

2. Abgeschlossenes Teilprojekt B12

Abschlußbericht

Thema des Projekts: **Untersuchung zur Expression und transkriptionellen Regulation von GADD45, einem potentiellen Zielgen von NF- κ B in humanen Pankreaskarzinomen**

Projektleiterin: PD Dr. Susanne Liptay
Universitäts-Kinderklinik und Poliklinik, Ulm

2.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

NF- κ B/Rel Proteine bilden eine Familie von induzierbaren Transkriptionsfaktoren, die die Expression zahlreicher Gene regulieren, die an Immun-, Entzündungs- und Akut-Phasen-Reaktionen beteiligt sind. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß Mitglieder dieser Familie auch eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose spielen. In zahlreichen Untersuchungen wurde eine Dysregulation von NF- κ B/Rel Proteinen in verschiedenen Malignomen nachgewiesen, u.a. in B-Zell Lymphomen, Hodgkin Lymphomen, Kolonkarzinomzelllinien und kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (Review: Gilmore et al., 1996; Bargou et al., 1996; Bargou et al., 1997). Wodurch NF- κ B zum malignen Phänotyp beiträgt, ist bislang wenig verstanden. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß NF- κ B eine antiapoptotische Wirkung haben kann. NF- κ B Aktivierung verhindert die Apoptoseinduktion durch TNF- α , ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika wie Daunorubicin. Man nimmt an, daß durch Hemmung von NF- κ B antiapoptotische Proteine, die unter der transkriptionellen Kontrolle von NF- κ B stehen, vermindert exprimiert werden (Review: Bours et al., 2000). Neben dieser anti-apoptotischen Rolle gibt es zunehmend Hinweise, daß NF- κ B auch eine mitogene Funktion aufweist. Z.B. wurde Cyclin D1 als NF- κ B Zielgen identifiziert, wodurch der G1/S Übergang durch NF- κ B aktiviert wird (Hinz et al., 1999). In Vorarbeiten konnten wir eine konstitutive NF- κ B Aktivierung in Pankreaskarzinomzelllinien und humanen Pankreaskarzinomen nachweisen. Diese Befunde deuteten auf eine *in vivo* Bedeutung dieser Beobachtung hin. Wir stellten daher mehrere Pankreaskarzinomzelllinien her, die stabil ein sogenanntes "Super-I κ B α " (I κ B α Δ N) exprimieren, das als transdominant-negatives NF- κ B wirkt. Diese stabilen Zellklone zeigten im Vergleich zu den Wildtyp oder Kontroll-transfizierten Zellklonen ein signifikant inhibiertes Zellwachstum und eine erhöhte Apoptoseinduktion (Liptay et al., 2002). Zur Identifizierung von NF- κ B

Zielgenen, die für diesen Phänotyp verantwortlich sind, wurden cDNAs der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -, sowie der Kontroll-Klone hergestellt und diese zur Hybridisierung von kommerziellen cDNA-Arrays verwendet. Eines der auf diese Weise identifizierten Gene war GADD45 α (growth arrest and DNA damage-inducible gene), ein Zellzyklusprotein, das an der Kontrolle des G2/M Übergangs beteiligt sein soll (Fornace et al., 1989; Wang et al., 1999). Ziel unseres Projektes war es, die transkriptionelle Regulation von GADD45 α durch Mitglieder der NF- κB Familie zu untersuchen und die mögliche funktionelle Bedeutung von GADD45 α in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms zu charakterisieren.

2.2 Angewandte Methoden

Die Expression von GADD45 α in primärem Tumormaterial und in humanen Pankreaskarzinomzelllinien wurde mittels Real Time PCR (Taqman Analysen) und Immunhistochemie untersucht. Die transkriptionelle Regulation von GADD45 α durch Mitglieder der NF- κB /Rel-Familie wurde biochemisch mit Elektromobility Shift Assays und Supershift Assays und funktionell durch Transfektionsassays untersucht. Zur funktionellen Charakterisierung wurde ein Panel an verschiedenen Promotorkonstrukten und Mutanten hergestellt. Die funktionelle Bedeutung von GADD45 α für das Pankreaskarzinom konnte mit Hilfe von spezifischen siRNAs charakterisiert werden.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Untersuchungen zur Expression von GADD45 α in primärem Tumormaterial und humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Mit Hilfe von Real Time PCR (Taqman Analysen) wurde die differentielle GADD45 α Expression in dreizehn verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien im Vergleich zu drei normalen Pankreasresektaten überprüft. Hierbei fand sich in allen untersuchten Zelllinien eine unterschiedliche, 1,5- bis über 15-fach erhöhte GADD45 α Expression.

Auch in neun von zehn Pankreastumorresektaten konnte eine erhöhte GADD45 α Expression auf der RNA-Ebene nachgewiesen werden .

Auch auf Proteinebene konnte eine GADD45 α in zehn von zehn Pankreaskarzinomresektaten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen bestätigt werden. Diese GADD45 α Überexpression fand sich ausschließlich im Tumor, nicht im umliegenden Stroma. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine GADD45 α Überexpression ein häufiges Ereignis in humanen Pankreaskarzinomen darstellt.

2.3.2 Biochemische Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von GADD45 α durch Mitglieder der NF- κ B/Rel Familie

Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnten wir in der Promoter/Enhancerregion von GADD45 α fünf potentielle Bindungsstellen für NF- κ B identifizieren, die dem NF- κ B-Bindungskonsensus entsprechen. Vier weitere potentielle κ B-Seiten liegen im ersten Intron, eine weitere potentielle κ B-Seite im 3. Intron überlappend zu einer p53 Bindungsseite. Alle diese potentiellen κ B-Seiten wurden mit Hilfe von Elektromobility Shift Assays (EMSA) bezüglich ihrer κ B-Bindungsfähigkeit getestet. Für zwei Seiten, eine in der Promotor/Enhancerregion (-769) und eine weitere im ersten Intron (+477), konnte die κ B-Bindung nachgewiesen werden (Abb. 4). Durch Supershiftanalysen konnten wir zeigen, dass die NF- κ B Mitglieder RelA(p65) und NF- κ B1(p50) bevorzugt an diese Seiten binden.

2.3.3 Funktionelle Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation von GADD45 α durch Mitglieder der NF- κ B/Rel Familie

Mittels PCR wurden mehrere Fragmente der GADD45 α Promoter/Enhancerregion, sowie das komplette 1. und 3. Intron aus humaner genomischer DNA amplifiziert und subkloniert. Ein 1310 bp großes Fragment von GADD45 α , das 1250 bp der Promoterregion sowie 60 bp der “untranslated region” des 1. Exons enthält wurde in ein Luciferase-Reporterplasmid subkloniert (K1). Des Weiteren wurden Luciferase-Reporterplasmide hergestellt, die zusätzlich das 1. bzw. 3. Intron enthalten (K3 bzw. K4).

Um testen zu können, ob das 1. bzw. 3. Intron von GADD45 α wirklich Enhancersequenzen enthält, wurden diese zusätzlich in Plasmide mit einem heterologen Promotor (SV40-Promotor) kloniert (K5 bzw. K6). Zusätzlich wurden Plasmide hergestellt, in denen die Intronsequenzen in umgekehrter Orientierung enthalten sind.

Diese verschiedenen Reporterplasmide wurden transient in Panc1 und MiaPaCa2 Zellen transfiziert. Das Reporterplasmid mit der GADD45 α Promotor/Enhancerregion (Konstrukt K1) zeigte eine etwa 75-fach höhere Luciferaseaktivität im Vergleich zum Kontrollreporter ohne GADD45 α Promotor/Enhancer. Diese Aktivität war noch deutlich steigerbar durch Sequenzen des 1. Introns (Konstrukt K3), nicht jedoch durch Sequenzen des 3. Introns (Konstrukt K4).

Aus diesen Ergebnissen ergab sich der Hinweis, dass im 1. Intron, jedoch nicht im 3. Intron zusätzliche Enhancersequenzen enthalten. Dies konnte durch transiente Transfektionen mit den Reporterplasmiden K5 und K6 bestätigt werden. Intron 1 steigerte auch die transkriptionelle Aktivität des SV40 Promotors, unabhängig von der Orientierung der Intronsequenzen. Für Intron 3, das eine potentielle κ B- und eine p53-Bindungsstelle enthält, konnte keine Enhancer-Aktivität nachgewiesen werden.

Um die κ B-Abhängigkeit der transkriptionellen GADD45 α Regulation zu überprüfen, wurden Cotransfektionen der verschiedenen Reporterplasmide mit einem „Super-I κ B α “ durchgeführt. Dieses „Super-I κ B α “ ist N-terminal deletiert (I κ B α Δ N), wodurch es nicht mehr phosphoryliert und degradiert werden kann. Es hemmt damit die Aktivierung von NF- κ B und wirkt als transdominant-negatives NF- κ B. Cotransfektionen mit I κ B α Δ N zeigten eine signifikant

niedrigere Aktivität der verschiedenen Reporterplasmide, so dass die funktionelle Relevanz der κ B-Seiten in der Promotor/Enhancerregion und im 1. Intron von GADD45 α gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch Einbringen von Punktmutationen in die κ B-Seiten in den Positionen -769 und $+477$ der Promotorregion bzw. des 1. Intron. Zusammenfassend konnten wir mit diesen Versuchen nachweisen, dass GADD45 transkriptionell durch NF- κ B reguliert ist.

2.3.4 Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von GADD45 α im Pankreaskarzinom

Um die funktionelle Bedeutung von GADD45 α in Pankreaskarzinomzelllinien weiter zu untersuchen, haben wir uns der siRNA Technologie bedient. Eine potentiell spezifische siRNA wurde hergestellt, MiaPaCa2 Zellen damit transfiziert und im Westernblot die GADD45 α Expression überprüft. Diese siRNA inhibiert spezifisch die GADD45 α Expression. 48h nach Transfektion konnte eine deutliche Inhibition der GADD45 α Expression nachgewiesen werden.

Um den Einfluss dieser siRNA auf das Wachstum der transfizierten MiaPaCa2 Zellen zu untersuchen, wurden MTS-Assays zu unterschiedlichen Zeiten nach Transfektion durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Inhibition der GADD45 α Expression die Vitalität von MiaPaCa2 Zellen um mehr als 70% nach 96 Stunden senkt (Abb. 8).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass eine GADD45 α Überexpression ein häufiges Ereignis in humanen Pankreaskarzinomen und Pankreaskarzinomzelllinien ist, dass GADD45 α transkriptionell durch NF- κ B reguliert wird und dass eine Inhibition von GADD45 α zu einem signifikanten Verlust der Zellvitalität von Pankreaskarzinomzelllinien führt. GADD45 α ist somit ein Zielgen von NF- κ B, dass mit zur Erklärung der von uns beschriebenen mitogenen und antiapoptotischen Bedeutung von NF- κ B im Pankreaskarzinom beiträgt. Das Manuskript zur Publikation dieser Ergebnisse wird gegenwärtig verfasst.

2.4 Vergleiche mit Arbeiten außerhalb des Sonderforschungsbereichs

Eine weitere Arbeitsgruppe fand in Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen, dass GADD45 α häufig in Pankreaskarzinomen überexprimiert ist. Sie konnten desweiteren

nachweisen, dass eine GADD45 α Überexpression mit einem signifikant schlechterem Outcome der Patienten verbunden ist (Yamasawa et al., 2002).

2.5 Offene Fragen

Warum die GADD45 α Inhibition zu einem Verlust der Zellvitalität in Pankreaskarzinomzelllinien führt ist bislang nicht verstanden. Die GADD45 α Überexpression könnte sowohl mitogene als auch anti-apoptotische Effekte im Pankreaskarzinom haben. Bislang sind solche GADD45 α -Effekte auch für andere Tumoren nicht bekannt. Des Weiteren ist bislang die *in vivo* Relevanz unserer *in vitro* Ergebnisse nicht bekannt. Diese Fragen sollen in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

2.6 Publikationen (2001-2003)

Dikopoulos N, Nüssler AK, **Liptay S**, Bachem M, Reinshagen M, Stiegler M, Schmid RM, Adler G, Weidenbach H. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 234-239

Oswald F, Täuber B, Dobner T, Bourteele S, Adler G, **Liptay S**, Schmid RM. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian notch-1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7761-7774

Paxian S, Merkle H, Riemann M, Wilda M, Adler G, Hameister H, **Liptay S**, Pfeffer K, Schmid RM. Abnormal organogenesis of Peyer's patches in mice deficient for NF- κ B1, NF- κ B2 and Bcl-3. *Gastroenterology* 2002; 122: 1853-1868

Oswald F, Kostezka U, Astrhantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, **Liptay S**, Schmid RM. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signaling pathway. *EMBO J* 2002; 21: 5417-5426

Liptay S, Fulda S, Schanbacher M, Bourteele S, Ferri KF, Kroemer G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. Molecular mechanism of sulfasalazine-induced T-cell apoptosis. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 608-620

Liptay S, Weber CK, Ludwig L, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Mitogenic and anti-apoptotic role of constitutive NF- κ B/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 735-746

2.7 Zitierte Literatur:

- Bargou et al. High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg Cells. *Blood* 1996, 4340
- Bargou et al. Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2961
- Bours et al. Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharm* 2000; 60: 1085
- Fornace et al. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4196
- Gilmore et al. Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene* 1996; 13:1367
- Hinz et al. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2690
- Liptay et al. Mitogenic and anti-apoptotic role of constitutive NF- κ B/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 105: 735
- Wang et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3706
- Yamasawa et al. Clinicopathological significance of abnormalities in Gadd45 expression and its relationship to p53 in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2563