XhoI / SacI</i>	5'...CTCGAG...3' / 3'...GAGCTC...5' 3'...GAGCTC...5' / 3'...CTCGAG...5'	NEB 4 + BSA	> 8 Std.	37°C	65°C, 20 Min.
<i>SmaI / SacI</i>	5'...CCCGGG...3' / 3'...GGGCCC...5' 5'...GAGCTC...3' / 3'...CTCGAG...5'	NEB 4 + BSA	8 Std. + 8 Std. ²	25°C + 37°C ²	65°C, 20 Min.

¹ - Da *KpnI* nicht durch Hitze inaktivierbar ist, wurde eine Phenol-Chloroformextraktion (s. 2.3.3) und nachfolgend eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

² - Bei diesem Doppelverdau wurde zunächst mit 20 U *SmaI* bei 25°C für acht Std. verdaut, dann 20 U *SacI* zugegeben, die Temperatur auf 37°C erhöht und erneut für acht Std. verdaut.

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen hergestellt und sequenziert. Die Oligonukleotide wurden in Ampuwa in einer Konzentration von 100 µM gelöst und bei -20°C gelagert.

Tabelle A.4: Übersicht über die in der PCR verwendeten Oligonukleotide. Die HER-2/neu Oligonukleotide erkennen die überexprimierte humane Form.

Genname und Orientierung	Sequenz (5' – 3' Orientierung)	Annealingtemperatur [°C]	Produktgröße [Bp]
Bax fwd	ATCGAGCAGGGAGGATGGC	52	470
Bax rev	CTTCCAGATGGTGAGCGAGG	52	
Beta-Aktin fwd	CTGTCGAGTCGCGTCCACCC	65	260
Beta-Aktin rev	TGCTCTGGGCCTCGTCACCC	65	
Bcl-2 fwd	GCGGAGGAGGAGAAAGGGT	60	522
Bcl-2 rev	GATCTCAAGAGCACCGCAGC	60	
Bcl-xL fwd	CACCGGAAGTGGCTGCGCTT	66	330
Bcl-xL rev	CAGTTTCTTCTGGGGCCTCAGTCCT	66	
CREB Isoformen fwd	GCAGTGACGGAGGAGCTTGTTACC	65	496, 454, 332
CREB Isoformen rev	TCTTCTTCAATCCTTGGCACCCTG	65	
HER-2/neu fwd	ACCAAGCTCTGCTCCACACT	60	207
HER-2/neu rev	GCCTGGCATTACATACTCC	60	
MMP-2 Promotor fwd *	AGGTGGCTAGCTCCGTAACG	61	1556
MMP-2 Promotor rev *	CTCGAGCCACCAGGGAAGT	61	
MMP-9 Promotor fwd *	TGCCTTGCCCGGGGTG	61	1327
MMP-9 Promotor rev *	AGCAGAGCTCCAGCCGA	61	

* - Amplifiziert aus genomischer DNA

Tabelle A.5: Übersicht über die verwendeten Primer für die qPCR.

Genname und Orientierung	Sequenz (5' – 3' Orientierung)	Annealingtemperatur [°C]	Produktgröße [Bp]
GAPDH fwd	TTGTGCAGTGCCAGCCTCGT	60	214
GAPDH rev	TCGGCCTTGACTGTGCCGTT	60	
ATF-1 fwd	ACTTGCCCTTGTGTGTGTGC	60	236
ATF-1 rev	TCTCCAACCAATCGAGTCC	60	
CREB-1 fwd	CATTGCCCTGGAGTTGTTATG	60	124
CREB-1 rev	TCTACGACATTCTTGTGCTGCCTC	60	
CREM fwd	GACAACCTGCAGGGCTCTAGG	60	

CREM rev	TTCACAATGGAGGGTCATCA	60	198
Cyclin A1 fwd	GCAGCCGGACATCACGGAGG	60	173
Cyclin A1 rev	CTGCTGTCCCGACAAGCTGC	60	
Cyclin B1 fwd	TGCTGAGCCTGAGCCTGAACC	60	180
Cyclin B1 rev	GCGTCTACGTCACTCACTGCAAGG	60	
Cyclin D1 fwd	GGCACATTCTTGCCGCTGCC	60	172
Cyclin D1 rev	AGAGGAGCCGTGGCCTGTCC	60	
Cyclin E fwd	AGCTCCCTGTGCTGCCTTGG	60	293
Cyclin E rev	CCGAGCAGAGGCCAGCAACC	60	
MMP-2 fwd	GGATGCCGTCGTGGACCTGC	60	219
MMP-2 rev	AGGAGGACAGAGCCGCCAGG	60	
MMP-9 fwd	AGCACGGCAACGGAGAAGGC	60	171
MMP-9 rev	TCGCGTCCACTCGGGTAGGG	60	
MMP-13 fwd	TGGGGAGCCACAGATGAGCAC	60	196
MMP-13 rev	AGGCCACCTCCACTGTCTTGT	60	
TAP-1 fwd	TGCCTAAGAAGCTGGGAAAA	60	203
TAP-1 rev	GTAAGCCAAGGCCTCCTTCT	60	
TAP-2 fwd	CGGTGCTAAAGGAGATCCAG	60	204
TAP-2 rev	CCATCACCTCCGTATGACT	60	
Tapasin fwd	ACACTGCGAGATGAGCCGCTTC	60	221
Tapasin rev	TGAGGACGGTCAGCACCCTGT	60	
VEGF A fwd	AACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG	60	202
VEGF A rev	ATCAGGGTACTCCTGGAAGATGTCC	60	
Citratsynthase fwd	GTGACCATGAGGGTGGTAATG	60	217
Citratsynthase rev	CCGTCCTGAATTGAGTGTGTT	60	
Esterase D fwd	ATTTGCTCCAATTTGCAACC	60	195
Esterase D rev	GGGAGTAACTGCCCATTTGA	60	
Glutathionsynthase fwd	GCCTCCTACATCCTCATGGA	60	160
Glutathionsynthase rev	CCACATGCTTGTTTCATCACC	60	
Katalase fwd	CAGTGCGCTGTAGATGTGAAA	60	263
Katalase rev	GTGTGAATTGCGTTCTTAGGC	60	
Pyruvatkinase M2 fwd	CTGCAGGTGAAGGAGAAAGG	60	182
Pyruvatkinase M2 rev	GATGCAAACACCATGTCCAC	60	
HAS2 fwd	TCGCCAAGTCACCCTGCCTG	60	271
HAS2 rev	ACGTTTGAGGAACTGGTGCGT	60	
HAS1 fwd	GGCTCTGCTCTGGGTGCTGC	60	264
HAS1 rev	AGAGCCCAGAGTGCCAGGGG	60	
Glut1 fwd	TGTGCTGTGCTCATGACCATCGC	60	143
Glut1 rev	AGCTCGGCCACAATGAACCATGG	60	
CBP fwd	GTCACCAGGCCAGCCGAACC	60	247
CBP rev	TGCGAGTCCAGGGTGAGGGG	60	
Cortactin fwd	CCAGCACAGGGTTCACACTA	60	289
Cortactin rev	ACCTAGTGAGAAGCGCAACC	60	

AKNAK fwd	GTCAACGTGAGGGGCTTACA	60	134
AHNAK rev	TGCCATTAAAGTGCCAGACAT	60	
Angiopoietin1 fwd	TTGGGTCCAGAGAATGCCAC	60	212
Angiopoietin1 rev	CCAGGTCACCTCCACAATCC	60	
Angiopoietin2 fwd	TTCTCCTCTGCCACGTTAC	60	114
Angiopoietin2 rev	TGTTGGCCCTGTCGACATTT	60	
ICAM1 fwd	TGTCAGCCACCATGCCTTAG	60	132
ICAM1 rev	CAGCTTGCACGACCCTTCTA	60	
PECAM1 fwd	CCAAGGCCAAACAGAAACCC	60	287
PECAM1 rev	GTTCTTAGGGTCGACCTTCCG	60	
VCAM1 fwd	GTACAGTCTGGTGGAGGCAC	60	135
VCAM1 rev	GCATGGCTTGGTTTGTGGAG	60	
mATPSyn6 fwd	CCAATGGCATTAGCAGTCCG	60	245
mATPSyn6 rev	TGCATGAGTTTGGTGGGTCA	60	
mATPSyn8 fwd	CAAACATTCCCCTGGCACC	60	111
mATPSyn8 rev	TTGTTGGGGTAATGAATGAGGC	60	
mCOX I fwd	GACTTGCAACCCTACACGGA	60	281
mCOX I rev	GATGGCGAAGTGGGCTTTTG	60	
mCOX II fwd	AACCGAGTCGTTCTGCCAAT	60	88
mCOX II rev	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT	60	
mCOX III fwd	CCAATGGCATTAGCAGTCCG	60	245
mCOX III rev	TGCATGAGTTTGGTGGGTCA	60	
mND1 fwd	TCCGAGCATCTTATCCACGC	60	134
mND1 rev	GTATGGTGGTACTCCCGCTG	60	
mND2 fwd	CAAGGGATCCCCTGCACAT	60	153
mND2 rev	AAGTCCTCCTCATGCCCTA	60	
mND3 fwd	GTTGCATTCTGACTCCCCCA	60	92
mND3 rev	GGTAGACGTGCAGAGCTTGT	60	
mND4 fwd	AGCTCCAATTGCTGGGTCAA	60	212
mND4 rev	GGCTAACTGAGGAGTAGGCG	60	
mND4L fwd	ACCTCACCATAGCCTTCTCAC	60	206
mND4L rev	TAGTCCTACAGCTGCTTCGC	60	
mND5 fwd	ACCCAATCAAACGCCTAGCA	60	85
mND5 rev	AGGACTGGAATGCTGGTTGG	60	
mND6 fwd	GAAGGAGGGATTGGGGTAGC	60	79
mND6 rev	CCGCAAACAAAGATCACCCAG	60	
COXI fwd	GCCCCAGATATAGCATTCCC	60	116
COXI rev	GTTCATCCTGTTCTGCTCC	60	
PPARGC1a fwd	CAAAGCAGCAGAGAGGGAAAC	60	139
PPARGC1a rev	CTTCGTACAGCCATCAAAAAGGG	60	
18S rDNA fwd	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	60	104
18S rDNA rev	CGCTGAGCCAGTCAGTGT	60	
ChIP fwd	ATCAACATAGCCGTCAAGGCATG	60	59
ChIP rev	TCACCGTAGGTGCGTCTAGACTGT	60	

Tabelle A.6: Mutageneseprimer für die MMP-9-Promotorkonstrukte. Die mutierten Basen sind unterstrichen. Zur Ableitung der Primer wurde das Programm PrimerX verwendet. Alle Primer wurden in sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Primer	Sequenz (5' – 3' Orientierung)
MMP-9 mut CRE 1 fwd	GGGGTGGTTGGGAAAT <u>ACCG</u> AGGTTGGGAAATG
MMP-9 mut CRE 1 rev	CATTTCCCAACCTCGGTATTTCCCAACCACCCC
MMP-9 mut CRE 2 fwd	GGGGAAGGGTCCAT <u>AGCG</u> ATCTCACAGCTC
MMP-9 mut CRE 2 rev	GAGCTGTGAGATCG <u>CT</u> ATGGACCCTTCCCC
MMP-9 mut CRE 3 fwd	GCTGATCAGTCAGGGCCGTT <u>TCG</u> ACCTAGGGCTAGGTGAATG
MMP-9 mut CRE 3 rev	CATTCACCTAGCCCTAGGTC <u>GAA</u> CGCCCTGACTGATCAGC

Tabelle A.7: Oligonukleotide für den EMSA. Die Bindesequenz ist unterstrichen dargestellt.

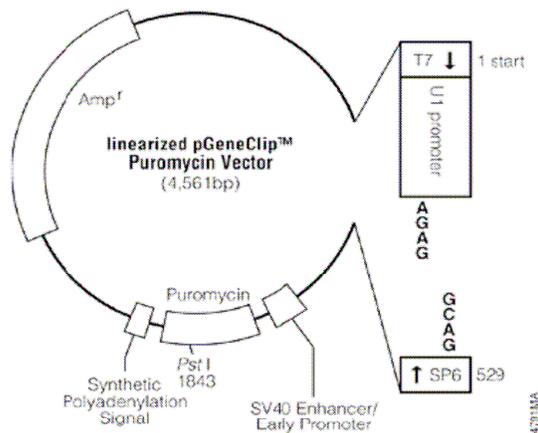
Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3' Orientierung)
MMP-9 CRE 1 fwd	GGGAAAT <u>TGACG</u> AGGTTG
MMP-9 CRE 1 rev	CAACCTCGTCATTTCCC
MMP-9 CRE 2 fwd	GGTCCAT <u>TGACG</u> ATCTCA
MMP-9 CRE 2 rev	TGAGATCGTTCATGGACC
MMP-9 CRE 3 fwd	CAGGGCCGTC <u>AGAC</u> CTA
MMP-9 CRE 3 rev	TAGGTCTGACGGCCCTG

Plasmide und Plasmidkarten

ShRNA-Konstrukte gegen murines CREB-1

Die in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Konstrukte sind kommerziell von der Firma SABioscience (*SureSilencing shRNA Plasmid for mouse CREB1*, KM03382P) bezogen worden. Diese Konstrukte bestehen aus einem pGeneClip Vektor mit einem Puromycin- und Ampicillin-Resistenzgen, in dem jeweils die folgenden Sequenzen einkloniert wurden:

Klon ID	Insertsequenz (5' – 3' Orientierung)
1	TCAGCCGGGTACTACCATTCT
2	ACAGGGAGGCAGCAAGAGAAT
3	AAGTCCAAACAGTTCAGATTT
4	TGCTCCCACTGTAACCTTAGT
NC	GGAATCTCATTTCGATGCATAC



pGeneClip(TM) Puromycin Vector sequence reference points:	
Base pairs	4561
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
U1 promoter (human, -392 to +1)	46-438
10bp spacer	439-448
U1 termination sequence	449-465
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	527-546
SP6 RNA polymerase promoter primer binding site	529-547
Binding region of pUC/M13 reverse sequencing primer	564-585
SV40 early enhancer/promoter	798-1216
SV40 minimum origin of replication	1114-1179
Puromycine-N-acetyltransferase coding region	1239-1838
Synthetic poly(A) signal	1883-1931
Beta-lactamase (Amp ^r) coding region	2883-3743
Binding region of pUC/M13 forward sequencing primer	4495-4518
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	4545-3

NC bezeichnet dabei die Kontrolle, dessen Insertsequenz kein murines Gen stilllegt (*non-sense Control*). Bei den Plasmiden 1 bis 4 konnte die Stilllegung von CREB auf mRNA und Proteinebene validiert werden. Dabei konnte bei den Plasmiden 1 und 2 ein beinahe kompletter Verlust der CREB-Menge detektiert werden. Klone von Plasmid 1 waren weitaus weniger stabil als die des Plasmids 2 und starben nach wenigen Passagen in Kultur ab. Daher wurden für weitergehende Versuche Klone vom Plasmid 2 verwendet.

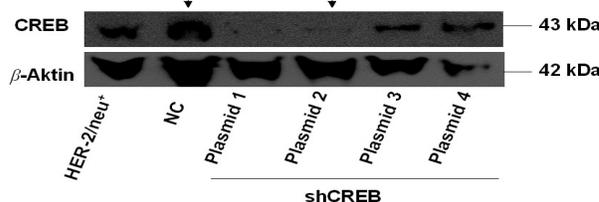
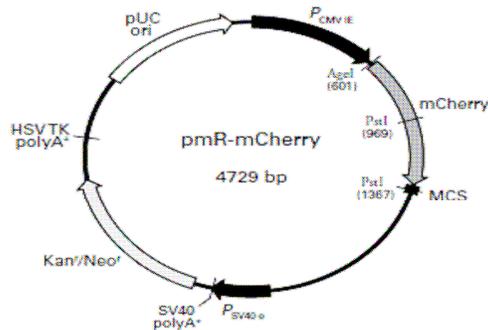


Abbildung A.1: Stilllegung der CREB-Expression in HER-2/neu-positiven NIH3T3-Zellen durch shRNA-Konstrukte. Es sind die vier zur Verfügung stehenden shRNA-Plasmide und die NC-Kontrolle im Vergleich zur HER-2/neu-Zelllinie dargestellt. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Konstrukte wurden für die Arbeiten verwendet.

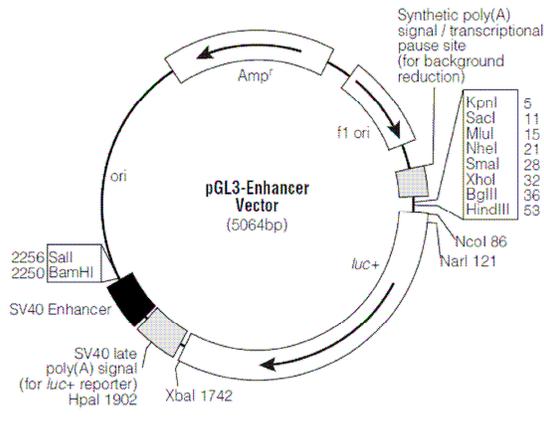
mCherry-Konstrukt

Dieses Konstrukt enthält ein Gen für mCherry, das für ein rot fluoreszierendes Protein kodiert. Es wurde für das *in vivo*-Bildgebungsverfahren verwendet. Transfizierte Zellen sind Neomycinresistent.



pGL3 Luciferase-Konstrukt

Dieser Vektor wurde für Promotorstudien verwendet. Er enthält die kodierende Sequenz für das Luziferasegen, vor dem der zu testende Promotor kloniert werden kann.



pGL3-Enhancer Vector Sequence Reference Points:

Promoter	(none)
Multiple cloning region	1-58
Luciferase gene (<i>luc+</i>)	88-1740
GLprimer2 binding site	89-111
SV40 late poly(A) signal	1772-1993
Enhancer	2013-2249
RVprimer4 binding site	2307-2326
ColE1-derived plasmid replication origin	2564
β -lactamase gene (<i>Amp^r</i>)	3329-4186
f1 origin	4318-4773
upstream poly(A) signal	4904-5057
RVprimer3 binding site	5006-5025

Antikörper

Tabelle A.8: In der Arbeit eingesetzte Primärantikörper. Bei den verwendeten monoklonalen Antikörpern sind die verwendeten Lot-Nummern und der Klon wenn verfügbar angegeben.

Antigen	Tier	Hersteller (#)	monoklonal	Anwendung	Verdünnung	Antikörper-Puffer
CREB-1	Kaninchen	Cell Signaling (#9197)	X (48H2) Lot-Nr.: 7, 14, 16	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
				ICC	1:800	HBSS + 0,1 % Triton X100
				IHC	1:400	Signal Stain Antibody Diluent
				Durchflussszy.	1:200	PBS
phospho-CREB-1 (Ser133)	Kaninchen	Cell Signaling (#9198)	X (87G3) Lot-Nr.: 10	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
				ICC	1:500	HBSS + 0,1 % Triton X100
				IHC	1:800	Signal Stain Antibody Diluent
phospho-CREB-1 (Ser121)	Kaninchen	Novus (#NB100-410)	polyklonal Lot-Nr.: B	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
phospho-CREB-1 (Thr100)	Kaninchen	Biorbyt (#orb127924)	polyklonal Lot-Nr.: I2772	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T

AIF1	Kaninchen	Cell Signaling (#5318)	X (D39D2) Lot-Nr.: 2	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
AKT	Kaninchen	Cell Signaling (#9272)	polyklonal	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
phospho-AKT (Ser473)	Kaninchen	Cell Signaling (#9271)	polyklonal	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
ATG-5	Kaninchen	Cell Signaling (#112994)	X (D5F5U) Lot-Nr. 2	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
ATG-7	Kaninchen	Cell Signaling (#8558)	X (D12B11) Lot-Nr. 2	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
β -Aktin	Maus	Sigma (#A2228)	X (AC74) Lot-Nr.:M4762	Western-Blot	1:5000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Cadherin (pan-spezifisch)	Kaninchen	Abcam (ab6529)	polyklonal	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
Catalase	Kaninchen	Biomol (BM-PA0060)	n/a	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
CD31	Kaninchen	Abbiotech (#250590)	n/a	IHC	1:200	PBS-T, 5 % Ziegen Serum
COX IV	Kaninchen	Novus (#NB110-39115)	polyklonal Lot-Nr.: B-1	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
E-Cadherin	Kaninchen	Cell Signaling (#3195)	X (24E10) Lot-Nr.: 5	Durchflusszy.	1:200	PBS
α -Enolase1	Kaninchen	GeneTex (GTX101803)	polyklonal Lot-Nr.: 39799	Western-Blot	1:2000	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
ERK-1/2	Kaninchen	Cell Signaling (#9102)	polyklonal	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
phospho-ERK1/2 (Thr202/204)	Kaninchen	Cell Signaling (#4370)	X (D1314.4E)	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling (#2118)	X (14C10) Lot-Nr.: 8	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
HIF 1- α	Kaninchen	Biorbyt (#orb223706)	X (n/a)	IHC	1:200	PBS-T, 5 % Ziegen Serum
Histon H3	Maus	Cell Signaling (#3638)	X (96C10) Lot-Nr.: 1	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
H-Ras	Kaninchen	Santa Cruz (#sc-520)	polyklonal Lot-Nr.: H059	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
Ki-67	Kaninchen	Novus (#NB110-89717)	polyklonal	IHC	1:250	PBS-T, 5 % Ziegen Serum
MEK1	Maus	Cell Signaling (#2352)	X (61B12)	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
PDK4	Kaninchen	Biorbyt (#orb11259)	polyklonal Lot-Nr.: A0841	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
Peroxiredoxin 4	Kaninchen	GeneTex (GTX116414)	polyklonal	Western-Blot	1:2000	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
PGAM1	Kaninchen	Biorbyt (#orb6704)	polyklonal Lot-Nr.: A4513	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
PGK1	Kaninchen	GeneTex (GTX107614)	polyklonal Lot-Nr.: 40009	Western-Blot	1:1000	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
PKM 1/2	Kaninchen	GeneTex	polyklonal	Western-Blot	1:5000	1 % (w/v) Milchpulver in

(GTX111604) Lot-Nr.: 40492				TBS-T		
PTEN	Maus	Cell Signaling (#9556)	X (26H9) Lot-Nr.: 2	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
RAS (pan-spezifisch)	Maus	Pierce (#16117)	X (n/a) Lot-Nr.: 6	Western-Blot	1:200	3 % (w/v) BSA in TBS-T
SUMO-1	Kaninchen	Cell Signaling (#4930)	polyklonal Lot-Nr.: 1	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
SUMO-2/3	Schaf	Enzo (#4930)	polyklonal	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
TOM20	Kaninchen	Biorbyt (#orb128858)	polyklonal Lot-Nr.: I3706	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T
TPI	Kaninchen	GeneTex (GTX104618)	polyklonal Lot-Nr.: 39624	Western-Blot	1:2000	1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
β -Tubulin	Maus	Oncogene	X (Ab-1) Lot-Nr.: 32900201	Western-Blot	1:2000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Ubiquitin	Maus	Millipore (#MAB1510)	X (Ubi1)	Western-Blot	1:1000	5 % (w/v) BSA in TBS-T

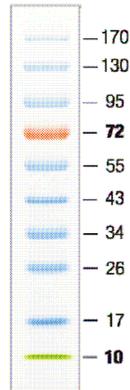
Tabelle A.9: Sekundärantikörper und direkt markierte Antikörper und ihre Anwendungen.

Antigen	Tier	Hersteller (#)	Markierung	Anwendung	Verdünnung	Antikörper-Puffer
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Cell Signaling (#7074)	HRP	Western-Blot	1:5000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
anti-Maus-IgG	Pferd	Cell Signaling (#7076)	HRP	Western-Blot	1:5000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
anti-Schaf-IgG	Esel	Sigma (#A3415)	HRP	Western-Blot	1:5000	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
H2Ld	Maus (IgG2 α)	Cedar lane (#C9011F)	FITC	Durchflussszy.	1:200	PBS
HER-2/neu	Maus (IgG1)	BD (#340552)	PE	Durchflussszy.	1:200	PBS
IgG1	Maus	BC (#A07796)	PE	Durchflussszy.	1:200	PBS
IgG2 α	Maus	BD (#553454)	FITC	Durchflussszy.	1:200	PBS
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Cell Signaling (#4412)	Alexa 488	Durchflussszy.	1:500/1:100	PBS
				ICC	1:1000	HBSS + 0,1% Triton X100
anti-Kaninchen-IHC Reagenz	--- ¹	Cell Signaling (#8114)	HRP	IHC	unverdünnt	---

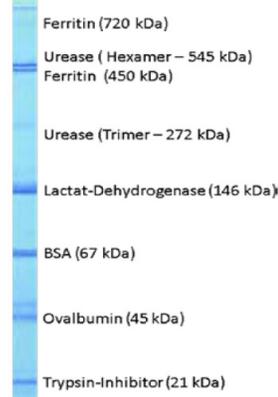
¹ - Polymer-basierendes Detektionsreagenz

Protein- und Nukleotidmarker

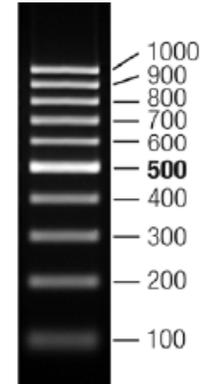
PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas # SM0671)



Native Marker Liquid mix for BN/CN (SERVA # 39219)



GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas #SM0234)

Zelllinien (nicht in dieser Arbeit etablierte Zelllinien)

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Resistenzen	Referenzen
NIH3T3	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	---	Todaro und Green, 1963
HER-2/neu ⁺	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	---	Herrmann et al., 2004
H-Ras ^{G12V}	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Neomycin	Seliger et al., 1988
K-Ras ^{G12V}	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Hygromycin B	Recktenwald et al., 2007
Mock	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Hygromycin B	Recktenwald et al., 2007
K-Ras wt	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Hygromycin B	Recktenwald et al., 2007
K-Ras ^{G13D}	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Hygromycin B	Recktenwald et al., 2007
K-Ras ^{Q61H}	Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)	Embryonales Bindegewebe	Hygromycin B	Recktenwald et al., 2007
CaCo2	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Fogh und Trempe, 1975
Colo206F	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Semple et al., 1978
Colo320	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Quinn et al., 1979
HCT116	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Kolonkarzinom	---	Brattain et al., 1981
HT29	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Fogh und Trempe, 1975
RKO	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Kolonkarzinom	---	Brattain et al., 1984
SW403	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Leibovitz et al., 1976
SW480	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Adenokarzinom	---	Leibovitz et al., 1976
CCD 841 CoN	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Kolon, Normalgewebe	---	ATCC [®] CRL-1790
MCF-7	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, Adenokarzinom	---	Soule et al., 1973
MCF-7 shNK	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, Adenokarzinom	G-418	R. Kiessling, Karolinska
MCF-7 shHER2	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, Adenokarzinom	G-418	R. Kiessling, Karolinska
H125	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Lunge, Adenosquamöses	---	Sherwin et al., 1981
H125 shNK	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Lunge, Adenosquamöses	G-418	R. Kiessling, Karolinska
H125 shHER2	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Lunge, Adenosquamöses	G-418	R. Kiessling, Karolinska
HTB-122	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, duktales Karzinom	---	Sennerstam, Auer 1990
HTB-122 E2	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, duktales Karzinom	G-418	Mimura et al., 2011
HTB-122 E2A	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Brust, duktales Karzinom	G-418	Mimura et al., 2011
HUV-EC-C ¹	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Nabelschnur	---	ATCC [®] CRL-1730

¹ – HUV-EC-C-Zellen wurden nur bis zu einer Passage von 18 verwendet.

Bakterien (*Escherichia coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5- α	F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[⁺ ::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Bullock et al., 1987

Der *E. coli*-Stamm DH5- α besitzt Mutationen, die die Transformationseffizienz erhöhen und wurde daher für die Vervielfältigung von Plasmiden verwendet. Die endA1-Mutation inaktiviert eine intrazelluläre Endonuklease, welche den Abbau der Plasmid-DNA durchführen könnte. Durch die hsdR17-Mutation wird die Aktivität einer Restriktionsendonuklease herabgesetzt, die DNA ohne eine EcoKI Methylierung abbaut. Die RecA1-Mutation schließt eine homologe Rekombination der Plasmide aus.

Der *E. coli*-Stamm XL-1 Blue besitzt ebenfalls die oben genannten Mutationen und wurde für die Plasmide der ortsgerechten Mutationen verwendet. Es lag dem dafür verwendeten Komplettsystem (Stratagene) bei.

Mausstämme (*Mus musculus*)

DBA-1-Stamm: Bezogen von Harlan (DBA/10laHsd)

Züchter: CC Little, 1909

Histokompatibilität: H-1^a, H-2^q, H-3^b, Thy-1^b

Biochemische Marker: Apo-a-1^b, Car-2^a, Es-1^b, Es-2^b, Es-3^c, Gpd-1^a, Gpi-1^a, Hbb^d, Idh-1^b, Ldr-1^a,
Mod-1^a, Pep-3^b, Pgm-1^b, Trf^b)

Fox nude-Stamm: Bezogen von Harlan (Hsd:Athymic Nude-Foxn1 nu)

Züchter: Flanagan, 1966

Es wurden für die Versuche homozygote Tiere verwendet, die keinen Thymus mehr aufwiesen.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer (geordnet nach der Aufführung in den Methoden)

2.1 Methoden der Zellkultur

Kulturmedium für NIH3T3, HER-2/neu⁺ und H-Ras^{G12V}-Zellen: Basismedium EMEM (1 x) mit 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS) hitzeinaktiviert, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin.

Kulturmedium für K-Ras^{G12V}-Zellen: Kulturmedium für NIH3T3, HER-2/neu⁺ und H-Ras^{G12V}-Zellen mit Zugabe von Hygromycin B (Endkonzentration: 150 µg/ml).

Kulturmedium für NC und shCREB-Zellen: Wie oben angegeben mit Zugabe von Puromycin (Endkonzentration: 3 µg/ml)

Kulturmedium für mCherry-markierte bzw. mit CREB-1-Expressionsvektor transfizierte Zellen: Wie oben angegeben mit Zugabe von Neomycin (Endkonzentration: 500 µg/ml)

Kulturmedium für HUVEC-Zellen: Basismedium F-12K (1 x) mit 2 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 0,004 mg/ml *Endothelial Cell Growth Supplement*, 0,1 ng/ml hEGF, 1 ng/ml hbFGF, 1 µg/ml Hydrocortison

Kulturmedium für humane Kolonkarzinomzelllinien und weitere Tumorzelllinien: Basismedium DMEM (1 x), mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin und 1 x Penicillin/Streptomycin.

PBS (10x): 684 mM NaCl, 13,4 mM KCl, 7,3 mM KH₂PO₄, 40,4 mM Na₂HPO₄ * 2H₂O, pH 7,4

Einfriermedium: Hitzeinaktiviertes FKS + 10 % (w/v) DMSO

Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl Lösung

2.2 Methoden der Mikrobiologie

TFB I: 10 mM KC₂H₃O₂ pH 5,8, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

TFB II: 10 mM 1x MOPS-Puffer, pH 7,0, 50 mM MnCl₂, 75 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 15 % (v/v) Glycerin

1x MOPS-Puffer, pH 7,0: 20 mM 3-[N-Morpholin]-propansulfonsäure-N'-[2-ethansulfonsäure], 5 mM NaC₂H₃O₂, 1 mM EDTA

SOC-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, nach dem Autoklavieren 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ sowie 20 mM Glukose durch Sterilfiltration zugeben.

LB-Medium: 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 5 g/L NaCl, pH 7,0

LB-Agar: 15 g Agar/l L LB-Medium, autoklavieren. Nach Abkühlen auf 50°C Ampicillin steril zugeben.

2.3 Methoden der Molekularbiologie

DNaseI-Reaktionspuffer: 10mM Tris-HCl pH 7,6, 2,5mM MgCl₂, 0,5mM CaCl₂

Proteinase K-Puffer: 100 mM TrisHCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % (w/v) SDS, 200 mM NaCl, 200 µg/ml RNase A, 200 µl/ml Proteinase K

TE-Puffer: 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

TAE-Laufpuffer (1 x): 40 mM Tris (pH 8,0), 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer (6 x): TAE-Puffer (1 x), 40 % (w/v) Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau

TBE-Puffer (10 x): 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

2.4 Methoden der Proteinbiochemie

Laemmli-Puffer (3 x): 187,5 mM TrisHCl pH 6,8, 6 % SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 0,015 % Bromphenolblau; reduzierend mit 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Puffer A: 225 mM Sorbitol, 75 mM Sucrose, 0,1 mM EGTA, 30 mM Tris-HCl pH 7,4

Puffer B: 10 µM KH₂PO₄, pH 7,4

Puffer C: 32 % (w/v) Sucrose, 30 % (v/v) Glycerin, 10 mM MgCl₂

Isotoner Puffer: 250 mM Sucrose, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA pH 7,4

Aktivierungspuffer: 2,5 % (v/v) Triton X-100 in A. dest.

Inkubationspuffer: 1,52 g Tris, 0,18 g CaCl₂, 0,05 g ZnCl₂, 250 ml A. dest. (pH 8,5)

Coomassiefärbelösung: 1 g Coomassie Blue G250, 400 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 500 ml A. dest.

Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

ACA-Puffer: 0,75 M 6-Aminohexansäure, 0,5 mM EDTA, 50 mM BisTris pH 7,0

BN-Kathodenpuffer: 50 mM Tricin, 15 mM BisTris und 0,002 % (w/v) Serva Blue G

BN-Anodenpuffer: 50 mM BisTris – HCl pH 7,0

Kathodenpuffer (pH 7,6): 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol

Anodenpuffer I (pH 10,4): 0,3 M Tris, 20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II (pH 10,4): 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol

TBS /TBS-T: 20 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, zusätzlich 0,1 % Tween 20 bei TBS-T

Strip-Lösung: 2,5 M Glycin, pH 2,3

Rabilloud-Puffer: 40 ml 7 M Harnstoff/Thioharnstoff-Lösung (21,02 g Harnstoff + 7,61 g Thioharnstoff in 40 ml H₂O lösen, 0,5 g Austauschere-Resin zugeben und mindestens zehn Min. rühren; wenn Resin vollständig entfärbt, erneut 0,5 g Resin zugeben. Dann Filtrieren durch Whatman-Filter), 2,57 g NDSB-256, 0,5 g DTT, 2 g CHAPS, 625 µl Pharmalytes, 30 µl 1 %ige Bromphenolblau-Lösung, ad 50 ml mit H₂O, Puffer ad 3-5 ml aliquotieren und bei –20°C lagern.

DTT-Puffer: 2 % SDS, 30 % Glycerin, 50 mM TrisHCl (pH 8,8), 6 M Harnstoff, 0,75 % (w/v) DTT

Iodacetamid-Puffer: 2 % SDS, 30 % Glycerin, 50 mM TrisHCl (pH 8,8), 6 M Harnstoff, 2,4 % (w/v) Iodacetamid

SDS-Puffer: 25 mM TrisHCl pH 8,8, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Agarose-Lösung: 0,5 g *low melting* Agarose in 50 ml SDS-Lösung und 25 µl Bromphenolblau-Lösung; auf 70°C erwärmen

Tris-EDTA-Puffer: 188 mM Tris pH 8,8, 1 mM EDTA

Tris-EDTA-Glycin-Puffer: 50 mM Tris pH 8,3, 300 mM Glycin, 1,8 mM EDTA

Färbelösung A: 3 % (w/v) FeCl₃ in A. dest.

Färbelösung B: 3 % (w/v) K₃[Fe(CN)₆] in A. dest.

CoxI-Färbelösung: 0,1 M TrisHCl pH 7,4, 0,14 mM NADH, 2 mg MTT pro 10 ml

Fixierlösung: 40 % Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

CoxII-Färbelösung: 50 mM KH₂PO₄ pH 7,4, 1 mg MTT pro 10 ml, 84 mM Succinate, 0,2 mM PMS, 4,5 mM EDTA

CoxIV-Färbelösung: 50 mM KH₂PO₄ pH 7,0, 0,2 mg Cytochrom c pro 10 ml, 20 mg DAB pro 10 ml, 75 mg Sucrose, 24 U/ml Katalase

CoxV-Färbelösung: 30 mM TrisHCl pH 8,0, 5 % (v/v) Glycerol, 10 mM ATP, 15 mM CaCl₂

Lysispuffer: 50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 mM N-Ethylmaleimid, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

Waschpuffer: wie Lysispuffer ohne NEM und Protease Inhibitor Cocktail

2.6 Methoden der Zellbiologie

Unterschicht: farbloses 20 % FKS-haltiges RPMI 1640 (mit Antibiotika, Glutamin und HEPES), 0,6 % Agar Noble

Deckschicht: farbloses 20 % FKS-haltiges RPMI 1640 (mit Antibiotika, Glutamin und HEPES), 0,3 % (w/v) Agar Noble und 90.000 Zellen pro 27 ml

Beschichtungslösung: EMEM ohne FKS, 0,03 mg/ml Kollagen I, 0,01 mg/ml Fibronectin, 0,01 mg/ml BSA

Färbelösung: 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphatpuffer (pH 6,0), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM Kaliumferrocyanid, 5 mM Kaliumferricyanid, 1 mg/ml X-Gal

2.8 Methoden der Histologie und Immunhistochemie

Weigerts Lösung A: 1 % (w/v) Hämatoxylin in 96 % (v/v) Ethanol

Weigerts Lösung B: 1,2 % (w/v) Eisen(III)-chlorid in 0,25 % (v/v) Salzsäure

Goldner-Lösung I: 0,05 % (w/v) Ponceau S, 0,01 % (w/v) Säurefuchsin, 0,2 % (v/v) Essigsäure

Goldner-Lösung II: 4 % (w/v) Phosphormolybdänsäure, 2 % (w/v) Orange G

Goldner-Lösung III: 0,2 % (w/v) Lichtgrün in 0,2 % (v/v) Eisessig

2.9 Methoden der Bioanalytik

Carbazol-Lösung: 0,125 % (w/v) Carbazol in absolutem Ethanol

Alcianblau-Lösung A: 0,25 % (v/v) Triton X-100, 0,018 M H₂SO₄, 10 % Alcian-Färbelösung, filtrieren

Alcian-Färbelösung: 1 g Alcianblau in 100 ml 18 mM H₂SO₄ lösen, dann 1/100 verdünnen, bei 600 nm eine Absorption von ~ 1,4 einstellen (durch Zugabe von zusätzlicher Farblösung), zentrifugieren (30 Min., 11.000 x g)

Alcianblau-Lösung B: 0,027 M H₂SO₄, 0,375 % (v/v) Triton X-100, 4 M Guanidin-HCl

DNSA-Reagenz: 100 mg DNSA und 3 g KNa-Tartrat in 5 ml A. bidest. lösen, 160 mg gemörseretes NaOH hinzugeben, unter Erwärmen im Wasserbad bei 50°C alles lösen und mit A. bidest. auf 10 ml auffüllen.

Drabkin-Reagenz: 0,0015 g KCN, 0,004 g NaOH, 0,0033 g K₃[Fe(CN)₆], 0,012 g Borsäure, ad 10 ml A. dest.

Phosphatfreier PTEN-Puffer: 100 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM DTT

AMM-Lösung: 0,034 % Malachitgrün, 10 mM Ammoniummolybdat in 1N HCl, 3,4 % Ethanol, 0,001 % Tween 20

NADH-Puffer: 100 µM NADH, 10 mM KH₂PO₄, pH 8,0

Reaktionspuffer: 50 mM KH₂PO₄ (pH 7,5), 90 µM Coenzym Q2, 55 µM DCPIP und 10 mM Natriumsuccinat

Detektionslösung: wässrige Lösung von 100 mM Sorbitol und 125 µM Xylenorange 100 : 1 mit 25 mM Ammoniumeisen(II)sulfat in 2,5 M Schwefelsäure mischen

Lösungsmittel A: 50 % CH₃CN, 25 mM H₃PO₄

Lösungsmittel B: 100 % CH₃CN, 25 mM H₃PO₄

II. Standardprotokolle

Färbeprotokolle Histologie

Tabelle A.10: Arbeitsschritte der Azan-Färbung nach Heidenheim.

Arbeitsschritt	benötigte Lösungen	Zeit [Min.]	Temperatur [°C]
Beizen	Anilinalkohol	25	38
Spülen	A. bidest.	1 x 0,5	RT
Färben	Azokarmin	35	56
Differenzierung	Anilinalkohol	2 - 8	RT
Abstoppen Differenzierung	essigsäures Ethanol	1	RT
Beizen	5 % (w/v) Phosphorwolframsäure	50	RT
Spülen	A. bidest.	1 x 0,5	RT
Gegenfärbung	Anilinblau-Goldorange-Essigsäure	150 - 180	RT
Spülen	A. bidest.	1 x 0,5	RT
Differenzierung	96 % (v/v) Ethanol	5	RT
Entwässern	100 % Ethanol	2 x 0,5	RT
Entwässern	Xylol	2 x 0,5	RT

Tabelle A.11: Arbeitsschritte der Masson Goldner-Färbung.

Arbeitsschritt	benötigte Lösungen	Zeit [Min.]	Temperatur [°C]
Färben	Weigerts Lösung A und B 1:1	2	RT
Waschen	Leitungswasser	10	RT
Färben	Goldner-Lösung I	10	RT
Spülen	Essigsäure (1 % (v/v))	0,5	RT
Differenzieren	Goldner-Lösung II	3	RT
Spülen	Essigsäure (1 % (v/v))	0,5	RT
Gegenfärben	Goldner-Lösung III	3	RT
Waschen	Essigsäure (1 % (v/v))	5	RT
Entwässern	70 % (v/v) Ethanol	1	RT
Entwässern	96 % (v/v) Ethanol	5	RT
Entwässern	100 % Ethanol	2 x 0,5	RT
Entwässern	Xylol	2 x 0,5	RT

Tabelle A.12: Arbeitsschritte der PAS-Färbung.

Arbeitsschritt	benötigte Lösungen	Zeit [Min.]	Temperatur [°C]
Hydrolyse	Periodsäure (1 % (v/v))	10	RT
Waschen	Leitungswasser	10	RT
Spülen	A. dest.	2 x 2	RT
Färben	Schiffs Reagenz	15	RT
Waschen	Leitungswasser	5	40
Spülen	A. dest.	1 x 0,5	RT
Entwässern	96 % (v/v) Ethanol	5	RT
Entwässern	100 % Ethanol	2 x 0,5	RT
Entwässern	Xylol	2 x 0,5	RT

Protokoll für die Aufarbeitung von Proben für die MALDI-TOF-MS (tryptischer in Gel-Verdau)

Tabelle A.13: Arbeitsschritte des tryptischen in Gel-Verdau für ein 2D-Gelstanzstück (~1,5 mm Durchmesser).

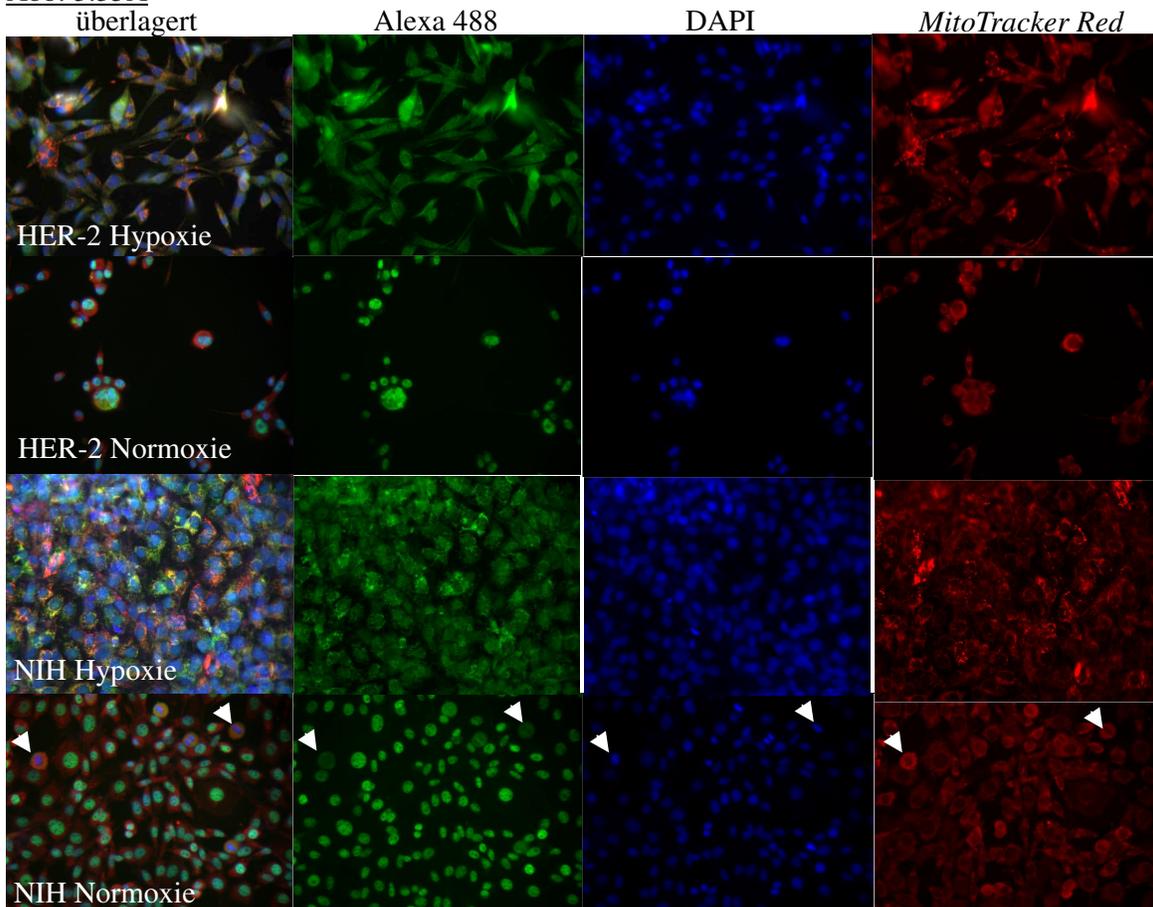
Arbeitsschritt	Benötigte Lösungen oder Materialien	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]
Entfärben	100 µl 50 % (v/v) Acetonitril	RT, schüttelnd	ü.N.
ÜS verwerfen	Überstand mit <i>Gel safer tip</i> abnehmen	RT	---
Entfärben	100 µl 50 % (v/v) Acetonitril	RT, schüttelnd	120
Zentrifugieren	Kurz anzentrifugieren, ÜS abnehmen	RT	0,5
Entwässern	50 µl 100 % Acetonitril, anzentrifugieren, ÜS abnehmen	RT	---
Entwässern	50 µl 100 % Acetonitril, anzentrifugieren, ÜS abnehmen	RT	---
Trocknen	Lufttrocknen	RT	20
Quellen	3 µl Trypsinlösung (in 25 mM NH ₄ HCO ₃ , 100 mM CaCl ₂)	4	120
Auffüllen	Eventuell 2 µl 25 mM NH ₄ HCO ₃ , 100 mM CaCl ₂ zugeben	RT	---
Inkubieren	In Folie eingeschlagen und im Brutschrank inkubieren	37	1440
Einfrieren	Bis zur weiteren Verwendung einfrieren	-20	---
Auftauen		RT	---
Extrahieren	Beschallen im Ultraschallbad	RT	15
Zentrifugieren	Kurz anzentrifugieren	RT	0,5
Mischen	1 µl Matrix ¹ mit 1 µl ÜS in <i>Protein Low Bind Tube</i> mischen	RT	---
Auftragen	Auf eine MALDI-Platte ² geben und Lufttrocknen	RT	---

¹ – Zur Herstellung der Matrix werden 300 µl Acetonitril, 1 µl TFA und 699 µl Ampuwa gemischt. Diese Mischung wird nun zu 200 µl einer gesättigten Lösung an α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (ca. 20 mg/ml in 95 % (v/v) Acetonitril) gegeben und im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation dient der klare Überstand als Matrix.

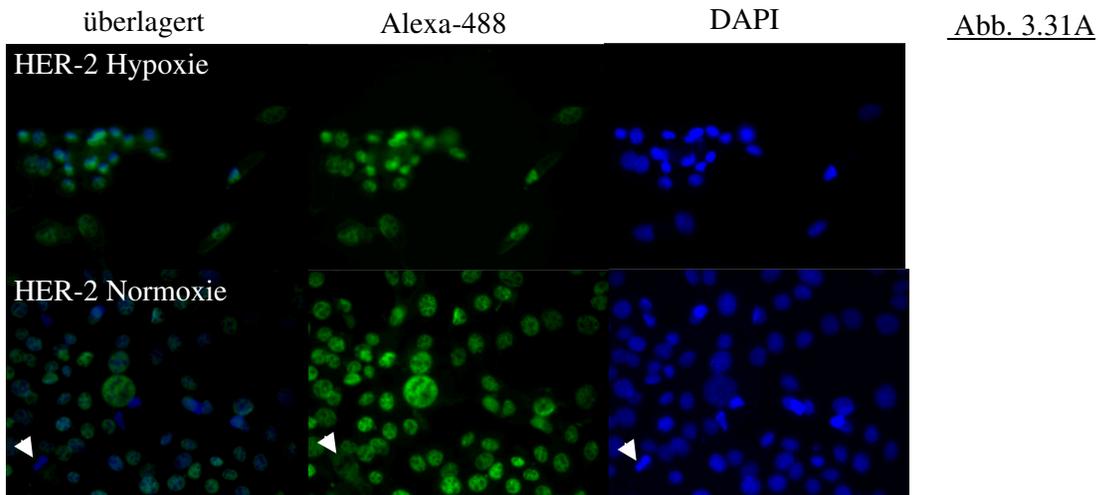
² – MTP AnchorChip™ 800/384 T F (Bruker)

III. Einzelfärbungen der Immunzytochemie

Abb. 3.35A



Die weißen Pfeile kennzeichnen sich teilende Zellen, bei denen CREB nicht mehr im Kern vorkommt.



IV. Kontrolleexperimente mit den *Rescue*-Klonen

Da durch die Verwendung von shRNA-Konstrukten Sekundäreffekte nicht auszuschließen sind (u.a. durch den Ort des Plasmid-Einbaus begründet), wurde in die CREB-defizienten shCREB-Zelllinien ein „*Rescue*-Plasmid“ transfiziert, welches für eine von der shRNA nicht targetierbare CREB-mRNA kodiert. In Abb. A2A sind am Beispiel der HER-2/neu⁺-Zelllinien die nicht in der CREB-Expression veränderten parentalen Zellen und NC-Kontrollen (schwarze Balken) mit den shCREB-Klonen 1 und 2 und einer shCREB-Batchkultur (weiße Balken) verglichen. In die CREB-defizienten Zellen wurden die *Rescue*-Varianten transfiziert, was zu den *Rescue*-Batch 1 (RB1), *Rescue*-Klon1 (RK1) (jeweils hervorgegangen aus shCREB-Klon 1), sowie der *Rescue*-Batch-Kultur 2 (RB2) (aus dem shCREB-Klon 2 hervorgegangen) führte, die wiederum eine verstärkte Expression von CREB aufwiesen. Obwohl die Oberflächenpräsentation von HER-2/neu nicht verändert war (Abb. A2B), bildeten die *Rescue*-Zellen wieder Foci aus, was als Revertierung zum onkogenen Phänotypen gewertet wurde (Abb. A2C). Ebenfalls waren die Zellen mit dem *Rescue*-Plasmid zu einer verstärkten Migration als die shCREB-Zellen befähigt (Abb. A2D) und sekretierten vermehrt MMPs (Abb. A2E), was auch die Invasivität der *Rescue*-Zellen im Vergleich zu den CREB-defizienten shCREB-Zellen erhöhte (Daten nicht gezeigt). Auf Weichagar ist die Koloniebildung der CREB-rekonstituierten *Rescue*-Kultur im Vergleich zu shCREB-Zelllinie und der parentalen HER-2/neu deutlich erhöht (Abb. A2F).

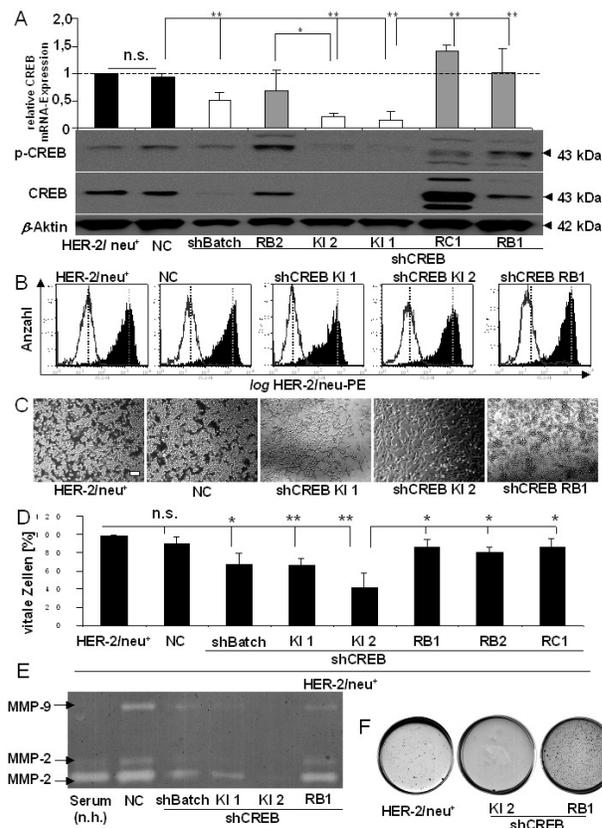
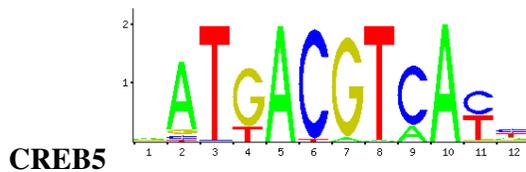
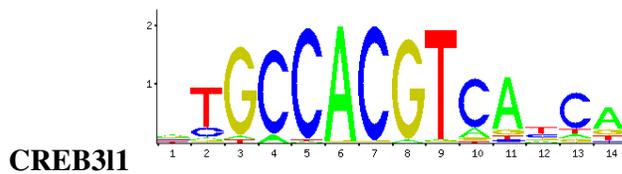
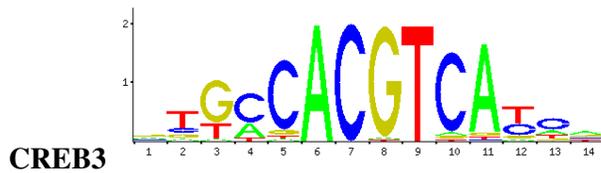
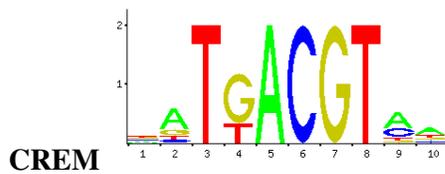
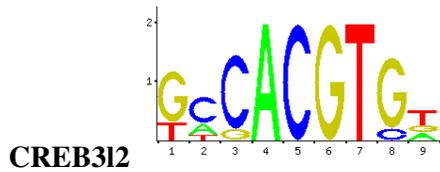
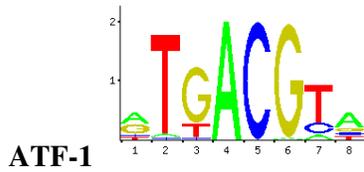
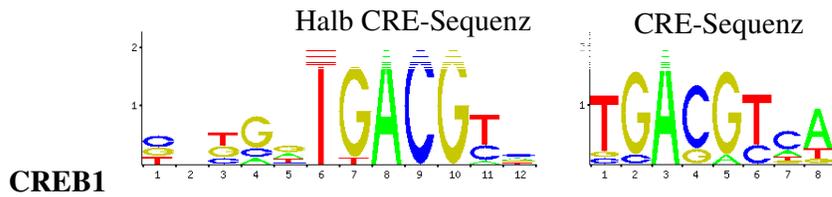


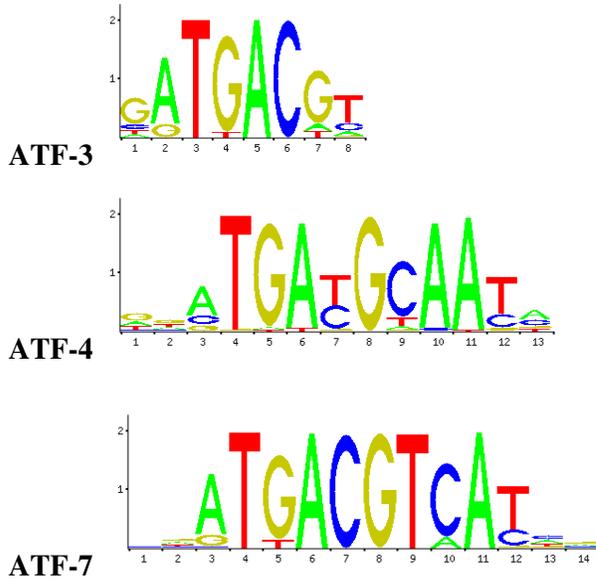
Abbildung A.2: Kontrolleexperimente der *Rescue*-Klone. **A.** Untersuchung der CREB-mRNA-Expression (oben) und der Proteinexpression/Aktivität (unten) in *Rescue*-Batchkulturen (RB) und Klonen (RC). **B.** Beschreibung der Morphologie mittels Mikroskopie. Der Balken steht für 80 μ m. **C.** Bestimmung der HER-2/neu-Oberflächenpräsentation mittels Durchflusszytometrie. Die schwarze Fläche entspricht HER-2/neu und die weiße Fläche der IgG-Kontrolle. **D.** Die Vitalität der Zellen wurde nach PI/AnnV-Färbung mittels Durchflusszytometrie gemessen (n = 2). **E.** Messung der MMP-Aktivität durch Zymographie. **F.** Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums durch Weichagar-Wachstum.

V. DNA-Bindemotive von bZIP-Transkriptionsfaktoren (JASPAR-Datenbank)

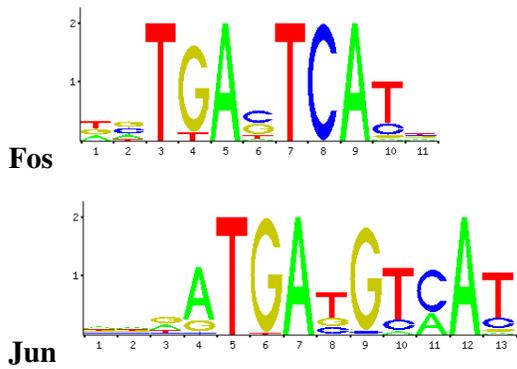
Übersicht über die DNA-Bindemotive der bZIP-Familie CREB



Übersicht über die DNA-Bindemotive der bZIP-Familie ATF X



Übersicht über die DNA-Bindemotive der bZIP-Familie jun/fos



VI. Patientendaten

Tabelle A.14: Brustkrebskollektiv und Tumorcharakteristiken (n =112). Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Manuela Iezzi (Zentrum für Altersforschung, Universität Chieti, Italien) erhoben. (Steven et al., 2013)

Variable	Wert (%)
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (Jahre)	
Median	56,1
< 50	35 (31,3)
50 – 65	48 (42,9)
> 65	29 (25,9)
Menopausaler Status	
Prä- oder Perimenopausal	36 (32,1)
Postmenopausal	76 (67,9)
Tumorgröße	
≤ 2 cm	70 (62,5)
> 2 cm	42 (37,5)
Histotyp	
Duktales Karzinom	86 (76,8)
Lobuläres Karzinom	16 (14,3)
Anderer Histotyp	10 (8,9)
Tumorgrad	
1	13 (11,6)
2-3	99 (88,4)
Östrogenrezeptorexpression	
Negativ	25 (22,3)
Positiv	87 (77,7)
Progesteronrezeptorexpression	
Negativ	40 (35,7)
Positiv	72 (64,3)
Ki-67-Expression	
Niedrig	57 (50,9)
Hoch	55 (49,1)
HER-2-Expression	
Negativ	93 (83,0)
Positiv	19 (17,0)
pCREB (Ser ¹³³)-Aktivität	
Negativ	68 (60,7)
Positiv	44 (39,3)

Tabelle A.15: pCREB(Ser¹³³)-Status in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter in T1-T2, N0 Brustkrebspatienten (n = 112). Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Manuela Iezzi (Zentrum für Altersforschung, Universität Chieti, Italien) zur Verfügung gestellt. (Steven et al., 2013)

Variable	pCREB (Ser ¹³³)			R
	Negativ: n (%)	Positiv: n (%)	P [°]	
Tumorgröße				
≤ 2 cm	44 (64,7)	26 (59,1)	0,556	0,057
> 2 cm	24 (35,3)	18 (40,9)		
Tumorgrad				
1	6 (8,8)	7 (15,9)	0,365	-0,108
2-3	62 (91,2)	37 (84,1)		
Östrogenrezeptor				
negativ	15 (22,1)	10 (22,7)	1,000	-0,008
positiv	53 (77,9)	34 (77,3)		
Progesteronrezeptor				
negativ	27 (39,7)	13 (29,5)	0,316	0,104
positiv	41 (60,3)	31 (70,5)		
Ki-67-Expression				
niedrig	38 (55,9)	19 (43,2)	0,246	0,124
hoch	30 (44,1)	25 (56,8)		
HER-2/neu-Expression				
negativ	61 (89,7)	32 (72,7)	0,037 *	0,22
positiv	7 (10,3)	12 (27,3)		

[°] Pearson's χ^2 -Test. *Statistisch signifikant. Abkürzung: (R) Pearson's R Korrelation

Tabelle A.16: Expressionsmuster von CREB in Kolorektalkarzinom-Läsionen im Bezug zu dem K-Ras-Status ($n = 23$). Patienten mit einem mutierten K-Ras12 sind in grün hinterlegt. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser (Institut für Pathologie, Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. (Steven et al., 2015)

<u>Immunoscore:</u>	0	1-10	11-50	51-79	>80	<u>Anteil der gefärbten Zellen</u>
	0	1	2	3	4	
	neg	schw. pos	pos	stark pos		<u>Färbeintensität</u>
	0	1	2	3		

Histologische Besonderheiten:

zyto – zytoplasmatische Lokalisation

stroma – Stroma Lokalisation

invasion – Invasionsfront

Patienten Nr.	KRas12 Status	CREB Score	CREB Summe	pCREB Ser ¹³³ Score	pCREB Ser ¹³³ Summe	pCREB Ser ¹²¹ Score	pCREB Ser ¹²¹ Summe
7201-06	MUT	4+3	12	1+3	3	2+3;3+1	6
8025-06	MUT	4+3	12	0+0	0	0	0
15660-06	MUT	3+3	9	1+3	3	1+3	3
5543-07	MUT	3+2	6	3+1 (zyto)	3 (zyto)	3+2 (zyto)	6 (zyto)
15343-07	WT	2+2	4	3+1 (zyto)	3 (zyto)	2+2 (zyto)	4 (zyto)
1850-08	MUT	4+3	12	4+1 (zyto)	4 (zyto)	3+1 (zyto)	3 (zyto)
2190-08	WT	4+3	12	0+0	0	1+3	3
10475-08	WT	3+3	9	1+3; 3+1 (zyto)	3; 3 (zyto)	1+3; 3+1	3
13599-08	MUT	4+3	12	1+3	3	2+2; 3+1 (zyto)	4
20009-08	WT	2+2	4	0+0	0	0	0
16019-09	WT	4+3	12	2+3	6	3+3	6
17490-09	MUT	4+3	12	3+1 (zyto)	3 (zyto)	4+3 (zyto); 1+3	3; 12 (zyto)
19572-09	WT	4+3	12	1+3 (stroma)	3 (stroma)	2+3; 4+1 (zyto)	6; 4 (zyto)
21823-09	WT	4+3	12	1+3; 2+1	3	2+3; 4+1	6
22035-09	MUT	3+3	9	0+0; 3+3 (invasion)	0, 9 (invasion)	2+1; 3+3 (invasion)	2; 6 (invasion)
826-10	MUT	2+2	4	3+2-3	9	2+3	6
1699-10	MUT	4+3	12	1+3; 3+1	3	1+3	3
2453-10	WT	4+3	12	1+3; 2+2; 3+1	4	0	0
3559-10	WT	2+3	6	3+3; 4+1	9	2+1	2
5446-10	MUT	4-3+3	12	1+3; 4+1 (zyto)	3, 4 (zyto)	2+2 (zyto)	4 (zyto)
10917-10	MUT	4+3	12	2+3; 3+2	6	2+3	6
15165-10	WT	4+3	12	1+3; 2+2; 3+1	4	1+3	3
16884-10	MUT	4+3	12	1+3; 3+2	6	1+2	2
			range 4-12		range 0-9		range 0-12
Summe MUT		MUT 13	MUT 10,46		MUT 4,3		MUT 4,7
Summe WT		WT 10	WT 9,5		WT 3,5		WT 3,3

VII. Kaplan-Meier-Überlebenskurven (erstellt mit KMplot.com)

Dargestellt sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die jeweilige Tumorentität. Patienten mit einer verstärkten CREB-Expression sind mit der roten Linie dargestellt, Patienten mit einer geringen CREB-Expression sind mit der schwarzen Linie gekennzeichnet. Das Überleben wurde über einen Zeitraum von etwa 13 bis 20 Jahren verfolgt. Die Anzahl der Patienten ist unterhalb der Kurven angegeben.

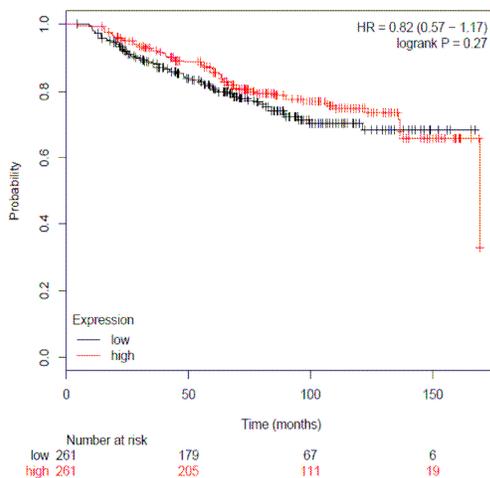
A. Mammakarzinom

Gesamtüberleben

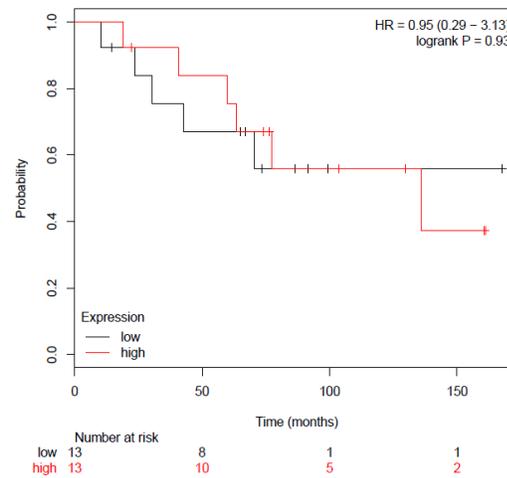
Affymetrix ID:	225572_at	CREB1
Survival:	OS	
Split patients by:	Median	
Follow up threshold:	All	
Censore at threshold:	Checked	
Compute median over entire database:	False	
Cutoff value used in analysis:	1266	
Expression range of the probe:	666 - 1581	
Probe set option:	user selected probe set	
Invert HR values below 1:	not checked	

Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und HER-2/neu

Alle Daten

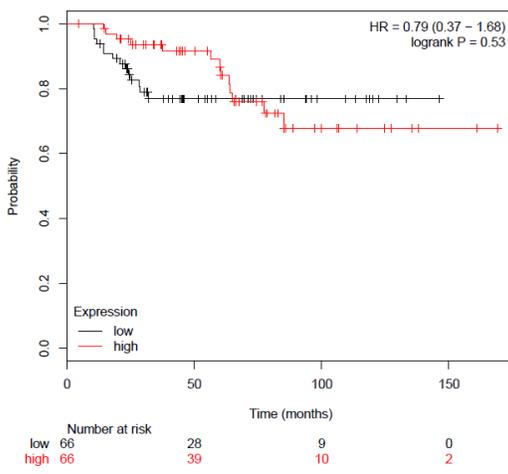


HER2-positiv

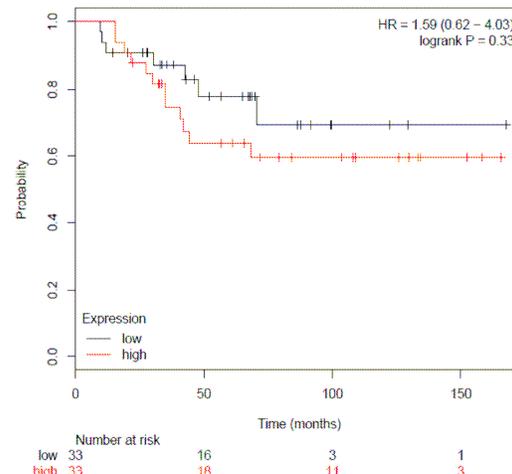


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und den St. Gallen-Typen

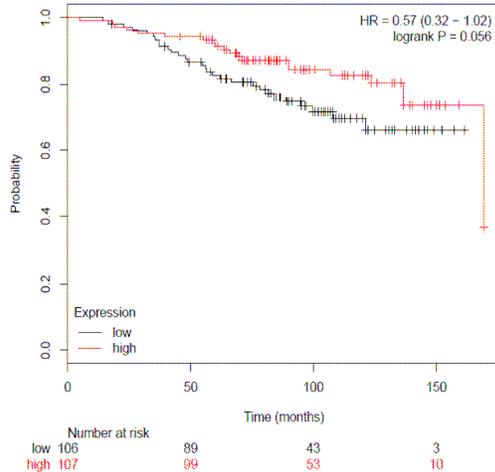
Basaler Typ (ESR1-, HER-2-, "Triple negativ")



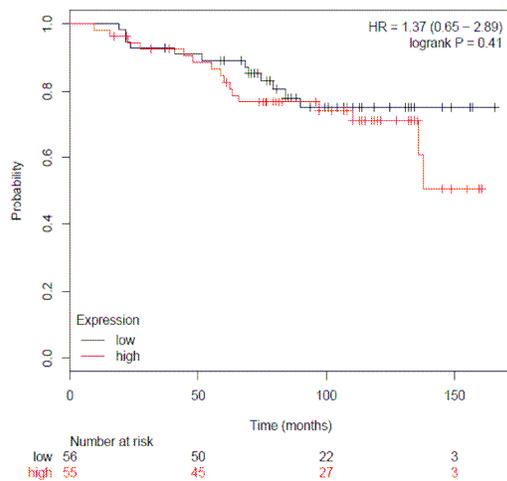
HER-2-Typ (ESR1-, HER-2+)



Luminal Typ A (ESR1+, HER-2-, MKI67 niedrig)

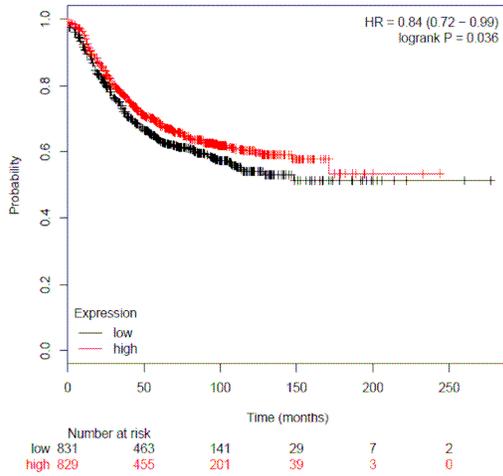


Luminal Typ B (ESR1+, HER-2- oder +, MKI67 hoch)

*relapse free survival (Rezidiv-freies Überleben)*

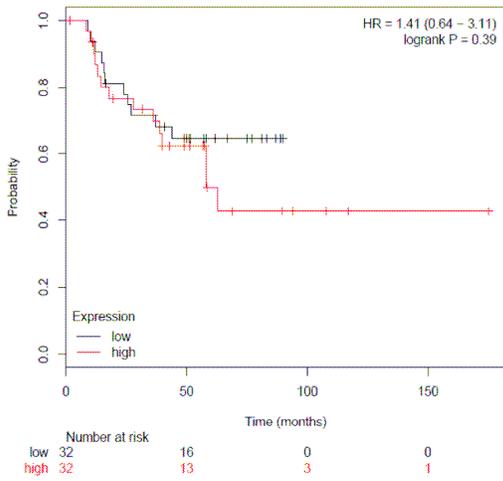
Affymetrix ID:	225572_at	CREB1
Survival:	RFS	
Split patients by:	median	
Follow up threshold:	all	
Censore at threshold:	checked	
Compute median over entire database:	false	
Cutoff value used in analysis:	1137	
Expression range of the probe:	117 - 2672	
Probe set option:	user selected probe set	
Invert HR values below 1:	not checked	

Alle Daten

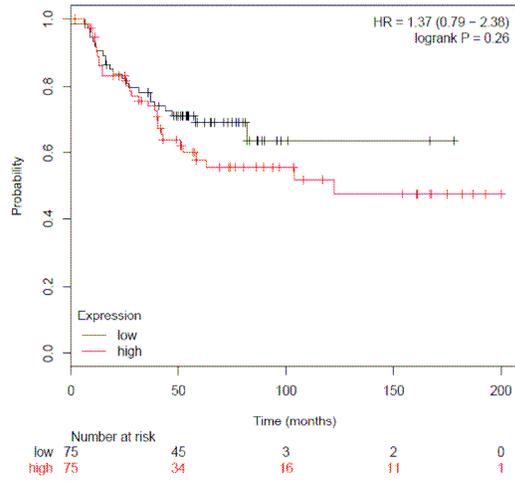


Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und den Rezeptoren

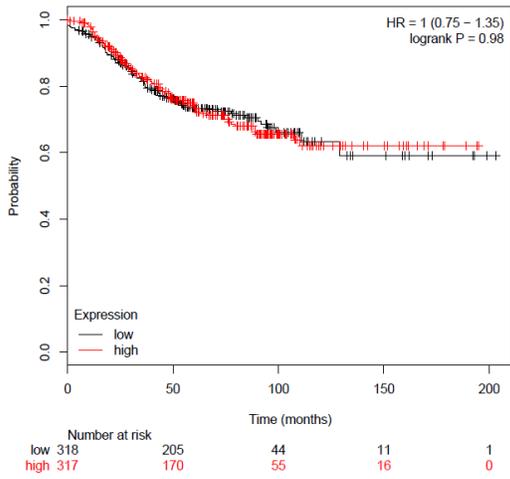
Nur HER2-positiv, ER und PR negativ



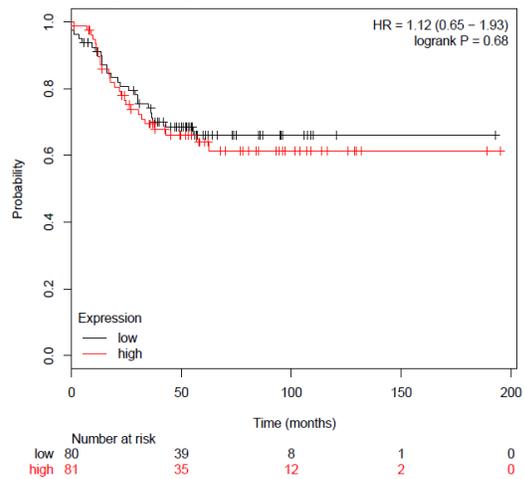
HER-2-positiv, ER und PR Status beliebig



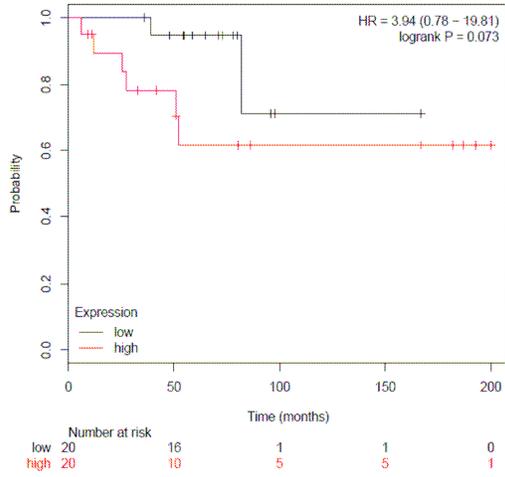
HER-2-negativ, ER und PR Status beliebig



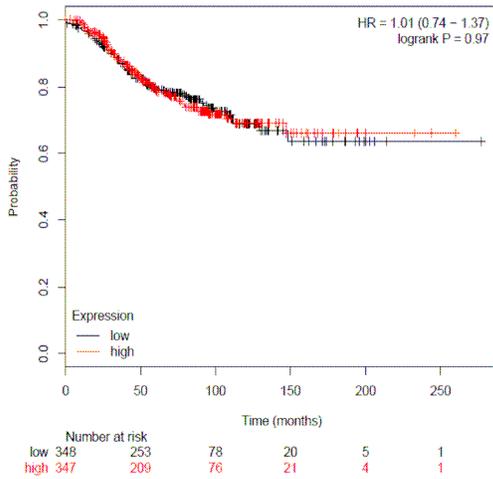
triple negativ



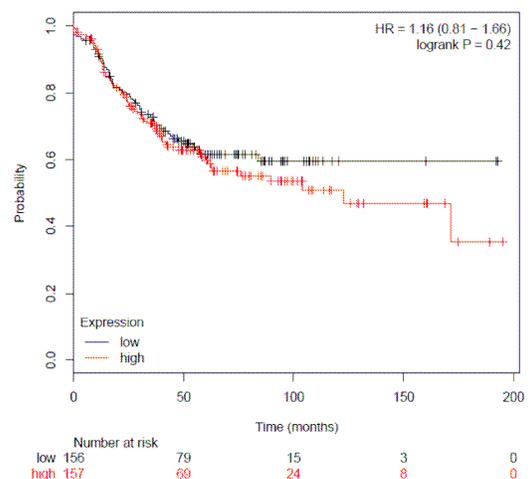
triple positiv



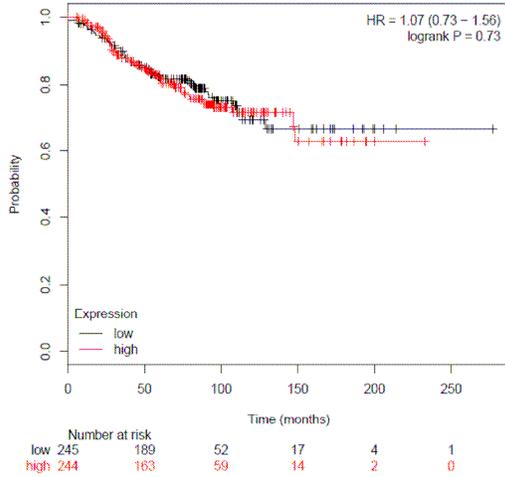
ER positiv, HER und PR Status beliebig



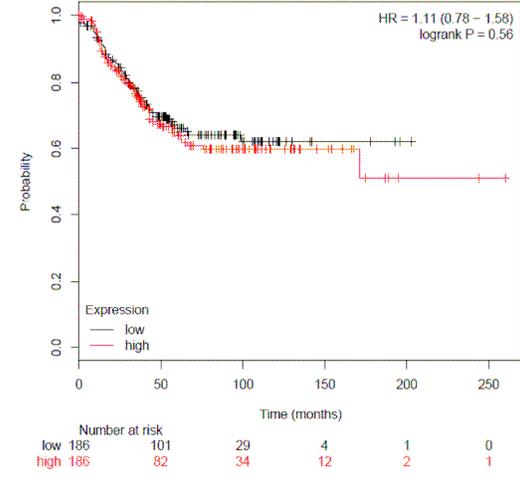
ER negativ, HER und PR Status beliebig



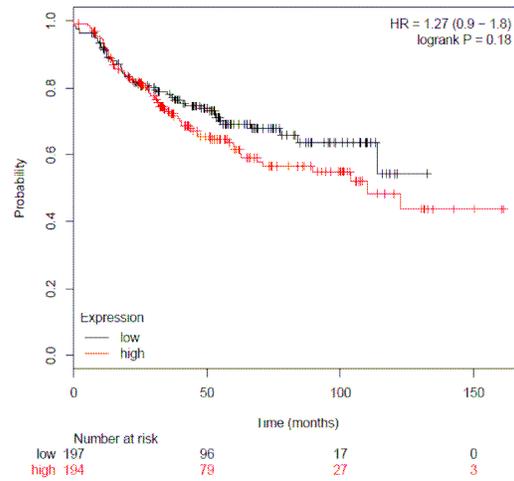
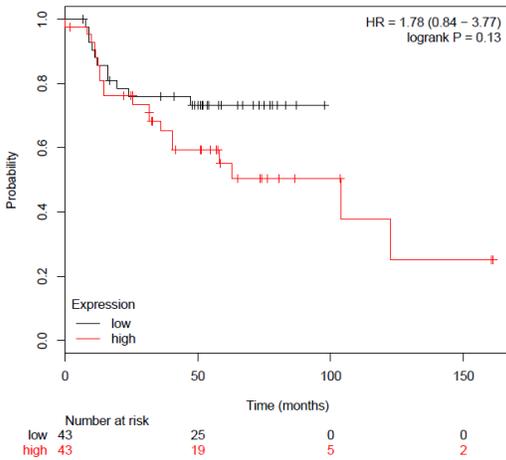
PR positiv, HER und ER Status beliebig



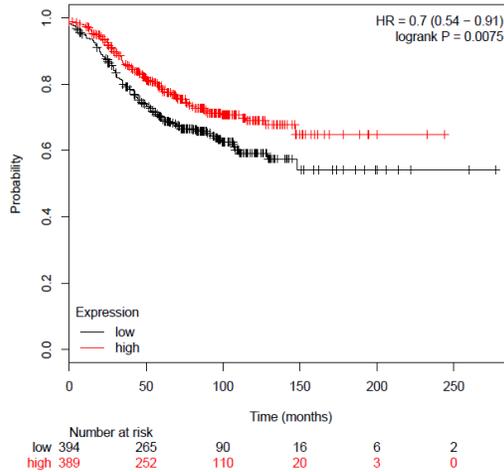
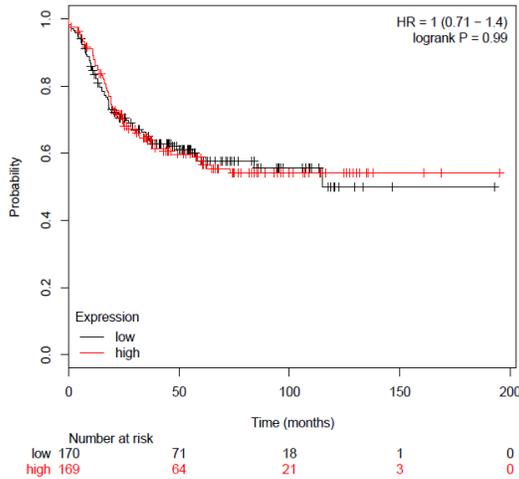
PR negativ, HER und ER Status beliebig



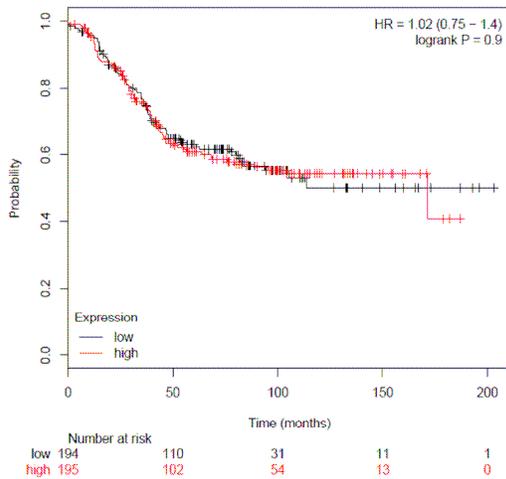
Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorgrad
 HER-2-positiv, ER, PR Status beliebig, Grading Typ 3 alle, Grading Typ 3



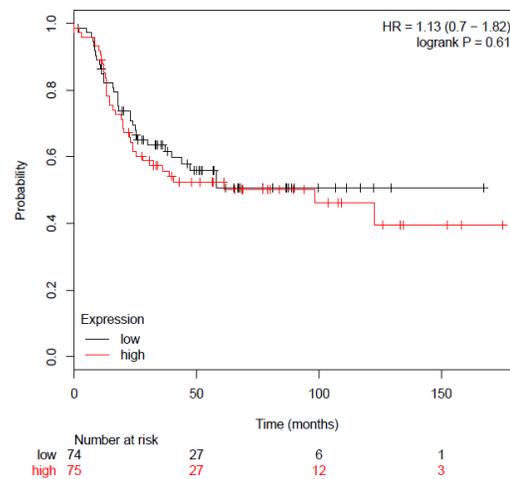
Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und den St. Gallen-Typen
 Basaler Typ (ESR1-, HER-2-, "Triple negativ") Luminal Typ A (ESR1+, HER-2-, MKI67 niedrig)



Luminal Typ B (ESR1+, HER-2- oder +, MKI67 hoch)

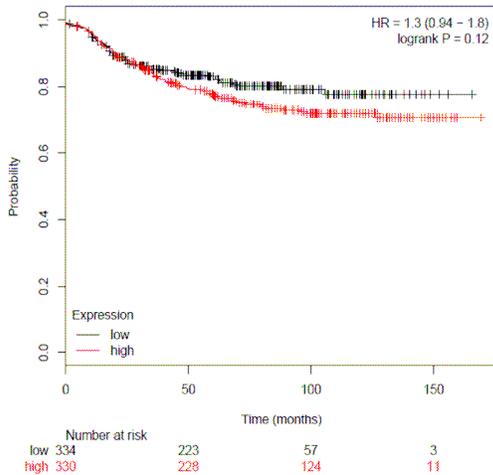


HER-2-Typ (ESR1-, HER-2+)



Distant metastasis free survival (Zeitpunkt bis zur Detektion von Metastasen)

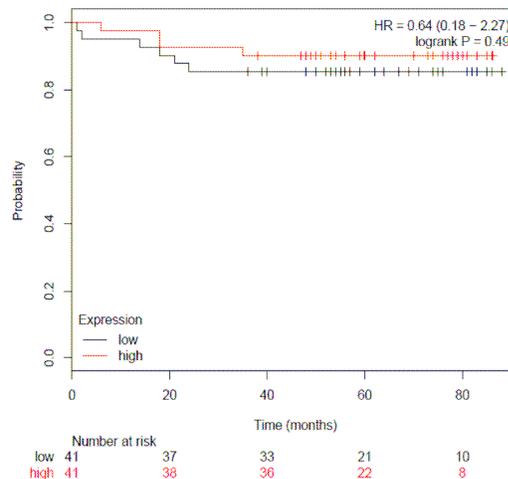
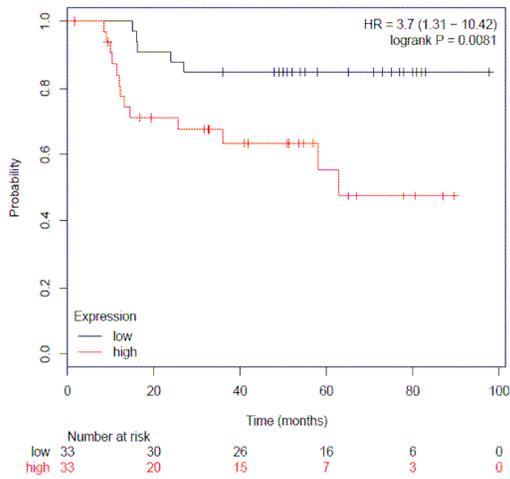
alle Daten



Metastasenfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und den Rezeptoren

HER-2/neu positiv

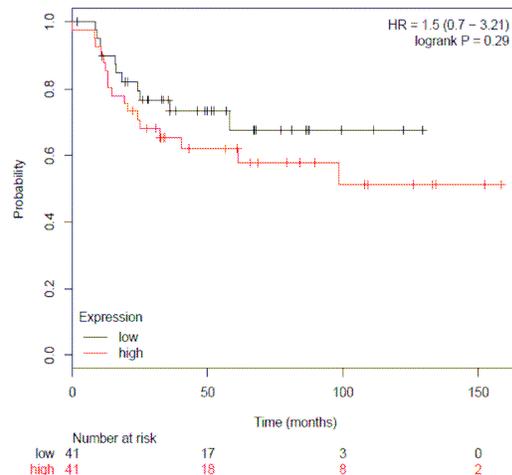
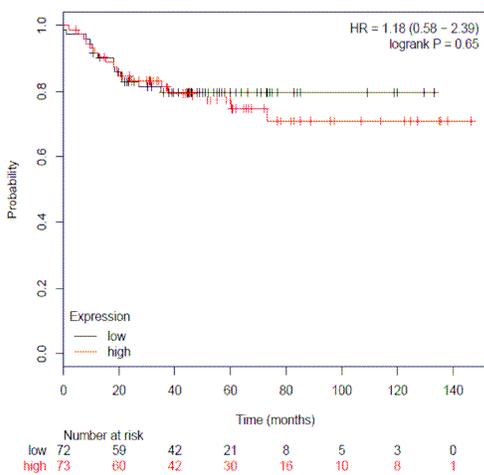
HER-2/neu negativ



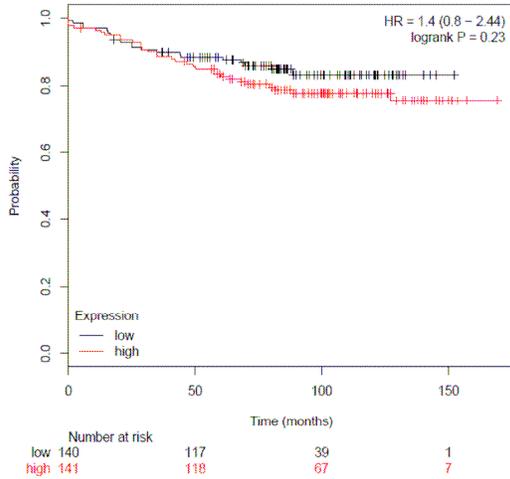
Metastasenfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und den St. Gallen-Typen

Basaler Typ (ESR1-, HER-2-, "Triple negativ")

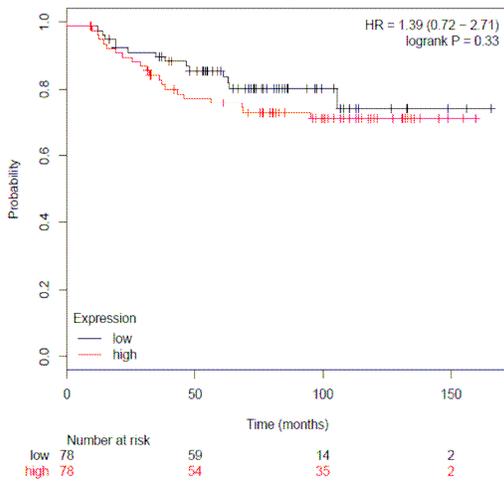
HER-2-Typ (ESR1 negativ, HER-2 positiv)



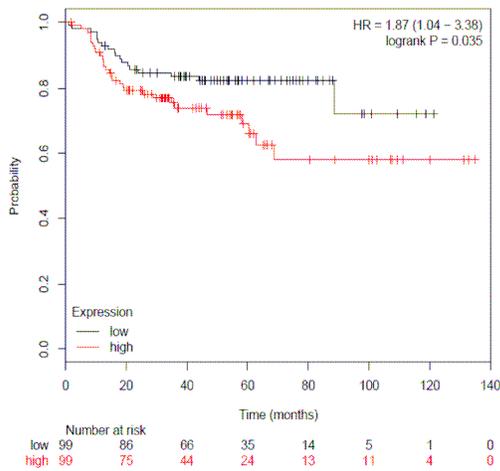
Luminal A Typ (ESR1 positiv, HER-2 negativ, MKI67 niedrig)



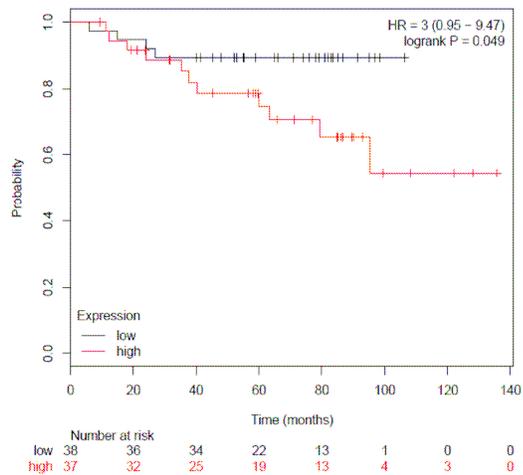
Luminal Typ B (ESR1 positiv, HER-2 negativ oder positiv, MKI67 hoch)



Metastasenfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorgrad alle, Grading Typ 3



alle, Grading Typ 2

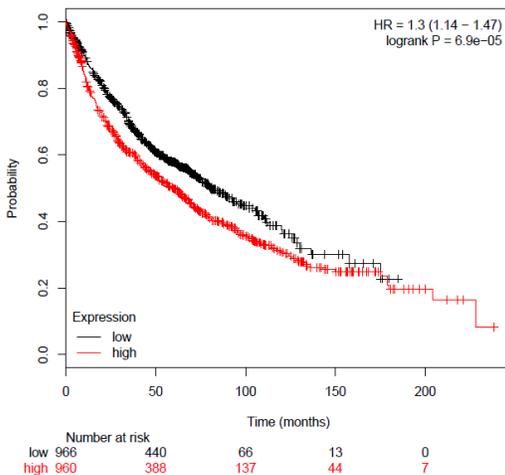


B. Bronchialkarzinom

Gesamtüberleben

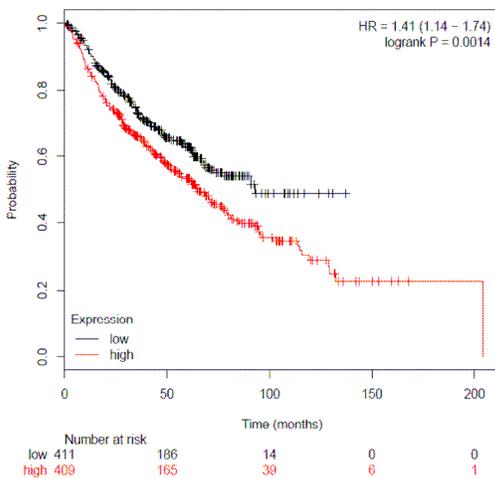
Affymetrix ID: 204312_x_at CREB1
Survival: OS
Split patients by: median
Follow up threshold: all
Censore at threshold: checked
Compute median over entire database: false
Cutoff value used in analysis: 330
Expression range of the probe: 10 - 1227
Probe set option: user selected probe set
Invert HR values below 1: not checked

alle Daten

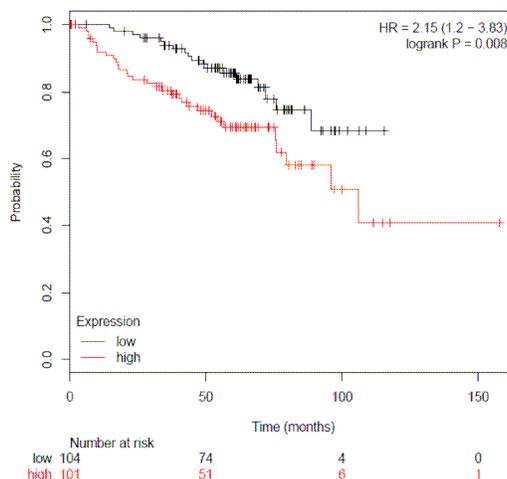


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Status Raucher/Nichtraucher

Raucher

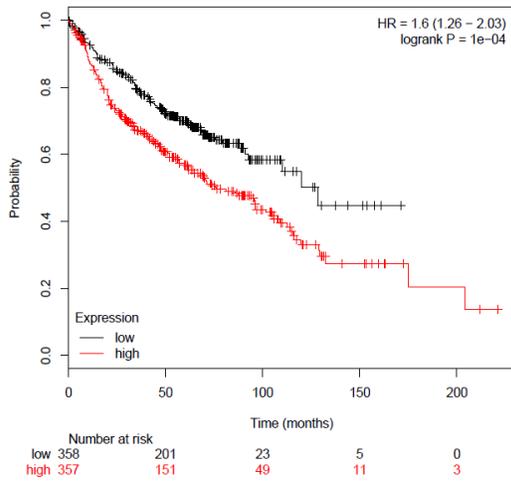


Nichtraucher

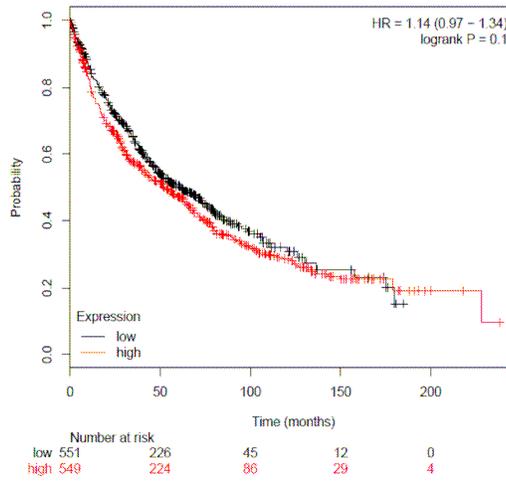


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Geschlecht

weiblich

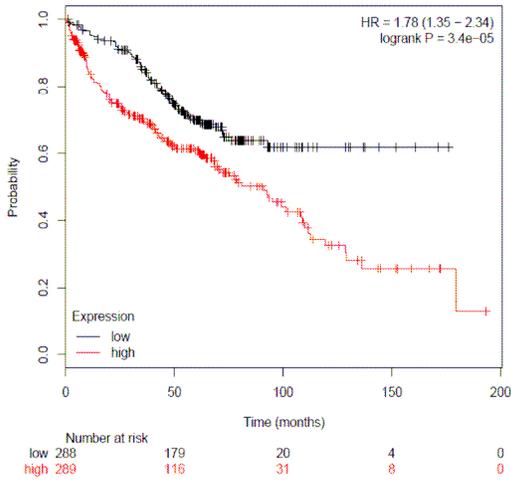


männlich

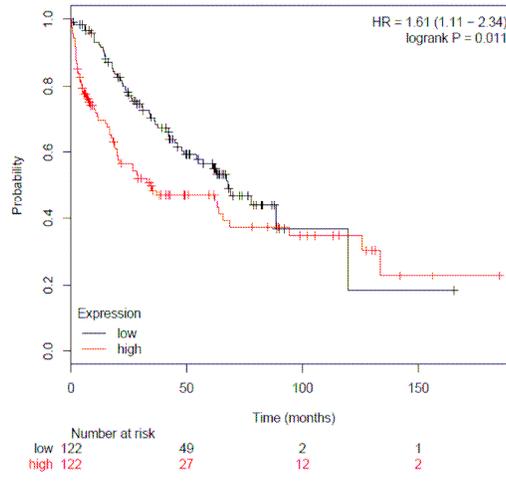


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorstadium

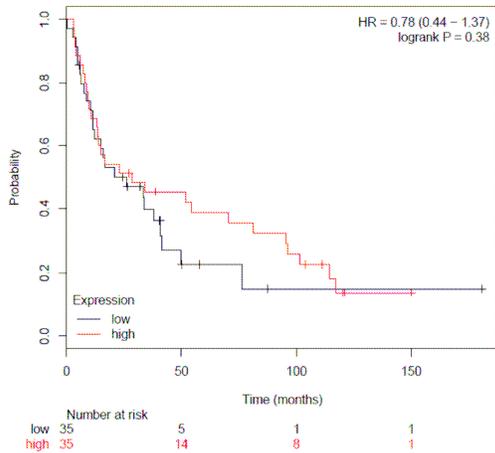
Stage 1



Stage 2



Stage 3

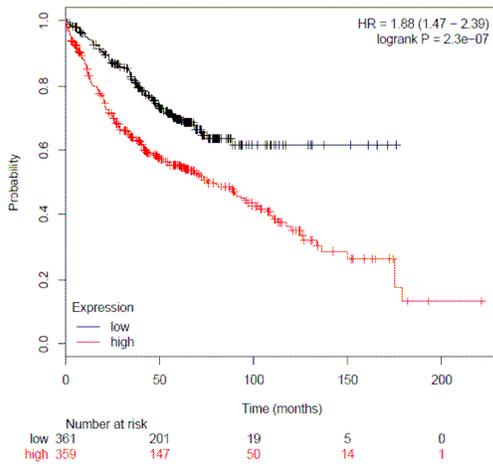


Stage 4

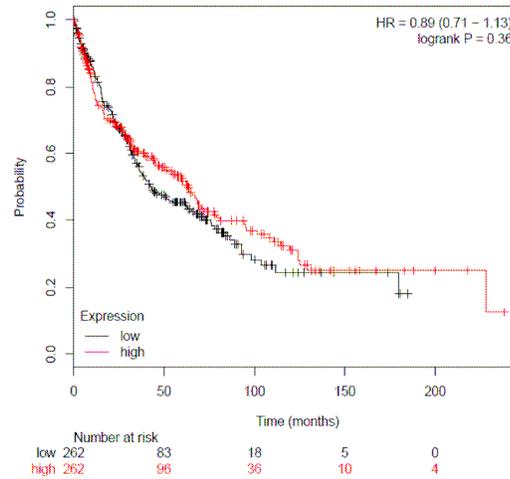
Für Stage 4 standen nicht genug Patientendaten zur Verfügung

Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Histotypen

Adenokarzinom

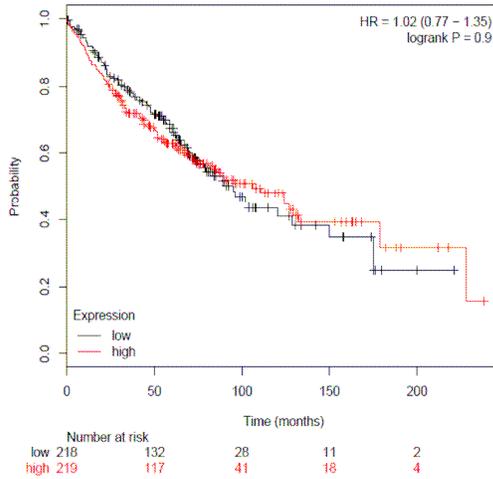


Plattenepithelkarzinom (*Squamous cell*)

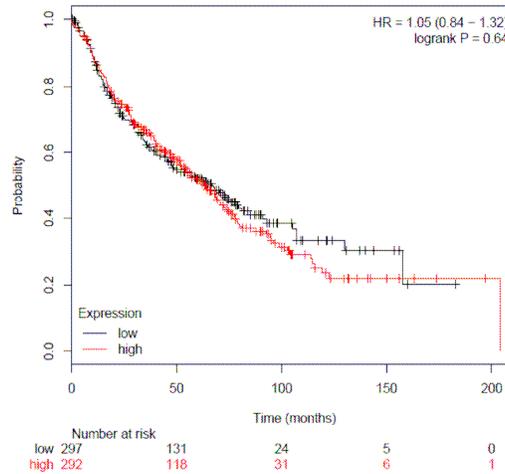


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und den TNM-Kriterien

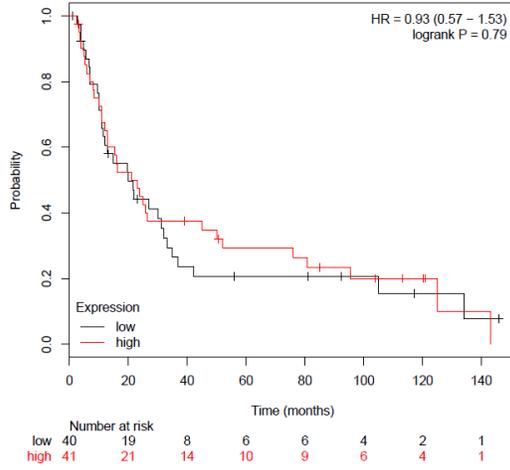
Stage T1



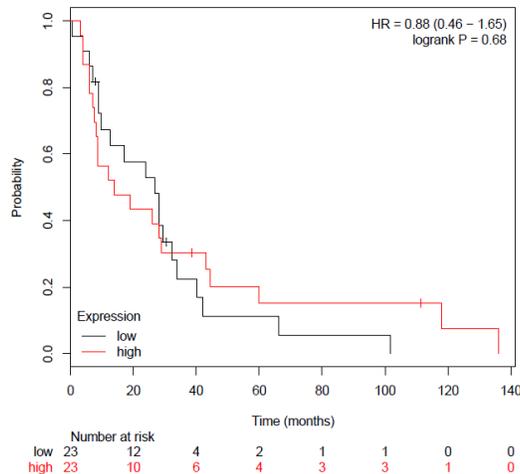
Stage T2



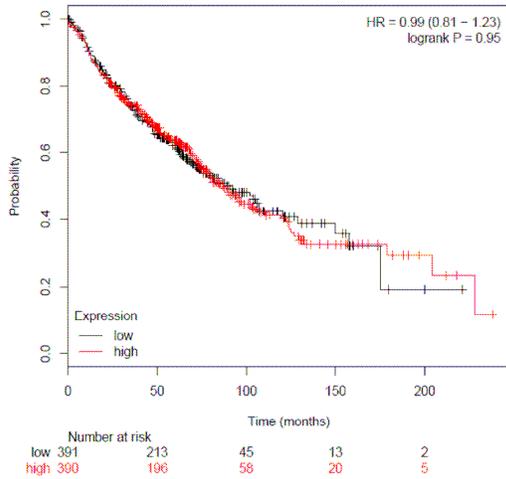
Stage T3



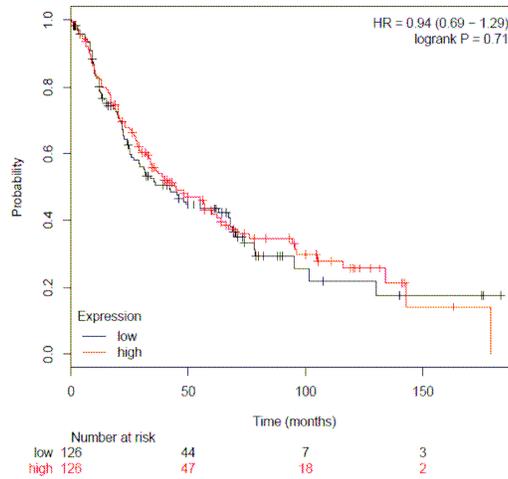
Stage T4



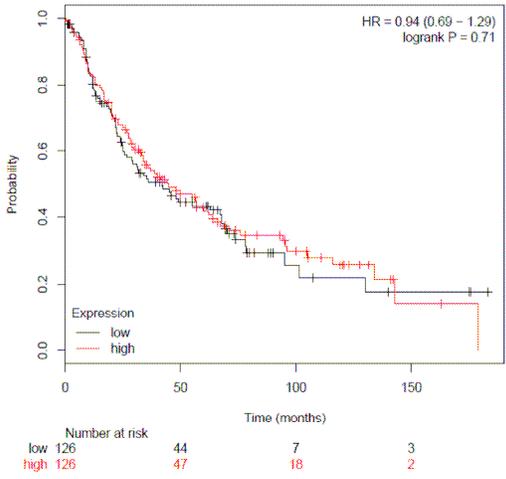
Stage N0



Stage N1



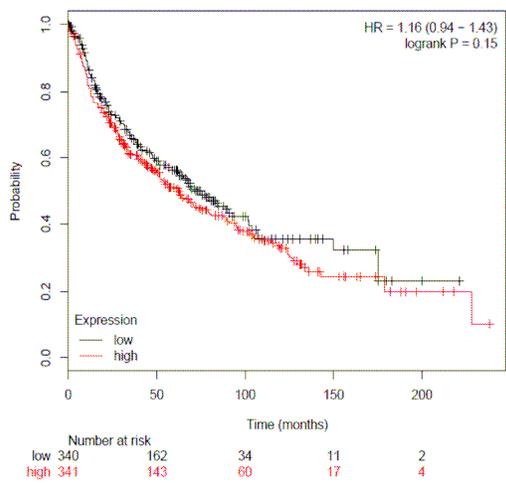
Stage N2



Stage N3

Für N3 standen nicht genug Patientendaten zur Verfügung

Stage M0



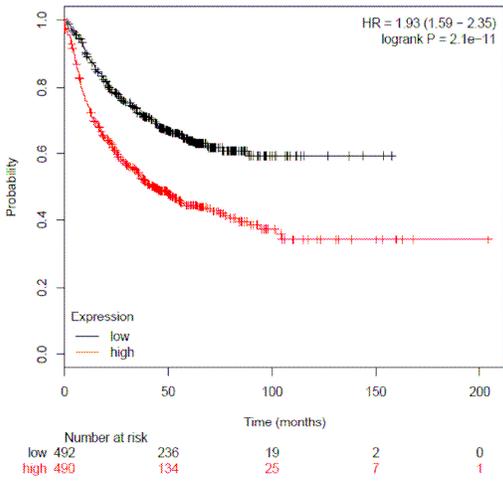
Stage M1

Für M1 standen nicht genug Patientendaten zur Verfügung.

First progression

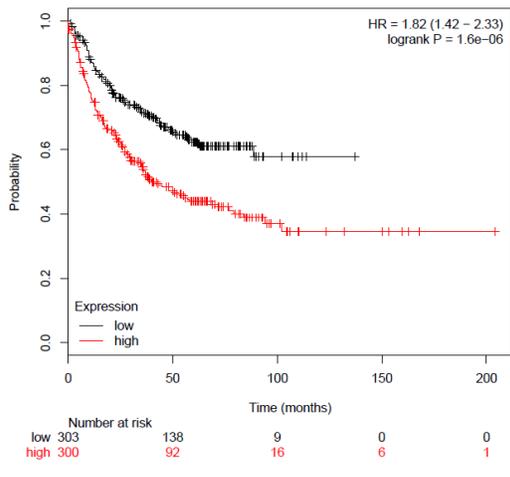
Affymetrix ID: 204312_x_at CREB1
Survival: FP
Split patients by: median
Follow up threshold: all
Censore at threshold: checked
Compute median over entire database: false
Cutoff value used in analysis: 260
Expression range of the probe: 10 - 985
Probe set option: user selected probe set
Invert HR values below 1: not checked

Alle Daten

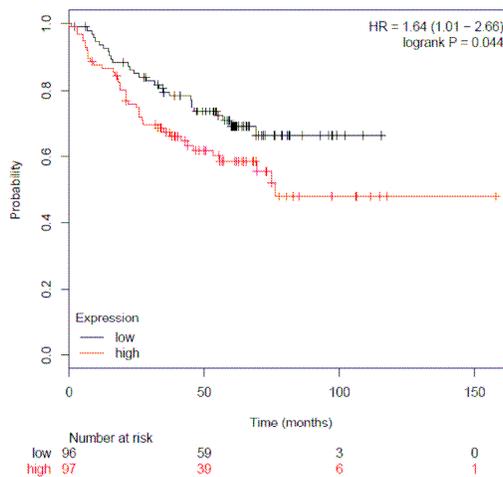


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Status Raucher/Nichtraucher

Raucher

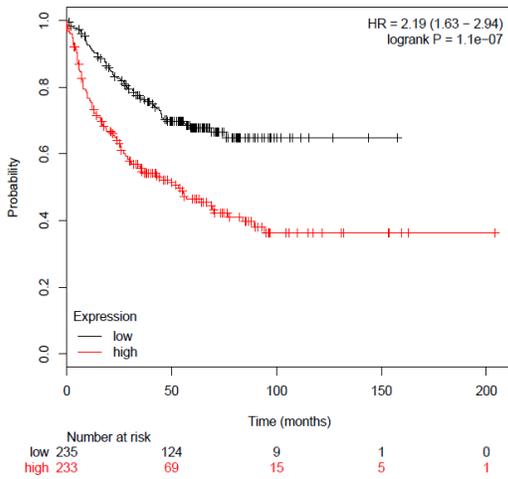


Nichtraucher

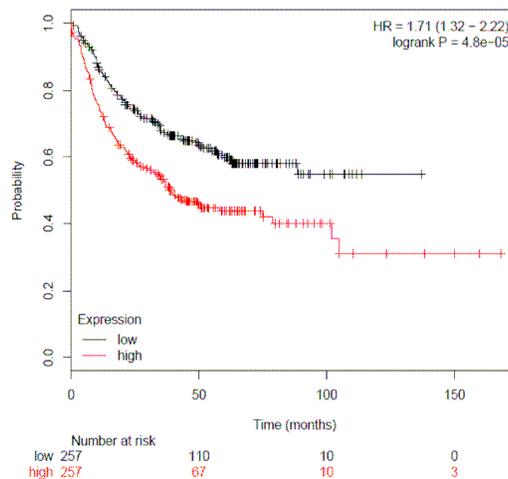


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Geschlecht

weiblich

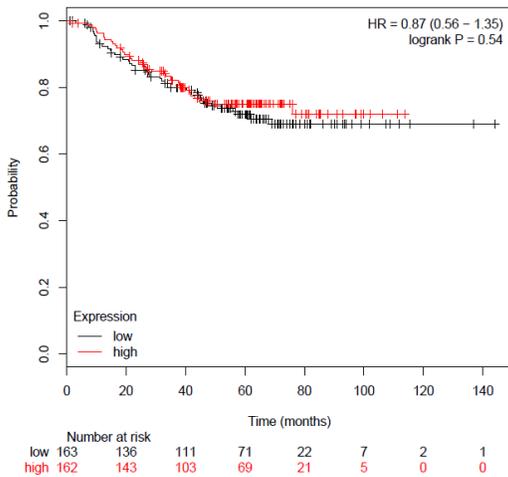


männlich

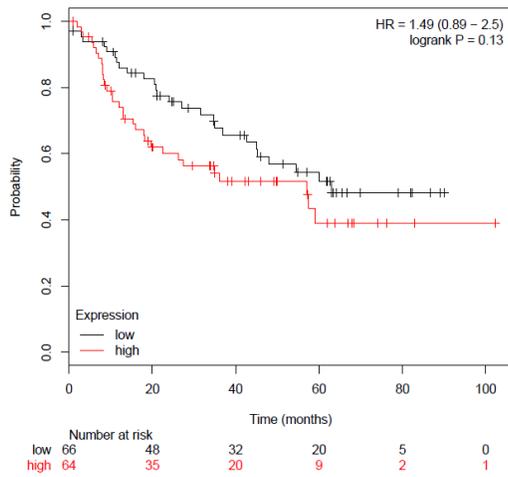


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorstadium

Stage 1



Stage 2

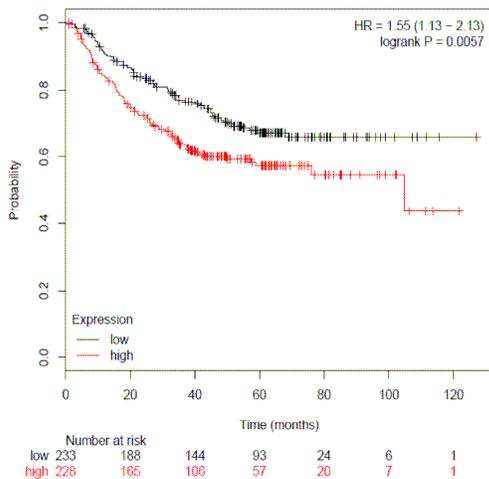


Stage 3 und 4

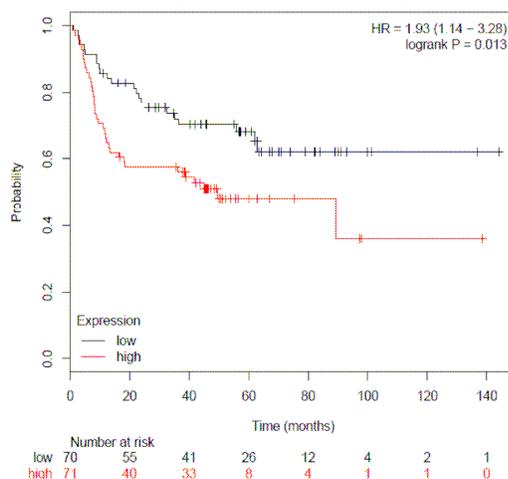
Für Stage 3 und 4 standen nicht genug Patientendaten zur Verfügung.

Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Histotypen

Adenokarzinom



Plattenepithelkarzinom (Squamous cell)

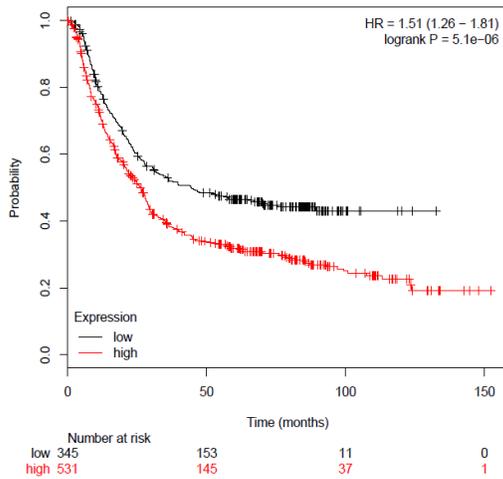


C. Gastrokarzinom

Gesamtüberleben

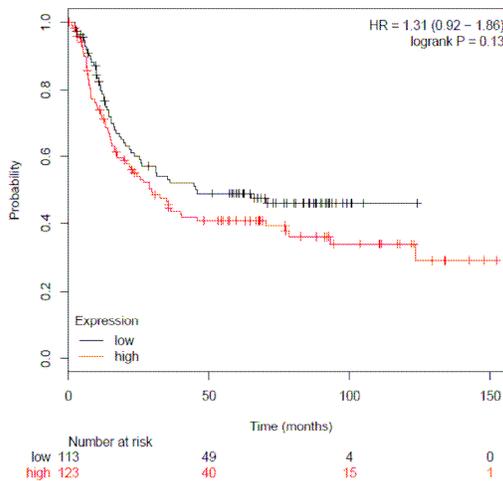
Affymetrix ID:	204312_x_at	CREB1
Survival:	OS	
Auto select best cutoff:	checked	
Follow up threshold:	all	
Censore at threshold:	checked	
Compute median over entire database:	false	
Cutoff value used in analysis:	265	
Expression range of the probe:	18 - 1033	
Probe set option:	user selected probe set	
Invert HR values below 1:	not checked	

Alle Daten

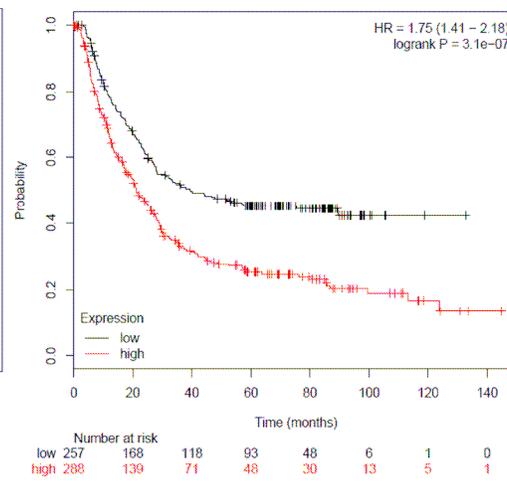


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Geschlecht

weiblich

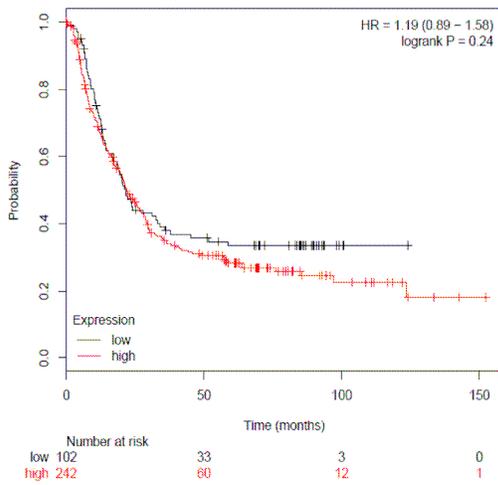


männlich

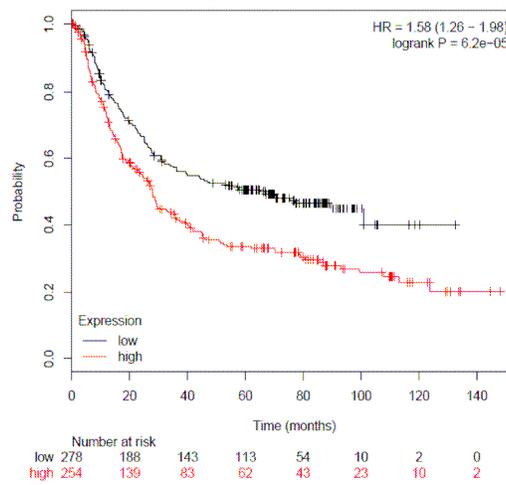


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und der HER-2-Expression

HER-2-positiv

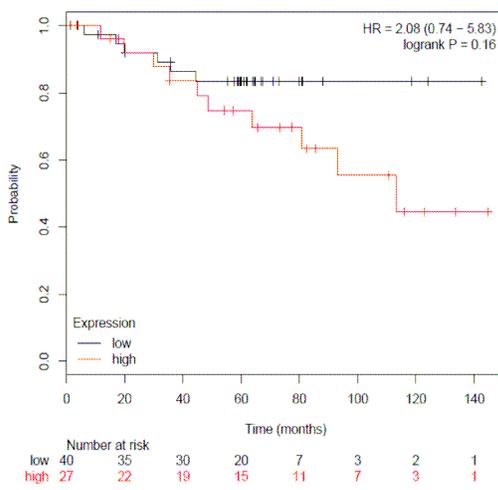


HER-2 negativ

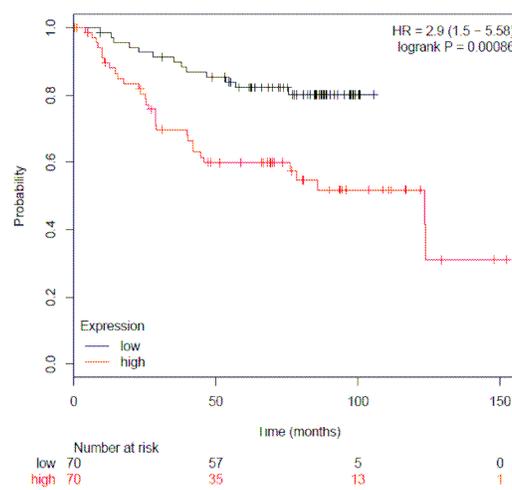


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorstadium

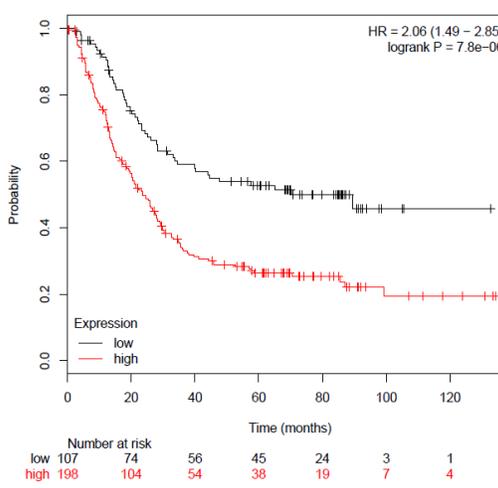
Stage 1



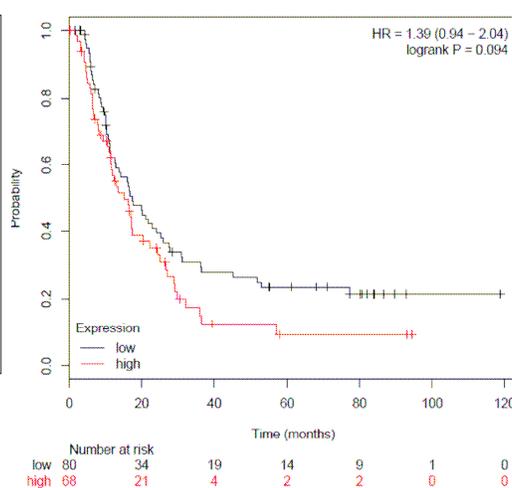
Stage 2



Stage 3



Stage 4

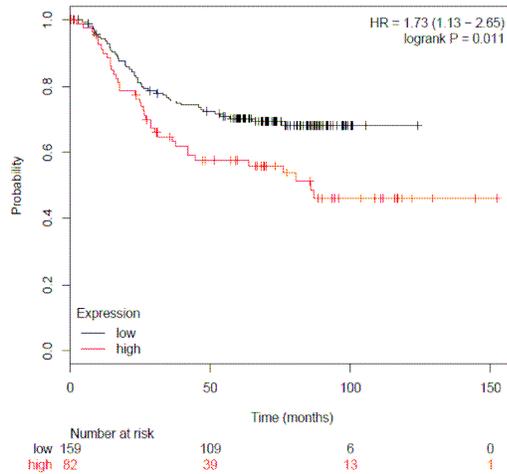


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und den TNM-Kriterien

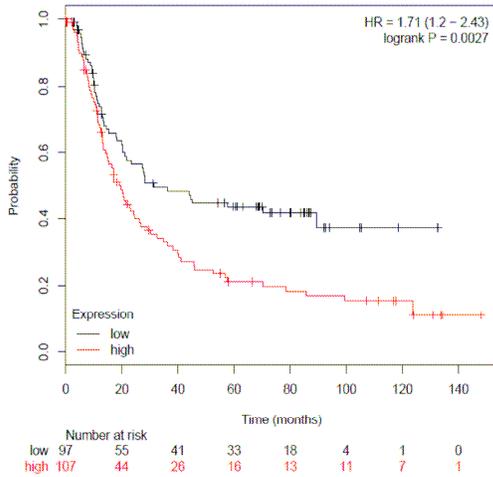
Stage T1

Für T1 standen nicht genug Patientendaten zur Verfügung.

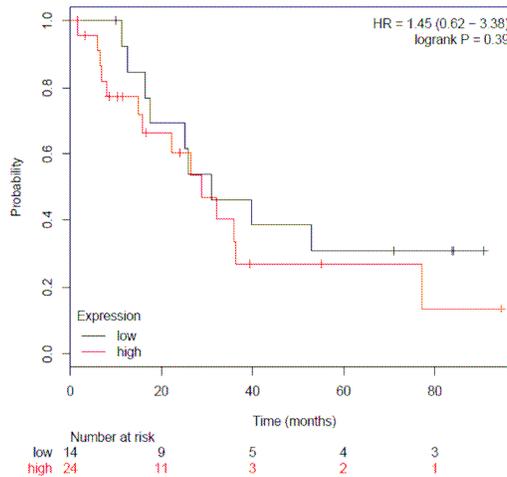
Stage T2



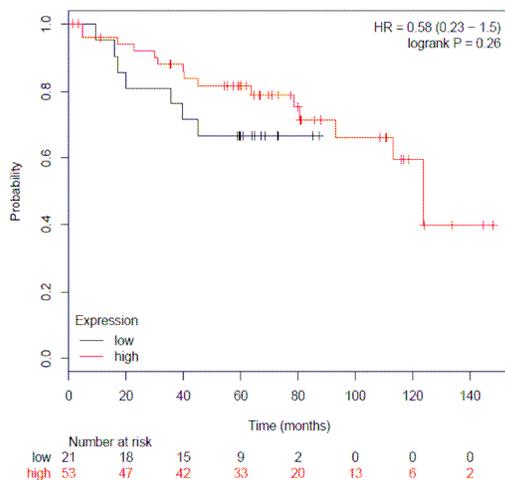
Stage T3



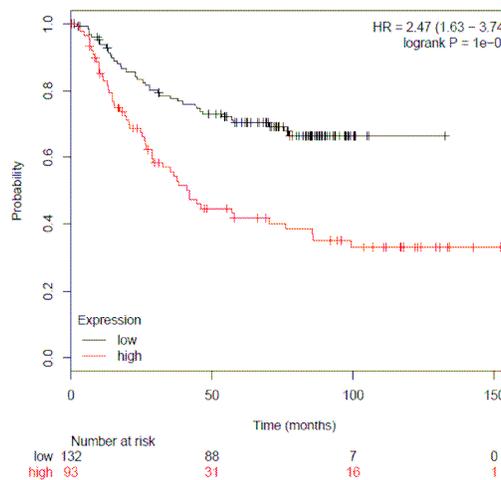
Stage T4



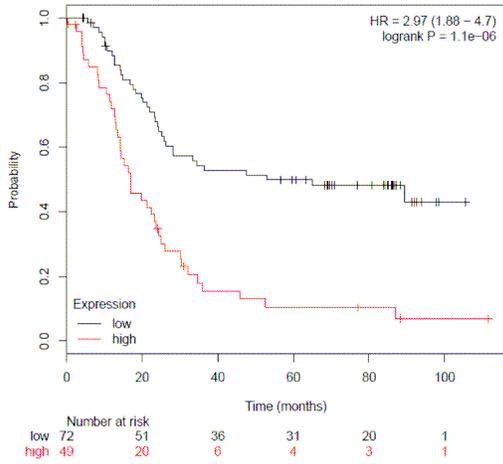
Stage N0



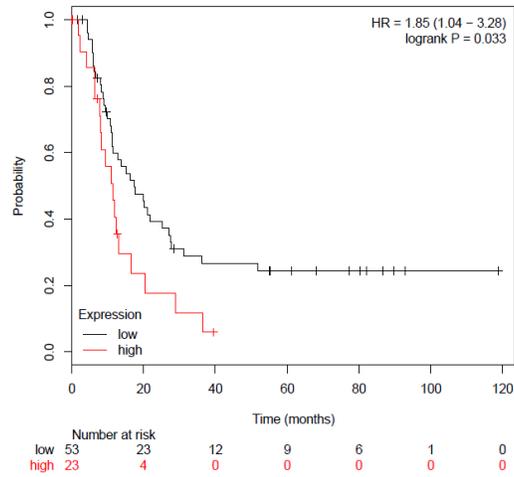
Stage N1



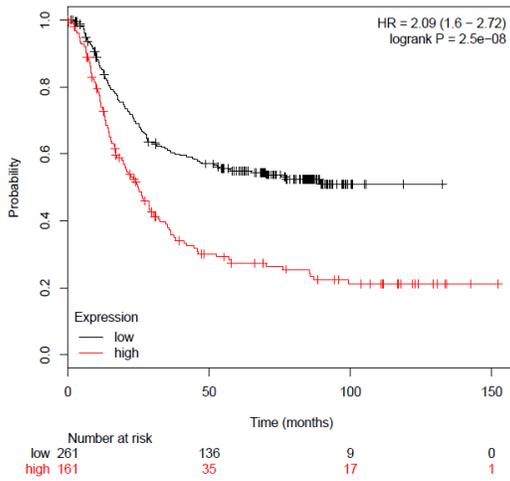
Stage N2



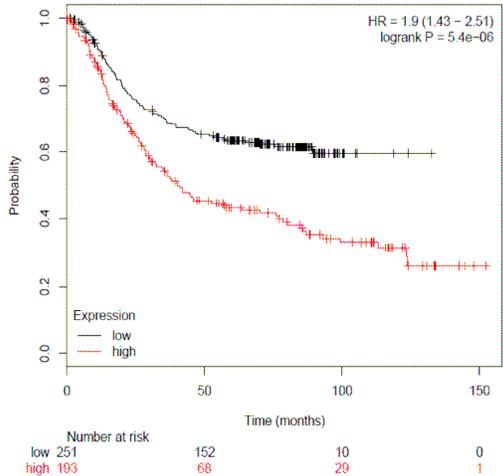
Stage N3



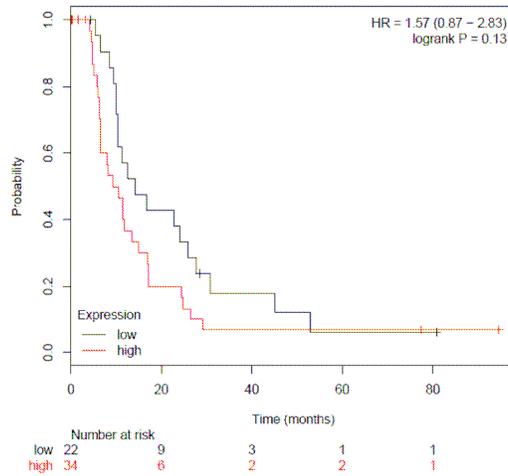
Stage N1,2,3



Stage M0



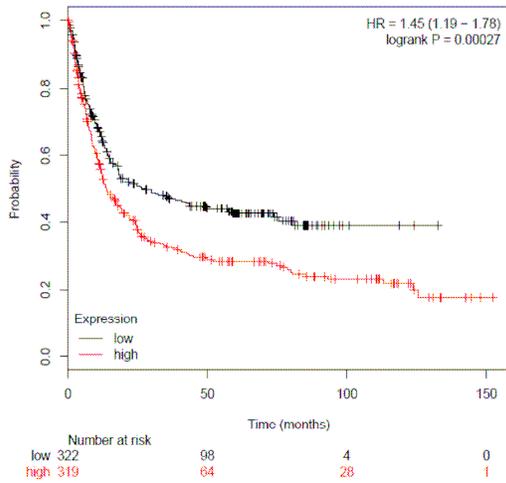
Stage M1



First progression

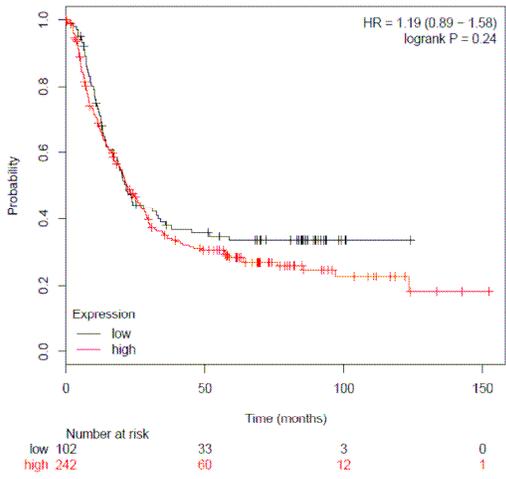
Affymetrix ID: 204312_x_at CREB1
Survival: FP
Auto select best cutoff: checked
Follow up threshold: all
Censore at threshold: checked
Compute median over entire database: false
Cutoff value used in analysis: 265
Expression range of the probe: 18 - 918
Probe set option: user selected probe set
Invert HR values below 1: not checked

Alle Daten

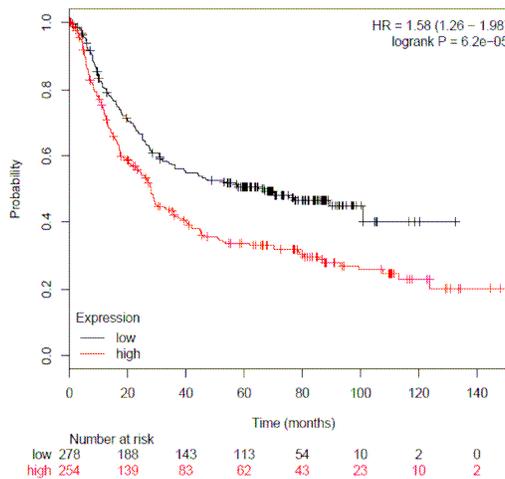


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und der HER-2-Expression

HER2-positiv

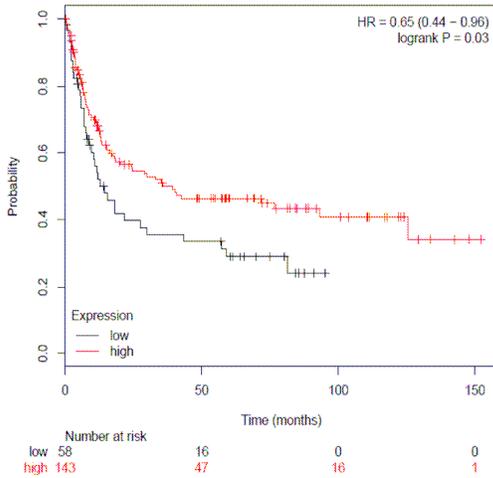


HER-2-negativ

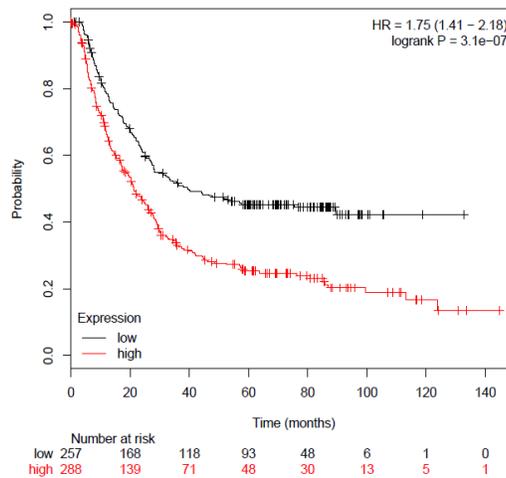


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Geschlecht

weiblich

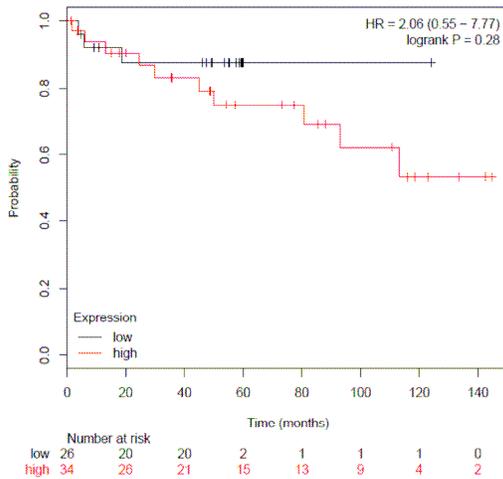


männlich

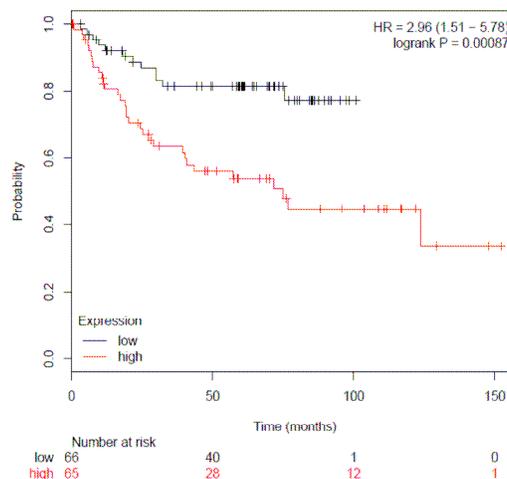


Progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von CREB und dem Tumorstadium

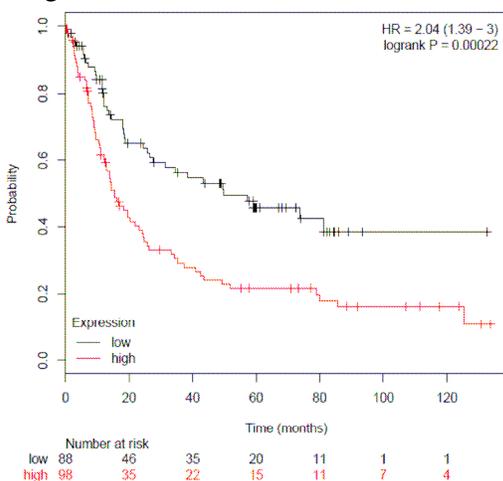
Stage 1



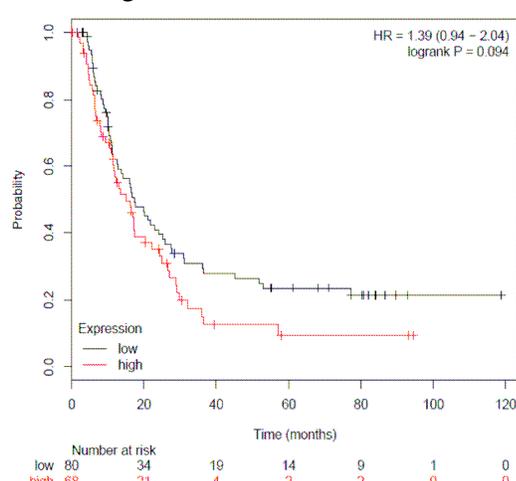
Stage 2



Stage 3

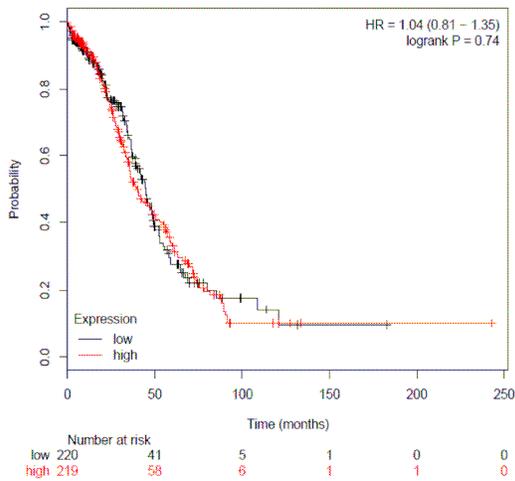


Stage 4

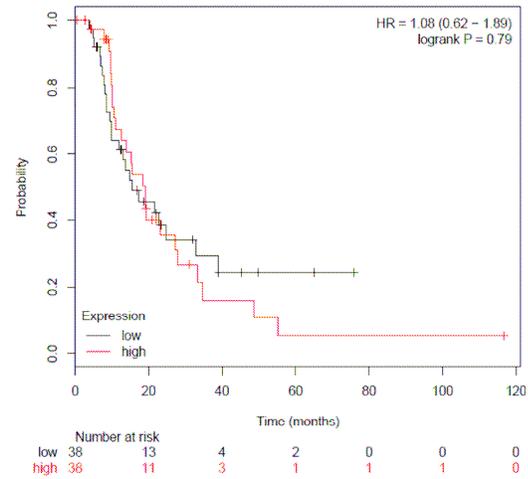


Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem p53-Status

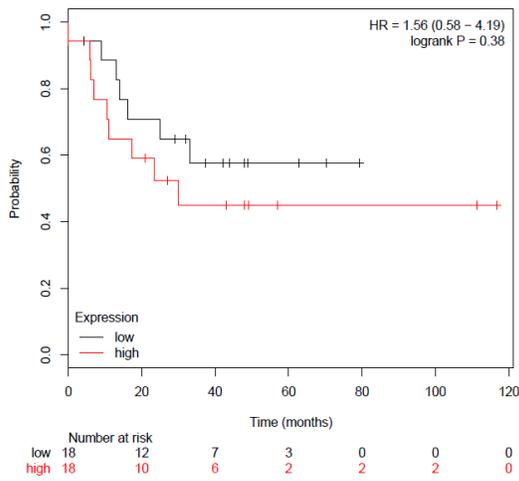
TP53 mutiert



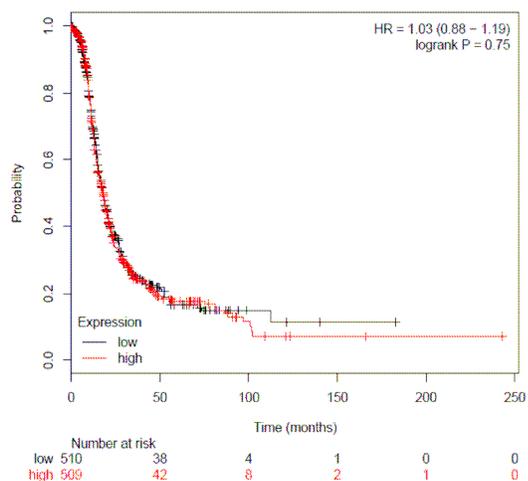
TP53 WT

Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CREB und dem Histotyp

Endometriales Karzinom

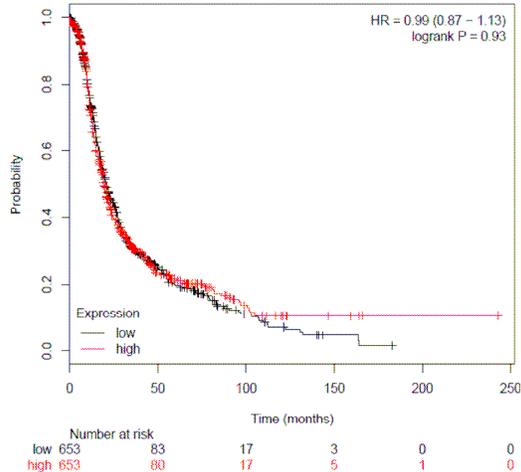


Seröses Karzinom

*Progression free survival*

Affymetrix ID:	204312_x_at	CREB1
Survival:	PFS	
Split patients by:	median	
Follow up threshold:	all	
Censore at threshold:	checked	
Compute median over entire database:	false	
Cutoff value used in analysis:	359	
Expression range of the probe:	9 - 1456	
Probe set option:	user selected probe set	
Invert HR values below 1:	not checked	

Alle Daten

**TMN-Kriterien:****Größe des Primärtumors**

T Primärtumor

T1 Tumor auf Organ begrenzt und kleiner als 7 cm

T2 Tumor auf Organ begrenzt und größer als 7 cm

T3 Tumorinfiltration

T4 Tumorinfiltration

Lymphknotenbefall

N Regionäre Lymphknoten

N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 Metastase in einem regionären Lymphknoten

N2 Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

Fernmetastasen

M Fernmetastase

M0 keine Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP

M1 Fernmetastasen vorhanden

Einteilung gemäß der Tumor-Differenzierung Grading:

G1 gut differenzierter Tumor

G2 mäßig differenzierter Tumor

G3 schlecht differenzierter Tumor

G4 undifferenzierter/anaplastischer Tumor