

3.1 Allgemeine Angaben zum beendeten Teilprojekt B16

3.1.1 Titel: Bedeutung der NFAT-Transkriptionsfaktoren für das phänotypische Verhalten des Pankreaskarzinoms

3.1.2 Fachgebiete und Arbeitsrichtung: Molekulare Onkologie

3.1.3 Leiter:

PD Dr. Ellenrieder, Volker

geb. 06.07.1966

Klinik für Innere Medizin

Gastroenterologie, Stoffwechsel

und Endokrinologie

Baldingerstraße

35043 Marburg

Telefon: (06421) 286 6460

Telefax: (06421) 286 8922

E-Mail: ellenrie@med.uni-marburg.de

Dr. Franz Oswald

geb. 21.05.1962

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin I

Robert-Koch-Str. 8

89081 Ulm

Telefon: 0731/ 500 44526

Telefax: 0731/ 500 44503

Email: franz.oswald@uni-ulm.de

3.2 Bericht über die Entwicklung des Teilprojekts

3.2.1 Bericht

Onkogene Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc spielen sowohl in der Entstehung als auch für das phänotypische Verhalten von Tumoren eine essentielle Rolle. Wie wir aus zahlreichen molekularen Untersuchungen wissen, können onkogene Transkriptionsfaktoren entweder vermehrt exprimiert oder funktionell besonders aktiv vorliegen. Ursächlich kommen genetische Alterationen wie z.B. aktivierende Mutationen als Ursache einer gesteigerten Expression in Betracht als auch eine vermehrte Aktivierung onkogener Signalwege, die über nukleäre Crosstalks zu einer gesteigerten Induktion oder Aktivierung dieser Regulatoren der Genexpression führen. Folge dieser gesteigerten Aktivität onkogener Transkriptionsfaktoren ist eine Induktion wachstumsstimulierender Zellzyklusregulatoren (z.B. Induktion von Cyclinen, CdK) oder die Hemmung wachstumshemmender Proteine wie z.B. p15, p21 und p27.

Im Mittelpunkt des geförderten Projektes steht die Charakterisierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren als onkogene Faktoren des Pankreaskarzinoms. Während die Rolle der NFAT-Proteine in der Zytokin-Induktion (z.B. IL-2 und TNFalpha) aktivierter T-Lymphozyten

bereits gut untersucht war, blieb deren Bedeutung in der Tumorbiologie unverstanden. Unsere Vorarbeiten zu diesem Forschungsvorhaben ließen jedoch eine wichtige Funktion der NFAT-Proteine in der Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms vermuten. So konnten wir in direkten Vorarbeiten bereits eine Überexpression von NFAT1 und NFAT2 in einem Großteil der untersuchten Pankreastumore sowie in einem signifikanten Anteil etablierter Pankreastumorzellen nachweisen.

Im Rahmen des beantragten Projektes sollten nun Untersuchungen zur Expression, Regulation und Funktion der NFAT-Proteine im Pankreaskarzinom durchgeführt werden.

Immunhistochemische Untersuchungen an mehr als 40 Karzinomen erbrachten eine kombinierte oder individuelle Überexpression von NFAT1 und NFAT2 im Pankreaskarzinom in mindestens 80% der untersuchten Gewebe. Dabei konnten wir die Tumorzellen selbst als primären Ort der NFAT-Expression im Tumorgewebe lokalisieren. Interessanterweise konnten beide NFAT-Proteine dabei v.a. im Zellkern von Tumorzellen und hier in Co-lokalisierung mit seinem bekannten Aktivator Calcineurin (Hogan et al., 2003) nachgewiesen werden. In weiterführenden Untersuchungen wurde die Expression beider Proteine in Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms untersucht, um erste Einblicke über den Zeitpunkt der NFAT-Aktivierung in der Tumorgenese des Pankreas zu erhalten. Beide Transkriptionsfaktoren ließen sich bereits in Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms, den PanIN–Stadien 2 und 3, nachweisen, was auf eine Funktion dieser Proteine bereits zu frühen Zeitpunkten der Pankreaskarzinomentstehung hinweist. Die gesteigerte Expression von NFAT1 beruht dabei auf einer chromosomalen Amplifikation auf Chromosom 20q13 (Holzmann et al., 2004), die wir in Kooperation mit der AG Holzmann (IZKF, Uniklinik Ulm) in mehr als 80% der untersuchten Pankreaskarzinomgewebe aufzeigen konnten. Unklar bleibt bislang, ob die NFAT2-Überexpression ebenfalls auf genetischen Veränderungen oder auf anderen Ursachen, wie z.B. Signaling-Crosstalk oder Aktivierung mitogener Signalwege beruht. In Analogie zu unseren Untersuchungen in humanen Pankreaskarzinomen wurde eine gesteigerte Expression von NFAT1 und NFAT2 in einer Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien (Panc 1, ASPC-1, S-028, 8988t, IMIM PC-1, IMIM PC-2 und TD-2), sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene bestätigt. Untersuchungen zur Regulation von NFAT2 in Pankreaskarzinomzellen zeigten, dass die zelluläre Lokalisation, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von NFAT2 durch die Calciumabhängige Phosphatase Calcineurin reguliert wird. Calcineurin ist eine Phosphatase, die durch Dephosphorylierung zur Konfigurationsänderung von NFAT2 führt, welches anschließend über bislang wenig verstandene Mechanismen in den Zellkern transloziert und über Promotorbindung die Expression spezifischer Targetgene regulieren kann. Damit stellt die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung einen essentiellen Schritt in der Akti-

vierung von NFAT2 dar. Die Calcineurin induzierte Aktivierung von NFAT-Proteinen kann durch Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A, einem Pharmakon welches irreversibel an die katalytische Domäne von Calcineurin bindet und somit konsekutiv die Dephosphorylierung von NFAT2 hemmt, inhibiert werden (Puri S. et al., 2004; Venkatesh et al., 2004; Arora-Gupta et al., 2004). Im Rahmen des vorliegenden Projektes gelang uns einerseits die Funktionalität des Calcineurin-NFAT Signalweges in Pankreaskarzinomzellen nachzuweisen und andererseits eine Abhängigkeit dieses Signalweges von intrazellulären Signaling-Crosstalks zu demonstrieren. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die EGF-vermittelte MAPK-Signalkaskade, die über Aktivierung von Ras-Raf-Mek-ERK zu einer gesteigerten Calcineurin Aktivität führt und konsekutiv in einer nukleären Translokation von NFAT mündet. Die gesteigerte nukleäre Präsenz von NFAT Proteinen wiederum resultiert in einer zeitlich limitierten doch signifikanten Zunahme der DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren.

Untersuchungen zur Regulation des nukleären Exports in Pankreaskarzinomzellen ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur Funktion von NFAT1 und NFAT2 im Pankreaskarzinom standen Experimente zur Beurteilung des zellulären Wachstums und der Zellmigration von Pankreaskarzinomzellen. Hierzu wurde eine Reihe etablierter Pankreaskarzinomzelllinien mit intaktem Calcineurin-NFAT Signalweg eingesetzt und die Effekte einer gesteigerten oder reduzierten NFAT-Expression bzw. Aktivität untersucht. Es zeigte sich, dass NFAT Proteine eine entscheidende Rolle in der Zellzyklusregulation spielen und dass der Verlust der NFAT Expression (mittels RNAi Technologie) oder deren funktionelle Hemmung (CsA) mit einem Arrest der Tumorzellen in der G1-Phase einhergehen. Im Gegensatz hierzu führt eine gesteigerte NFAT Aktivierung (Gabe von Ionomycin oder Stimulation der EGF-Kaskade) zu einer massiven Zunahme des c-Myc getriggerten Zellwachstums von Pankreaskarzinomzellen. In der Tat konnten wir den onkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc als essenzielles Target von NFAT2 identifizieren und zeigen, dass die frühe Induktion von c-Myc eine unabdingbare Voraussetzung für die NFAT vermittelte Zellzyklustransition darstellt. Verlust der Induzierbarkeit von c-Myc (durch RNAi Technologie) verhindert die NFAT induzierte G1-S Transition, wohingegen der Rescue von c-Myc den durch NFAT Verlust verursachten G1-Arrest aufheben kann. Weitere wichtige Targets von NFAT Proteinen in der Zellzykluskontrolle sind die Inhibitoren p15 und p21, deren Expression durch Aktivierung von NFAT gehemmt wird. Weiterführende Untersuchungen konnten diese wichtigen Zellzyklusregulatoren als direkte Targets der NFAT vermittelten Transkription identifizieren. Während die Mechanismen der NFAT vermittelten transkriptionellen Repression von p15 und p21 noch nicht gänzlich verstanden und Gegenstand laufender Untersuchungen sind, konnten wir die Mechanismen der frühen c-Myc In-

duktion bereits exakt analysieren. NFAT2 bindet an einer 14bp umspannenden Region des proximalen humanen c-Myc Promotors, die als TIE (TGF inhibitory element) bezeichnet und durch TGF β -vermittelte Transkriptionsfaktoren gehemmt wird. Wir konnten zeigen, dass NFAT an einer kurzen GGAAA Sequenz innerhalb dieser TIE Region bindet und hierüber die Expression von c-Myc induziert. Mutationsanalysen erbrachten diesen Nachweis und zeigten, dass die Inaktivierung dieser NFAT Bindungsstelle mit einem signifikanten Verlust der NFAT-bedingten Transaktivierung des c-Myc Promotors einhergeht.

Damit konnten wir den Calcineurin-NFAT Signalweg als einen wichtigen Regulator der c-Myc Induktion identifizieren. Dieser neue Mechanismus scheint im Pankreaskarzinom von großer Bedeutung zu sein, da wir eine gesteigerte c-Myc Expression in ca. 70% der Tumoren finden, wobei sich diese allerdings nur in ca. 30% auf eine genetische Alteration des c-Myc Gens zurückführen lässt. Tatsächlich entziehen sich alle Pankreaskarzinomzellen mit einer c-Myc Amplifikation der NFAT-Kontrolle, während die c-Myc Expression in allen NFAT-responsiven Karzinomzellen durch die Aktivität des Calcineurin-NFAT Signalweges reguliert zu sein scheint.

Neben der wichtigen Rolle von NFAT Proteinen in der Zellzykluskontrolle scheinen diese Transkriptionsfaktoren v.a. auch in Prozessen der Zellmigration, Angiogenese und Transformation von Bedeutung zu sein. Migrations-Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung von NFAT – etwa durch Stimulation mit EGF oder Serum – zu einer Zunahme der Zellmigration führt, während der Verlust der endogenen NFAT Expression mit einer signifikanten Reduktion der EGF-vermittelten Migration assoziiert ist.

Weitere NFAT Targetgene konnten i.R. unseres Projektes identifiziert werden, die v.a. in Prozessen der. Hierzu gehören der Wachstumsfaktor VEGF, SMAD7, das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin, Das Zell-Zell Adhäsionsmolekül E-Cadherin und die Cyclooxygenase-2 (Cox-2), deren Promotorregulation durch NFAT Gegenstand laufender Experimente ist. Zusammenfassend konnten wir im Rahmen dieses Forschungsprojektes eine onkogene Rolle der NFAT Proteine in Entstehung und dem phänotypischen Verhalten des Pankreaskarzinoms darstellen. Entsprechend unseren teilweise bereits publizierten Ergebnissen werden NFAT Proteine bereits in frühen Entwicklungsstadien aufgrund genetischer Alterationen verstärkt exprimiert und über Calcineurin aktiviert. Die Aktivität des Calcineurin-NFAT Signalweges und damit die NFAT vermittelte Genexpression wird durch Interaktion mit anderen zellulären Signalwegen moduliert. Dabei spielt die EGF-induzierte ERK Signalkaskade eine wichtige Rolle, da sie über ERK vermittelte Stimulation von Calcineurin rasch und effektiv die nukleäre Translokation und Transkription von NFAT stimuliert. Aktivierte NFAT Proteine stimulieren das Zellwachstum

durch transkriptionelle Regulation von c-Myc und anderen Zellzyklusregulatoren und beteiligen sich an der EGF-induzierten Zellmigration durch Induktion wichtiger Mediatoren der Tumorprogression. Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen stehen nun Protein-Protein Interaktionen zwischen NFAT Proteinen und anderen transkriptionellen Repressoren sowie Crosstalk-Mechanismen mit TGF β -induzierten Signalmolekülen, die in der Tumorprogression von Bedeutung sind.

3.2.1.1 Neue Methoden

Im Rahmen dieses Förderprojektes wurden neue Methoden in der AG Ellenrieder etabliert, die auch zukünftig in der AG angewandt werden. Dies umfasst die Etablierung neuer Immun-fluoreszenz-Methoden, Chromatin Immunpräzipitationen, DNA-Pulldown Assays und alle gängigen Verfahren der RNAi-Technologie.

3.2.1.2 Kooperationen

Wie bereits zum Zeitpunkt der Antragsstellung geplant, wurden wichtige Kooperationen mit den AG Gress (B01), AG Wagner (A10), der AG Holzmann (B19) und der AG Möller/Hasel (A13) durchgeführt. Mit der AG Gress wurden Expressionsanalysen zum Nachweis NFAT regulierter Targetgene durchgeführt. Die AG Wagner hat maßgeblich zum Gelingen aller immunhistochemischer Untersuchungen beigetragen. Die AG Holzmann hat alle Methoden zum Nachweis chromosomaler Alterationen der NFAT Proteine durchgeführt und von der AG Möller/Hasel wurden uns PaNIN Schnitte zum Nachweis der NFAT Expression in frühen Stadien der Karzinogenese zur Verfügung gestellt.

3.2.1.3 Gründe für die Beendigung des Teilprojektes

PD Dr. Ellenrieder ist zum 15.02.2006 in leitender Oberarzt-Funktion an die Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie des Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg, gewechselt. Mit ihm ist ein Teil der Arbeitsgruppe nach Marburg umgezogen, so dass nach Beendigung der laufenden Förderphase keine weitere Bewilligung beantragt werden wird. Bis zur Beendigung dieser Förderphase wird die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Dr. Oswald in Ulm weiter betreut und die experimentellen Arbeiten in Ulm zu Ende geführt werden. Das Projekt soll im Anschluss in einen laufenden SFB der Universität Marburg (SFB TR 17, Ras-dependent pathways in human cancer TransRegio-SFB: Philipps-Universität

E

B16 Ellenrieder/Oswald

Marburg (Sprecherhochschule), Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Sprecher Professor Eilers) überführt werden.

3.2.2 Liste der aus dem Teilprojekt seit der letzten Antragstellung entstandenen Publikationen

I. (a) Referierte Beiträge für wissenschaftliche Zeitschriften:

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, **Ellenrieder V**:

Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. EMBO 9;25:3714-24, 2006

M. Buchholz und V. Ellenrieder: An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. Review in Cell Cycle, in press.

I. (b) Fachkongresse:

Präsidenten-Poster der DGVS 2006:

Buchholz M, Linhart T, Gress T, **Ellenrieder V**. NFAT2 – Identifikation eines essenziellen Regulators der onkogenen c-Myc Expression und Proliferation im Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol 2006; PP08.

Börsig S, Buchholz M, Gress T, **Ellenrieder V**. Identifikation von NFAT1 als wichtigen Mediator der ERK-vermittelten Genexpression und Migration im Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol, 2006; P291.

3.3 Bewilligte Mittel für die laufende Förderperiode

Das Teilprojekt wurde im Sonderforschungsbereich von 07/2004 bis 06/2007 gefördert.

Haushalts-jahr	Personalmittel	Sachmittel	Investitionsmittel	Gesamt
2004/2	31,8	10,0	0	41,8
2005	63,6	20,0	0	83,6
2006	65,4	20,0	0	85,4
2007/1	32,7	10,0	0	42,7
Summe	193,5	60,0	0	253,5

E
B16 Ellenrieder/Oswald

3.3.1 Personal im Teilprojekt

	Name, akad. Grad, Dienststellung	engeres Fach des Mitarbei- ters	Institut der Hochschule oder der außeruniv. Einrichtung	im SFB tätig von (Monat/ Jahr) bis (Monat/ Jahr)	Vergütungs- gruppe
Grundausrüstung					
wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Dr. Ellenrieder	Innere Medizin	Zunächst: Innere Medizin Universität Ulm	07/2004 bis 07/2007	
	Dr. Oswald	Molekularbiologie	Aktuell: Uniklinik Marburg Innere Medizin Universität Ulm	07/2004 bis 07/2007	
nichtwissenschaftl. Mitarbeiter					
Ergänzungsausstattung					
wissenschaftl. Mitarbeiter (einschl. Hilfskräfte)	Anita Buck	Molekularbiologie	Innere Medizin I Universität Ulm		
nichtwissenschaftl. Mitarbeiter	Jessica Motzer			Bis 06/2007	

E
B16 Ellenrieder/Oswald