



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Medizinischen Klinik I

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Jens U. Marquardt

---

**Negative Regulation der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration  
durch die kleine GTPase Rac1b in Zellen des duktales  
Adenokarzinoms des Pankreas: Identifizierung von Ziel-  
proteinen und Aufklärung des molekularen Mechanismus**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

**- Aus der Sektion Medizin -**

Vorgelegt von

**Christian Fiedler**

aus Eutin

Lübeck 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens U. Marquardt

2. Berichterstatterin/ Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Timo Gemoll

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2024

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 27.05.2024

Promotionskommission der Sektion Medizin

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	9
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>10</b>
1.1 Hintergrund	10
1.2 Das duktales Pankreasadenokarzinom	11
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	11
1.2.2 Klinik und Diagnose	12
1.2.3 Therapie	13
1.2.4 Tumorbilogie	14
1.3 Der Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )	15
1.3.1 Rezeptoren und Signalwege	17
1.3.2 Smad-abhängige Signalwege	18
1.3.3 Smad-unabhängige Signalwege	20
1.3.4 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)	22
1.4 Rac1 und Rac1b	25
1.4.1 Rac1	25
1.4.2 Rac1b	29
1.5 Hypothese und Zielsetzung der Promotion	35
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>37</b>
2.1 Antikörper	37
2.1.1 Primärantikörper	37
2.1.2 Sekundärantikörper	37
2.2 Chemikalien, Lösungen, Enzyme	38
2.3 Geräte	42

2.4 Primersequenzen .....	44
2.5 Puffer und Lösungen (inklusive Sammel- und Trenngel) .....	44
2.6 Small interfering RNAs (siRNAs).....	46
2.7 Software.....	46
2.8 Verbrauchsmaterialien .....	47
2.9 Zelllinie.....	50
2.9.1 Zellen .....	50
2.10 Zellkultur .....	50
2.11 Molekularbiologische Arbeiten .....	57
2.11.1 Quantitative real-time-PCR (qPCR) .....	59
2.12 Methoden der Proteinanalytik.....	61
2.12.1 Western Blot (Proteintransfer) .....	64
2.13 Echtzeit-Zell-Migrationsassay mittels xCELLigence RTCA DP .....	66
2.14 statistische Auswertung .....	69
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
3.1 Überprüfung der siRNA Wirkung von Rac1b.....	71
3.2 Einfluss von Rac1b auf die ALK5-Expression in PANC-1-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene.....	73
3.2.1 Regulation der ALK5-Expression durch Rac1b auf Protein-Ebene.....	73
3.2.2 Regulation der ALK5-Expression durch Rac1b auf mRNA-Ebene.....	76
3.3 Überprüfung der funktionellen Bedeutung der ALK5-Induktion auf die Migration in PANC-1-Zellen mit Hilfe von xCELLigence-Migrationsassays.....	78
3.3.1 Einfluss der ALK5 Serin/Threoninkinase-Aktivität auf die durch TGF- $\beta$ -Stimulation induzierte Zellmigration in PANC-1-Zellen nach Rac1b-Silencing .....	78
3.3.2 Untersuchung der TGF- $\beta$ -abhängigen Zellmigration in PANC-1-Zellen nach ALK5-Silencing.....	81

3.3.3 Wirkung des ALK5-Silencing auf die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen. ....	84
3.4 Expression von Smad 7 in Rac1b-depletierten, mit TGF- $\beta$ stimulierten bzw. unstimulierten PANC-1-Zellen.....	87
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>89</b>
4.1 Suffiziente Depletion der Rac1b-Proteinmenge durch RNA-Interferenz.....	90
4.2 Gen-Silencing von Rac1b erhöht die ALK5-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene .....	91
4.3 ALK5-Kinaseaktivität ist erforderlich für den siRac1b-induzierten Anstieg der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration in PANC-1-Zellen.....	94
4.4 Reduktion der ALK5-Proteinmenge supprimiert die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigrations-Erhöhung in PANC-1-Zellen .....	97
4.5 Depletion der ALK5-Proteinmenge supprimiert die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigrations-Erhöhung durch Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen.....	98
4.6 Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen evoziert eine Reduktion der Smad7-mRNA .....	100
4.7. Nachfolgende Untersuchungen, Limitationen und Ausblick .....	103
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>107</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>128</b>
7.1 Publikationen & Stipendium .....	128
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>129</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>130</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALK5	Activin receptor like kinase 5 (entspricht TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BG	Betaglykan
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cDNA	komplementäre DNA
CI	cell index
Ct	cycle threshold
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases
FOLFIRINOX	Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin
GADD45b	Growth-arrest and DNA-damage-inducible 45b
GDP, GTP	Guanosindiphosphat/-triphosphat
HSP90	heat shock protein 90
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
I-Smad	inhibitorisches Smad
LAP	latenzassoziiertes Peptid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MCN	muzinöse zystische Neoplasie
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter

NOX	NADPH-Oxidase
p38 MAPK	p38 mitogenaktivierten Proteinkinase
PANC-1	humane duktale Pankreasadenomkarzinom-Zelllinie
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAR	Protease-activated receptor
PDCA	duktales Pankreasadenokarzinom
PCR, qPCR	Polymerase-Kettenreaktion, quantitative PCR
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RNA, mRNA	Ribonukleinsäure, messenger-RNA
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
R-Smad	Rezeptor-aktiviertes Smad
RTCA DP	Real-Time-Cell-Analyzer Dual Plate
SARA	Smad anchor for receptor activation
SBE	Smad-bindendes Element
siRNA	small interfering RNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SMURF	SMAD Ubiquitination Regulatory Factor
TAK1	TGF- $\beta$ -assoziierte Kinase 1
TBP	TATA-box binding protein
T $\beta$ RI	TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I (entspricht ALK5)
T $\beta$ RII	TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ II
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 6
UICC	Union internationale contre le cancer
USP	Ubiquitin-spezifische Protease

## Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Aussaatschema der Zellen .....	53
<u>Tabelle 2:</u> Transfektions-Beispiel Migrationsassay.....	55

## Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1:</u> Darstellung der absoluten und relativen Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose und nach Geschlecht (A) sowie dem relativen 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium und Geschlecht (B).....	12
<u>Abb.2:</u> Darstellung der unterschiedlichen Rollen von Rac1b im Prozess der EMT .....	32
<u>Abb. 3:</u> Darstellung der dualen Rolle von TGF- $\beta$ in der Tumorprogression in Abhängigkeit von der Rac1b-und Rac1-Expression .....	33
<u>Abb. 4:</u> Transfektions-Mechanismus durch kationische Lipide .....	54
<u>Abb. 5:</u> Aufbau der CIM-Plate®16 .....	67
<u>Abb. 6:</u> Quantifizierung der Rac1b Proteinexpression in Rac1b-depletierten-PANC-1-Zellen .....	72
<u>Abb. 7:</u> Einfluss der Rac1b-Depletion auf die Proteinexpression von ALK5 in PANC-1-Zellen .....	75
<u>Abb.8:</u> Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse (qPCR) der mRNA von ALK5 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.....	77
<u>Abb. 9:</u> Einfluss der RNA-Interferenz mit ALK-K232R auf die TGF- $\beta$ -induzierte Migration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen .....	80
<u>Abb. 10:</u> Effekt der siRNA-vermittelten Interferenz von ALK5 auf die TGF- $\beta$ -induzierte Migration von PANC-1-Zellen .....	83
<u>Abb. 11:</u> Einfluss des ALK5 - Silencing auf die durch TGF- $\beta$ -induzierte Migration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen .....	86
<u>Abb. 12:</u> Expression von SMAD7 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen .....	88

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Hintergrund

Die Entitäten der Krebserkrankungen stellen in Deutschland nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und vor Erkrankungen der Atemwege, die zweithäufigsten Todesursachen dar (Statistisches Bundesamt, 2018). Die malignen Neoplasien des Pankreas rangieren hinsichtlich Mortalität innerhalb der Gruppe der Tumorerkrankungen auf dem vierten Platz (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2016).

Das Pankreaskarzinom ist charakterisiert durch frühe Metastasierung, inadäquates Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie und eine Überexpression von Transforming Growth Factor - $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Dieses Zytokin besitzt eine pleiotrope physiologische und pathophysiologische Wirkung. In Tumoren wirkt TGF- $\beta$  einerseits hemmend auf die Proliferation, aber andererseits fördernd auf Migration und Metastasierung der Karzinomzellen. TGF- $\beta$  induziert maßgeblich die Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT), die den malignen Zellen einen mesenchymalen, invasiven Phänotyp verleiht (Fokas et al., 2015).

Die vorliegende Arbeit untersucht den molekularen Wirkmechanismus der inhibitorischen Wirkung des kleinen G-Proteins Rac1b auf die TGF- $\beta$ -induzierte Signaltransduktion, im Speziellen auf die Zellmigration, in Zellen des duktales Pankreasadenokarzinoms (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC). Sämtliche experimentellen Versuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind *in vitro* an PANC-1-Zellen durchgeführt worden, die von PDAC-Zellen (im Folgenden vereinfacht als „Pankreaskarzinom“ bezeichnet) abstammen (s. 2.9 Zelllinien).

Dieses Kapitel dient der Einführung in die Thematik. Es wird zunächst ein Überblick über essenzielle epidemiologische, diagnostische und therapeutische Gesichtspunkte des Pankreaskarzinoms gegeben. Anschließend werden relevante Faktoren und Regulatoren der TGF- $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion vorgestellt, z.B. das Zytokin Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1), des zellmembranständigen Rezeptors TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I (T $\beta$ RI, ALK5) und Typ II (T $\beta$ RII), der G-Proteine Rac1 und Rac1b, sowie der Smad-Proteine, sowie nachfolgender relevanter Signalwege. Abschließend erfolgt die Erläuterung der Hypothese und Zielsetzung dieser Promotionsarbeit.

## 1.2 Das duktale Pankreasadenokarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

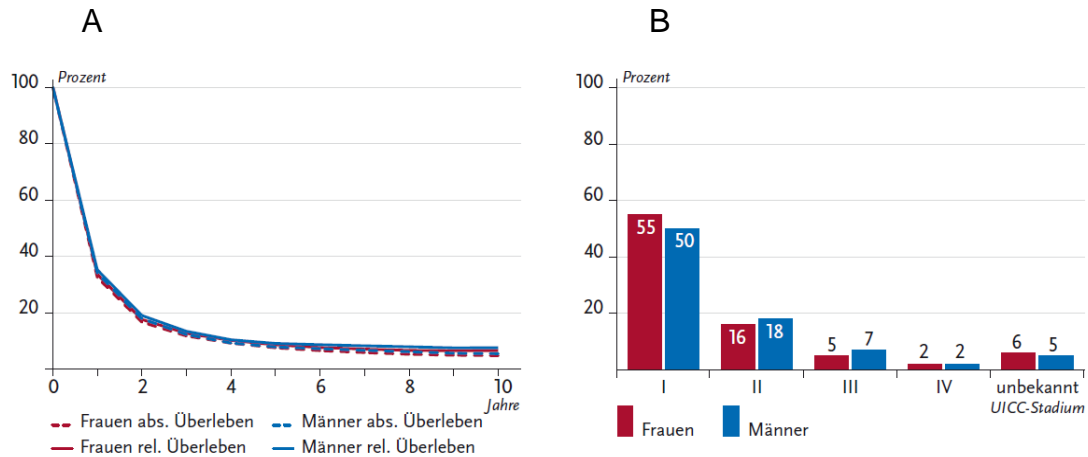
Die altersstandardisierte Inzidenz des Pankreaskarzinoms lag im Jahr 2016 in Deutschland bei Frauen bei 10,9/100.000 Personen pro Jahr und bei Männern bei 14,4/100.000 Personen pro Jahr. Trotz einer verhältnismäßig niedrigen Inzidenz mit 3,9% bei Frauen und 3,6% bei Männern innerhalb der Gruppe der Krebsneuerkrankungen lässt sich das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern an vierthäufigster Stelle aller krebsassoziiierter Todesursachen einordnen (Statistisches Bundesamt, 2015).

Es wird vorhergesagt, dass das Pankreaskarzinom in den USA bis zum Jahr 2030 von der viert- zur zweithöchsten krebsbedingten Todesursache aufsteigt (Rahib et al., 2014).

Das duktale Pankreasadenokarzinom, das 90% der Pankreaskarzinome bildet, ist eine der aggressivsten soliden Neoplasien der Industriestaaten (Adamska et al., 2017; Wong et al., 2017). Aufgrund der erst im fortgeschrittenen Erkrankungsalter auftretenden unspezifischen Symptome und der mehrheitlich späten Diagnose ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate ausgesprochen ungünstig: Sie liegt in Deutschland trotz stetiger Fortschritte in Diagnostik und Therapie für beide Geschlechter bei ca. 9% (Abbildung 1). Damit weist das Pankreaskarzinom neben dem Mesotheliom die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf. Mit Progress des Krankheitsstadiums nach UICC sinkt die 5 Jahresüberlebensrate rapide: Beträgt diese im UICC-Stadium I für beide Geschlechter ca. 50%, reduziert sich die 5 Jahres-Überlebensrate auf 2% im UICC-Stadium IV (Abbildung 1).

Diverse Umweltfaktoren spielen eine signifikante Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms (McGuigan et al. 2018): Zu den lebensstilbezogenen Risikofaktoren zählen der Zigaretten- und Alkoholabusus (Midha et al., 2016) und die häufig aus Letzterem resultierende chronische Pankreatitis (Korc et al., 2017; Bang et al., 2014). Weitere Hauptursachen sind inadäquate Ernährungsgewohnheiten (Nöthlings et al., 2005), Adipositas (Aune et al. 2012) und Bewegungsmangel (AMWF, 2013), sowie eine für die Erkrankung positive Familienanamnese (Becker et al., 2014; Permuth-Wey et al., 2009). Diabetes mellitus ist ein sehr gut belegter Risikofaktor; dies gilt sowohl für den Diabetes mellitus Typ I (Stevens et al., 2007), als auch für den Typ II (Huxley et al., 2015). Ein neu aufgetretener Diabetes mellitus kann die Erstmanifestation eines Pankreaskarzinoms darstellen. Aus diesem Grund

rückt der HbA1c-Wert als möglicher Biomarker zur Detektion des Pankreaskarzinoms zunehmend in den Fokus (Grote et al., 2011).



**Abbildung 1: Darstellung der absoluten und relativen Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose und nach Geschlecht (A) sowie dem relativen 5-Jahres-Überleben nach UICC-Stadium und Geschlecht (B).** Beide Grafiken beziehen sich auf die Entität bösartige Neubildung des Pankreas nach ICD 10 C25 und den Zeitraum 2015-2016 in Deutschland (Grafik aus Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2016).

### 1.2.2 Klinik und Diagnose

Der Mehrheit der Patienten mit einem Pankreaskarzinom weisen bei Diagnosestellung bereits Lymphknoten- und Fernmetastasen auf und 80-85% der Patienten haben einem fortgeschrittenen, irresektablen Befund (Vincent et al., 2011).

Die symptombezogene klinische Präsentation des Pankreaskarzinoms impliziert auf der einen Seite unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von mehr als 10% in den letzten sechs Monaten. Neu aufgetretene gürtelförmige Oberbauch- und Rückenschmerzen, ein schmerzloser Ikterus und eine akut manifestierende Pankreatitis unklarer Ätiologie bei Patienten über 50 Jahren sollten jedoch andererseits zur spezifischeren Diagnostik führen. Neben einer Oberbauch-Sonographie und einem CT, besteht der diagnostische Goldstandard aus einem Oberbauch-MRT, MRCP und MR-Angiographie (sog. "one-stop-shop"-Prinzip), der in einer Sitzung durchgeführt werden kann. Die histologische Sicherung der Diagnose erfolgt durch endosonographisch-gesteuerte Feinnadelpunktion

(Zamboni et al., 2013; AWMF, 2013). Das Glykoprotein Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA-19-9) besitzt eine hohe Sensitivität bezogen auf das Pankreaskarzinom. Es spielt eine zentrale Rolle im serologischen Diagnosemanagement bei symptomatischen Patienten mit Verdacht auf Pankreaskarzinom (Lee et al., 2004), als Verlaufsparemeter und Erfolgskontrolle hinsichtlich Therapieansprechen (Fahrman et al., 2018; AWMF, 2013).

### **1.2.3 Therapie**

Die chirurgische „R0-Resektion“ ist die einzige kurativ intendierte Therapiemöglichkeit des Pankreaskarzinoms (Garrido-Laguna et al., 2015; AWMF, 2013). Das klassische operative Vorgehen beim Pankreaskopfkarzinom ist die sog. partielle Duodenopankreatektomie, pyloruserhaltend nach *Traverso-Longmire* bzw. mit distaler Magenteilresektion nach *Whipple-Kausch*. Die Grenzen der Respektabilität sind fehlende Rekonstruktionsmöglichkeit des resezierten Gewebes (Heinrich et Lang, 2017) oder eine potenzielle Fernmetastasierung (Doi et al., 2007). Lediglich 15-20% der Patienten mit Pankreaskarzinom kommen für ein operatives, kuratives Vorgehen in Frage (Ryan et., 2014).

Additiv zur chirurgischen Therapie wird sechs Wochen postoperativ eine adjuvante Chemotherapie für sechs Monate mit den Pyrimidin-Antagonisten Gemcitabin oder 5-Fluoruracil durchgeführt (AMWF, 2013). Die Kombination der beiden Zytostatika bewirkt eine mittlere Überlebenszeit von ca. 28 Monaten (Neoptolemos et al., 2017). Eine systemische, palliative Chemotherapie verbleibt bis zum Progress oder bis zum Auftreten von inakzeptabler Toxizität als einzige Option (Shrikhande et al., 2017). Die Standard-Erstlinientherapie des metastasierten Pankreaskarzinoms in Deutschland ist seit 1997 die Monotherapie mit Gemcitabin, dessen 12-Monatsüberlebensrate bei 18% liegt (Burriss et al., 1997; Sultana et al., 2007). Die Kombination von Gemcitabin mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib im Sinne einer *targeted therapy* sorgt für ein höheres medianes Überleben nach 12 Monaten mit 23% (Moore et al., 2007). Bei gutem Performance Status und günstigem Risikoprofil des Patienten sind in Deutschland die Chemotherapieregime FOLFIRINOX (Kombination aus 5-Fluoruracil, Folinsäure/Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin; durchschnittlicher Überlebenszeitraum: 11,1 Monaten; Conroy et al., 2011) und Gemcitabin plus Nanoparticle-albumin-bound-(nab)- Paclitaxel (durchschnittlicher Überlebenszeitraum: 8,5 Monate; von Hoff et al., 2013) derzeit am effektivsten.

#### 1.2.4 Tumorbiologie

Über 95% der Pankreaskarzinome sind sog. Adenokarzinome und entstehen durch maligne Entartung des exokrinen Anteiles des Pankreasgewebes. Diese exokrinen Pankreaskarzinome gehen aus prämaligen Vorstufen des Gangepithels hervor und werden daher als duktale Pankreasadenokarzinome klassifiziert (AWMF, 2013). Das invasive PDAC stellt 90% aller Pankreaskarzinome dar (Feldmann et al., 2007), wovon etwa 60-70% im Pankreaskopf lokalisiert sind (Ryan et al., 2014). Es entwickelt sich konsekutiv aus einer Serie stufenweiser Mutationen der normalen Schleimhaut über spezifische Vorläufermutationen hin zu invasiven, malignen Neoplasien (Mohammed et al., 2014). Die drei häufigsten und am besten charakterisierten Vorläuferläsionen in der Genese des Tumorprozesses des PDCA sind die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinöse zystische Neoplasie (MCN) (Esposito et al., 2014). Die Gruppe der PanINs stellen die häufigste dieser Läsionen dar (Hruban et al., 2008): Die PanINs werden heutzutage in low-grade und high-grade PanIN eingeteilt; Letztere synonym zu einem Carcinoma in situ (Hruban et al., 2008). Das sog. „*PanINs-zu-PDCA-Progressionsmodell*“ ist assoziiert mit einer Kumulation diverser onkogener Mutationen der Gene der PanINs. Die genetischen Veränderungen wie Telomer-Verkürzung, K-RAS-Mutation, p-53- oder DPC4-Funktionsverlust in den dukталen Zellen führt zu deregulierten Signaltransduktionswegen (Hezel et al., 2006).

Eine im Jahr 2008 veröffentlichte Studie führte eine Genomanalyse von 24 humanen PDAC durch und untersuchte insgesamt 20.661 proteinkodierte-Gene. Es konnten durchschnittlich 63 genetische Veränderungen pro PDCA festgestellt werden, diese waren mehrheitlich Punktmutationen. Diese genetischen Veränderungen wiesen eine hohe Heterogenität auf und betrafen unterschiedliche Signaltransduktionswege und zellbiologische Regulationsvorgänge. Ferner wurden sog. „*core pathways*“ detektiert, ein zwölfteiliger Kernsatz von Veränderungen zellulärer Signalwege und -prozesse, die jeweils in 67 bis 100% der Tumore vorhanden waren. Dabei erwies sich der TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktionsweg als einer von lediglich vier Signalwegen, die mit mindestens einem Gen in 100% aller PDCA verändert waren (Jones et al., 2008).

### 1.3 Der Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF- $\beta$ )

Der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein Zytokin mit pleiotropen, zellulären Funktionen, das erstmalig Anfang der 1980er Jahre bei Fibroblasten-Zelllinien beschrieben wurde. Ursprünglich wurden Faktoren der phänotypischen Transformation analysiert, um den Mechanismus der Karzinogenese näher zu untersuchen (Roberts et al., 1981; Anzano et al., 1983).

Die sog. „TGF- $\beta$ -Superfamilie“ umfasst mehr als 30 humane, strukturell verwandte Polypeptide. Dazu zählen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie die TGF- $\beta$  Isoformen, Aktivine, Inhibine, Anti-Müller-Hormon und das Bone Morphogenetic Proteins (BMP; Massague, 1998; Derynck et Feng, 1997). Bei Säugetieren sind innerhalb der TGF- $\beta$ -Subfamilie die drei Isoformen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 am genauesten erforscht (Morikawa et al., 2016). Hierbei ist TGF- $\beta$ 1 die häufigste vorkommende Isoform (Batlle et Massague, 2019). Die drei Isoformen werden initial als Prohormone synthetisiert, die eine Signalsequenz, einen großen N-terminalen Anteil, das sogenannte Latenzassoziierte Peptid (*Latency-associated Peptide*, LAP) und ein kurzes C-terminales Segment, das dem reifen aktiven Zytokinmonomer entspricht, enthalten. Die Synthese der reifen und aktiven Isoformen erfolgt über diese biologisch inaktiven Vorläufermoleküle, durch proteolytische Spaltung des Propeptids LAP. TGF- $\beta$  bildet über Disulfidbrücken vor allem Homo- und in Spuren Heterodimere aus. In seiner aktiven Form liegt TGF- $\beta$  als homodimeres Zytokin mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa vor (Travis et Sheppard, 2014).

TGF- $\beta$  stellt sich als multifunktionales Protein mit vielfältigen physiologischen Funktionen dar: Es moduliert grundlegende zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Gewebedifferenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration in epithelalem und neuronalem Gewebe. Ferner begünstigt TGF- $\beta$  die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix (Roberts, 1998). Des Weiteren produzieren die meisten Immunzellen, wie bspw. unreife hämatopoetischer Zellen, aktivierte T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen TGF- $\beta$  und/oder besagte Zellen sind sensitiv für dessen Effekte. Die resultierende Wirkung von Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der Immunzellen gilt sowohl für den autokrinen als auch für den parakrinen Sekretionsmodus (Letterio et Roberts, 1998). Natürliche Killerzellen (NK) reagieren umgehend auf virusinfizierte und onkogene Zellen, da sie in der Lage sind, diese Zellen und eine ausbleibende, adap-

tive Immunantwort zu erkennen und dementsprechend eine unverzügliche Immunreaktion einleiten können. Der TGF- $\beta$ -Signalweg blockiert diese NK auf in diversen Bereichen (Batlle et Massague, 2019).

Pathophysiologisch spielt TGF- $\beta$  ebenfalls eine zentrale Rolle in der Entstehung diverser Krankheiten. Eine deregulierte TGF- $\beta$ -Signalkaskade kann zu atherosklerotisch bedingten Gefäßkrankheiten, Autoimmunerkrankungen und über eine gesteigerte Produktion extrazellulärer Matrix zu fibrosierenden Erkrankungen der Lunge, Leber und Nieren führen (Roberts, 1998).

Die entscheidenden physiologisch-regulatorischen Funktionen von TGF- $\beta$  sind, bei Fehlfunktion dieses Signalweges, jedoch verbunden mit signifikanten Folgen in der Karzinogenese: Praktisch alle menschlichen Zelltypen sind TGF- $\beta$ -sensitiv. Eine Überexprimierung von TGF- $\beta$  im Tumorgewebe ist assoziiert mit einer schlechten Prognose zahlreicher Karzinome wie bspw. Pankreaskarzinome (Hahn et al., 1996; Goggins et al., 1998), kolorektaler Karzinome (Woodford-Richens et al., 2001), Magenkarzinome (Pinto et al., 2003), Lungenkarzinome (Paiva et al., 2012) und Mammakarzinome (Owens et al., 2014).

TGF- $\beta$  zeichnet sich in unterschiedlichen Progressionsstadien der Karzinogenese durch unterschiedliche Rollen und Effekte aus: In normalen und prämaligen Zellen sorgt TGF- $\beta$  für die Zellhomöostase und besitzt eine tumorsuppressive Wirkung. Diese inhibitorische Wirkung beinhaltet zum einen direkte Effekte auf die Zellen wie Proliferationsinhibition und Induktion der Apoptose. Zum anderen wirkt TGF- $\beta$  im Stadium der Tumorentstehung tumorsuppressiv durch indirekte Effekte auf das Stroma, indem es die tumorerzeugende Inflammation und Stroma-assoziierte Mitogene hemmt (Massagué, 2008, Massagué, 2012).

In fortgeschrittenen Krankheitsstadien wirkt TGF- $\beta$  hingegen als Tumorpromotor: Hier kann es in den Karzinomzellen durch Mutationen, Resistenzbildung gegenüber der Wirkung von TGF- $\beta$  oder durch selektive Inaktivierung der antiproliferativen TGF- $\beta$ -Wirkung zu einem Verlust der tumorsuppressiven Wirkung kommen. Die Tumorzellen nutzen diese tumorfördernde Wirkung des TGF- $\beta$  als Selektionsvorteil: Die Verstärkung der Tumorgenese durch TGF- $\beta$  wird u.a. durch erhöhte Wachstumsfaktorenproduktion, verstärkte Angiogenese, Mobilisation des malignen Gewebes und Umgehung der Immunüberwachung vermittelt (Massagué, 2008, Massagué, 2012). Dieses Phänomen der stadienabhängigen gegensätzlichen Wirkung

von TGF- $\beta$  in der Karzinogenese wird als „*TGF- $\beta$ -Paradoxon*“ bezeichnet (Morrison et al., 2013; Zarzynska, 2014).

Elementarer Bestandteil der Karzinogenese ist die Induktion der sog. epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die maßgeblich von TGF- $\beta$  initiiert wird: Diese verleiht Epithelzellen durch Änderung des Genexpressionsmusters einen mesenchymalen, fibroblastenartigen und invasiven Phänotyp. Die modifizierten Zellen neigen dadurch verstärkt zur Migration und Metastasierung (Xu et al., 2009; Heldin et al., 2012). Ferner modifiziert TGF- $\beta$  das unmittelbar umliegende Stroma-Gewebe der Tumorzellen im Sinne einer lokalen Mobilisation und dem Schaffen vorteilhafter Bedingungen für das Überleben der neoplastischen Zellen. In den fortgeschrittenen Stadien überwiegt die prometastatische Wirkung, TGF- $\beta$  fungiert in diesen Karzinomzellen als Tumorpromotor (Massague et al., 2000; Massague, 2008; Drabsch et Ten Dijke, 2011).

Zusammenfassend zeichnet sich die TGF- $\beta$ -Signalkaskade durch eine „dichotome“ Wirkung (Zhang, 2017) aus: Es wirkt einerseits tumorsuppressiv durch Proliferationshemmung, andererseits tumorfördernd durch prometastatische Effekte und den Prozess der EMT. Die genaue Regulation dieser entgegengesetzten Effekte führen zu einem großen Interesse des genaueren Verständnisses der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion. In Tumorzellen mit Mutationen oder selektiven Inaktivierungen der Komponenten dieses Signalweges, kommt es zu einer Aufhebung des antiproliferativen TGF- $\beta$ -Effektes. Daraus ergibt sich ein Selektionsvorteil, da die Zellen in späteren Stadien der Karzinogenese von den metastasierungsfördernden Wirkungen von TGF- $\beta$  profitieren. Daher sind die Pathophysiologien und deren Auswirkungen innerhalb des TGF- $\beta$ -Signalweges, sowie seine Manifestation und Beteiligung in diversen malignen Neoplasien, als mögliches Ziel in der Therapie metastasierender Erkrankungen von höchstem wissenschaftlichem Interesse.

### **1.3.1 Rezeptoren und Signalwege**

Die zellulären TGF- $\beta$ -Wirkungen werden durch zwei Rezeptoren vermittelt, die vorwiegend Serin-/Threoninkinaseaktivität aber auch Tyrosinkinaseaktivität (Lee et al., 2007; Heldin et al., 2016) besitzen. TGF- $\beta$  bindet an die beiden membranassoziierten Rezeptoren TGF- $\beta$ -Typ-1-Rezeptor (T $\beta$ RI), auch bekannt als *activin-receptor-like kinase 5* (ALK5), und TGF- $\beta$ -Typ-2-Rezeptor (T $\beta$ RII) (Ebner et al., 1993; Wrana

et al., 1992; Massagué, 1998). Beide Rezeptoren bestehen jeweils aus einer extrazellulären Domäne, an der die Liganden binden, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Prime et al., 2004; Heldin et Moustakas, 2016).

Der Ligand TGF- $\beta$  bindet hochspezifisch an die Extrazellulärdomäne des konstitutiv aktiven T $\beta$ RII (Lin et Wang, 1992), das als Homodimer vorliegt. Die Bindung erfolgt entweder direkt oder mit Hilfe des assessorischen Co-Rezeptors Betaglykan (BG; auch als T $\beta$ RIII deklariert), der v.a. eine Präsentation des TGF- $\beta$  für den T $\beta$ RII (Battle et Massagué, 2019) bewirkt. Bei der Bindung bildet dieser Präkomplex mit zwei T $\beta$ RI einen heterotetrameren Komplex (Ehrlich et al., 2012; Massagué, 2012). Bei der Ligandenbindung phosphoryliert die intrazelluläre Domäne des T $\beta$ RII die Serin- und Threoninreste von T $\beta$ RI und aktiviert diesen Rezeptor. Dabei wird hier die sog. „GS-Domäne“, ein mit Glycin und Serin angereicherter Bereich, der vor der eigentlichen Kinase-Region des Rezeptors liegt, phosphoryliert (Wrana et al. 1994). Mittels eines ähnlichen Mechanismus, der die GS-Domänen-Phosphorylierung impliziert, wird eine Aktivierung anderer T $\beta$ RI, wie bspw. für Activin oder BMP bewirkt (Willis et al. 1996; Massagué 1998).

Dieser nun vorliegende aktivierte Rezeptorkomplex kann im Nachfolgenden durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden die TGF- $\beta$ -induzierten Wirkungen vermitteln. Hierbei differenziert man zwischen Smad-abhängigen und Smad-unabhängigen Signalwegen (Feng et Derynck, 2005; Massagué, 2012; Heldin et Moustakas, 2016).

### **1.3.2 Smad-abhängige Signalwege**

Ein essenzieller, TGF- $\beta$ -vermittelter intrazelluläre Signalweg wird über die Smad-Proteinfamilie bewirkt (Derynck et Budi, 2019). Das Genom von Säugetieren codiert acht intrazellulär lokalisierte und funktionell unterschiedliche Smad Proteine, die in drei Untergruppen klassifiziert werden: Diese sind „Receptor- activated Smads“ (R-Smads; Smad1/2/3/5/8), allgemeines Smad (Smad4) und die inhibitorischen Smads (I-Smads; Smad6 und Smad7). Die für die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion bedeutendsten Vertreter sind Smad2 und Smad3. Die Serin- und Threoninkinaseaktivität des durch T $\beta$ RII aktivierten T $\beta$ RI phosphoryliert Smad2 und Smad3. (Wrana et al., 1994; Shi et Massagué, 2003; Wrighton et al., 2009; Moustakas et Heldin, 2009)

an seiner C-terminalen Domäne einer „Ser-X-Ser“-Sequenz (Massagué, 2012). Somit entstehen „R-Smads“. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor und den R-Smads wird durch Hilfsproteine wie SARA (*Smad anchor for receptor activation*) vermittelt. Die so entstandenen „receptor-activated/phosphorylated Smads (R-Smads) 2 und 3 sind nun in der Lage einen heterodimeren Komplex mit dem Co-Mediator Smad4 zu bilden (Moustakas et Heldin, 2009). Das Smad4-Protein ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus verteilt (Hata et Cheng, 2016). Nach der Rezeptoraktivierung und der Komplexbildung mit Smad2 und Smad3 erfolgt die Translokation des Komplexes in den Nukleus. Hier bindet der Komplex entweder direkt über zelltypische, spezifische DNA-Bindungsproteine (Massagué, 2000), wie bspw. *smad-binding-element (SBE)* oder mit Hilfe von gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren, -Co-Aktivatoren oder Co-Suppressoren an die Promotorregion bestimmter Zielgene. Anschließend erfolgt die Expression von TGF- $\beta$ -Zielgenen (Shi et Massagué, 2003; Feng et Derynck, 2005). Somit führt eine TGF- $\beta$ -Stimulation der Zelle über diesen Signalweg und der Kombination mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu positiven und negativen Veränderungen der Expression hunderter Gene (Massagué, 2008). Weitere Smad-Proteine wie Smad1, Smad5 und Smad8 werden ebenfalls durch den T $\beta$ RI über den BMP-Signalweg aktiviert.

Die I-Smads Smad6 und Smad7 hingegen führen zu einer Hemmung der Wirkungen der TGF- $\beta$ -induzierten Signalkaskade (Singh et al., 2012). Sie interferieren und beeinträchtigen die Interaktion des T $\beta$ RI mit den R-Smads, bewirken einen Abbau des an der Zelloberfläche gelegenen T $\beta$ RI, beugen die Komplexbildung von R-Smads mit Smad4 vor und verhindern die Translokation des Komplex in den Nukleus (Miyazawa et Miyazono, 2017).

Das I-Smad7-Protein aktiviert sog. SMURF Ubiquitin-Ligasen (Smurf1 und Smurf2), die den Rezeptor markieren (ubiquitinylieren), damit dieser durch Proteasomen abgebaut wird. Smad7 hat somit einen hemmenden Einfluss auf den TGF- $\beta$ -Signalweg im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus (Seoane et Gomis, 2017). Die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (*USP*) 4, 11 und 15 stehen diesem Prozess entgegen, indem sie für Rezeptorstabilität sorgen (Zhang et al., 2012; Batlle et Massagué, 2019).

### 1.3.3 Smad-unabhängige Signalwege

Die Signalwirkung von TGF- $\beta$  wird auch über Signalkaskaden, die als „Smad-unabhängige Signalwege“ deklariert werden (Moustakas et Haldin, 2005; Zhang, 2009; Mu et al., 2012) vermittelt. Hierzu zählen insbesondere die mitogenaktivierte Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK) ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) und p38 (Lei et al., 2014). Ein zentraler Bestandteil der Smad-unabhängigen Signalwege sind darüber hinaus die G-Proteine Rac1 und Rac1b aus der Familie der Rho-GTPasen (Zhang, 2009).

Der, wie bereits beschrieben, aktivierte T $\beta$ RI rekrutiert und aktiviert im Folgenden „ShcA“ durch Phosphorylierung an dessen Tyrosin- und Serinresten (Lee et al., 2007). ShcA ist ein Adapter-Protein, das eine SH2-Domäne und ein Phosphat-Tyrosinbindungs-Motiv (PTB) besitzt. Das PTB wird zur Akquise und Aktivierung von aktivierter *receptor tyrosine kinases* (RTK) verwendet, die ein Ausgangspunkt weiterer Schritte in intrazellulären Signalwegen sind und somit eine wichtige regulatorische Funktion in der Tumorgenese einnehmen (Ahn et al., 2013).

Die phosphorylierten Tyrosinreste von ShcA bewirken eine Rekrutierung des ShcA-Grb2-Sos-Protein-Komplexes in unmittelbarer Nähe von Ras an der Plasmamembran.

Ras (Rat sarcoma), ist ein Proto-Onkogen, das für ein G-Protein kodiert. Es stellt ein zentrales Glied in verschiedenen Signaltransduktionswegen dar, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren und wurde erstmals 1981 in karzinomerzeugenden Viruszellen detektiert (Parada et al., 1981). Ras und Ras-assoziierte Proteine sind in 33% aller menschlichen Karzinome mutiert (Schmukler et al., 2014), speziell in malignen Neoplasien der Lunge, Kolon und Pankreas. Dies führt u.a. zur gesteigerten Invasion und Metastasierung und geringerer Apoptose-Rate führt (Jemal et al., 2010; Simanshu et al., 2017).

Ras wird durch das SOS-Protein aktiviert, indem es die Freisetzung von GDP und den anschließenden Austausch mit GTP ermöglicht (Zhou et al., 2016). In der nachfolgenden Signaltransduktionskette kommt es über vorgeschaltete Kinasen und Effektorproteine wie Raf und MEK letztlich zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 MAPK als Bestandteil eines Smad-unabhängigen Signalweges. Aktiviertes ERK 1/2 transloziert in den Zellkern, wo es durch Phosphorylierung eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. ERK1/2 spielt eine essenzielle Rolle in der

TGF- $\beta$ -induzierten EMT und ist erforderlich für den Abbau von Adhäsionsverbindungen und der erhöhten Zellmobilität (Zavadil et al., 2001; Xie et al., 2004). Zusätzlich reguliert ERK1/2 die Aktivität von R-Smads durch direkte Phosphorylierung (Kretzschmar et al., 1997, 1999; Funaba et al., 2002).

Ebenfalls relevant ist die p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (Lei et al., 2014). Sie wird wie die c-Jun-aminoterminal Kinase (JNK) und die I $\kappa$ B Kinase (IKK) TGF- $\beta$ -abhängig aktiviert: TGF- $\beta$  induziert die Aktivierung der p38 MAPK mit Hilfe der MAP-Kinase Kinasen 3 oder 6 (MKK3 oder MKK6) in verschiedenen Zelllinien (Hanafusa et al. 1999; Bhowmick et al. 2001; Yu et al. 2002). Bei einer Ligandenbindung von TGF- $\beta$  an den durch Autophosphorylierung aktivierten T $\beta$ R-Komplex (T $\beta$ RI und T $\beta$ RII) interagiert dieser mit dem Signalmolekül Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF6). Der T $\beta$ RI bewirkt eine intramolekulare Polyubiquitylierung von TRAF6, der so aktiviert wird. Der aktivierte TRAF ist nun in der Lage die TGF- $\beta$ -assoziierte Kinase (TAK1) zu polyubiquitylieren (Sorrentino et al., 2008; Yamashita et al., 2008), die anschließend u.a. MAPK p38 aktivieren kann. Daraufhin transloziert p38 in den Nukleus und phosphoryliert gezielt Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren kooperieren mit Smad-Proteinen, die gemeinsam zelluläre Apoptose-, Invasions- und Metastasierungsvorgänge, sowie die EMT regulieren.

Die Smad-abhängige Induktion der Expression des Mediators *Growth arrest and DNA damage 45 $\beta$*  (GADD45 $\beta$ ) bewirkt eine Bindung des GADD45 $\beta$ -Proteins an MKK4 (ein Mitglied der Familie der MAPKKK Kinasen). Dies sorgt wiederum für eine Aktivierung der folgenden p38 MAPK-Signalkaskade (Takekawa et al., 2002).

Unabhängig von der Smad-Beteiligung wird die p38 MAPK-Aktivität, durch TRAF6 und TGF- $\beta$  -induziert, über die I-Smad-Proteine Smad6 und Smad7 reguliert. Sowohl TGF- $\beta$  als auch BMP induzieren die Expression dieser beiden I-Smads, die wiederum Smad-abhängige, TGF- $\beta$ /BMP-Signalwege inhibieren (Afrakhte et al. 1998; Miyazawa et al. Miyazono, 2008). Smad6 und Smad7 hemmen auch die BMP-induzierte TAK1- und p38-MAPK-Aktivierung, möglicherweise durch Interaktion mit TAK1 oder dem TAK1-bindenden Protein, „TAB1“ (Kimura et al. 2000; Yanagisawa et al. 2001).

Smad6 inhibiert die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivierung von TAK1, JNK und p38 MAPK. Indem Smad6 die Deubiquitylase A20 mit TRAF6 assoziiert, wird dessen Fähigkeit zur Polyubiquitylation von TAK1 gehemmt (Jung et al., 2013).

Smad7 hingegen inhibiert die BMP-induzierte p38 MAPK-Aktivität, erleichtert jedoch kontrastiv dazu die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivität von p38 MAPK (Mazars et al., 2001). Es wirkt bei zweitgenannter Signaltransduktion als eine Art Gerüstprotein, dass für einen Zusammenbau von TAK1, MKK3, and p38 MAPK sorgt (Edlund et al., 2003; Jung et al., 2013) und damit den Signalweg verstärkt. Bei einem Erklärungsansatz der dichotomen Wirkung von Smad7 hinsichtlich BMP oder TGF-induzierten p38 MAPK-Aktivierung spielen *lipid rafts* (dt.: „Lipidflöße“) eine entscheidende Rolle. Sie stellen spezielle Bereiche in Zellmembranen mit erhöhtem Gehalt an Sphingomyelinen, Glycosphingolipiden und Cholesterin dar (Bieberich, 2018). Endogenes TRAF6 ist mit *lipid rafts* assoziiert (Hae et al., 2003a), und die T $\beta$ RI-Lokalisationen in diesen Bereichen sind essenziell für die TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung von ERK1/2, JNK und p38 MAPK (Zuo et Chen 2009; Shapira et al. 2014). Die Erhöhung der TGF- $\beta$ -induzierten Aktivierung dieser Signalkaskaden wird möglicherweise vollzogen, indem Smad7 die TGF- $\beta$ -Rezeptoren zu den *lipid rafts* führt, wo TRAF6 lokalisiert ist (Zhang, 2017). Im Gegensatz zum TGF- $\beta$ -Rezeptorsignal, spielt die Assoziation von BMP-Rezeptoren mit *lipid rafts* keine zentrale Rolle für die p38 MAPK-Aktivierung (Zhou et al., 2010). Dieser Umstand könnte erklären, warum Smad7 bei der TGF- $\beta$ -vermittelten Induktion von p38 MAPK verstärkend und bei der BMP-vermittelten Induktion von p38 MAPK suppressiv wirkt.

#### **1.3.4 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)**

Unter dem Begriff der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) versteht man einen biologischen mehrstufigen Umwandlungsprozess, der erstmals 1982 als „epithelial-mesenchymale Transformation“ beschrieben wurde (Greenburg et Hay, 1982; Hay, 1995). Polarisierte Epithelzellen, die normalerweise mit der Basalmembran interagieren, erhalten durch verschiedene Veränderungen des Genexpressionsmusters einen mesenchymalen, fibroblastenartigen Typ. Dieser mesenchymale Phänotyp ist mit einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit, sowie verstärkten Apoptose- und Chemoresistenz verbunden. Darüber hinaus ist er in der Lage, Extrazellulärmatrix zu produzieren (Thiery et al., 2009; Kalluri et Weinberg, 2009). Es werden eine Reihe von unterschiedlichen molekularen Prozessen durchlaufen, um eine EMT zu initiieren bzw. abzuschließen:

Dazu gehören die Expression spezifischer Zelloberflächenproteine, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Reorganisation und Expression von Zytoskelett-Proteinen, die Produktion von Enzymen, die die Extrazellulärmatrix abbauen und Veränderungen in der Expression spezifischer mikroRNA (Kalluri et Weinberg, 2009). Bei der Untersuchung der EMT dienen verschiedene beteiligte Faktoren als Biomarker, die beim Phänotypwechsel der Zelle exprimiert werden. Epitheliale Zellen verfügen über E-Cadherine und Zytokeratine, die intakte Zell-Zell-Interaktionen durch Adhäsionsverbindungen, Desmosomen, tight junctions und gap junctions ausbilden (Yeung et Yang, 2017). Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin als epithelialer Marker wird herunterreguliert, sodass sich die Zellen aus dem kohäsiven Verband lösen können (Behrens et al., 1998). Des Weiteren spielen N-Cadherin, Laminin und Vimentin als mesenchymale Marker und Slug/Snail2 und Snail als EMT-assoziierte Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle (Kalluri et Weinberg, 2009).

Die EMT wird in drei Typen eingeteilt: Während der Typ 1 die EMT bei der normalen Embryogenese und Organentwicklung beschreibt (Thiery et Sleeman, 2006), ist die EMT Typ 2 assoziiert mit Wundheilung und fibrosierenden Prozessen (Kim et al., 2006; Zeisberg et al., 2007). Die EMT Typ 3 stellt schließlich den Zusammenhang zur Tumorprogression und Metastasierung bei Karzinomzellen her. Die Aktivierung eines „EMT-Programmes“ und dessen hohe Relevanz hinsichtlich der Progression maligner Neoplasien ist in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien festgestellt worden (Thiery, 2000; Ye und Weinberg, 2015; Nieto et al., 2016; Shibue et Weinberg, 2017). Die EMT Typ 3 ist ein komplexer morphologischer und metabolischer Transformationsprozess der Karzinomzellen und essentiell für die Tumorprogression. Die durch EMT-induzierte mesenchymale Veränderung der Karzinomzellen ermöglicht es diesen viele Schritte der Invasions-Metastasierungskaskade zu komplettieren, einschließlich der lokalen Invasion neoplastischer Zellen in der Primärtumorstelle, Invasion in Blutgefäße und Motilitätserhöhung, Paravasation in das Parenchym von entlegenen Geweben und erhöhte Persistenz-Wahrscheinlichkeiten durch mikrometastatische Ablagerung (Thiery, 2002; Lambert et al., 2017). Ferner ist die Aktivierung des EMT-Programmes eine wichtige Voraussetzung für den Erwerb von Stammzelleigenschaften. Dies gilt für diverse Karzinome wie bspw. von Pankreas, Prostata, Kolon und Ovarien (Mani et al., 2008; Rasheed et al., 2010; Kong et al., 2010; Fan et al., 2012; Long et al., 2015). Die relevantesten Schritte, die die Karzinomzellen speziell bei der EMT Typ 3 durchlaufen, sind Suppression

epithelialer Marker, Heraufregulation mesenchymaler Marker, Verlust der Zellpolarität, Reorganisation des Zytoskeletts und Erwerb von Stammzellcharakteristika assoziiert mit einem mesenchymalen Phänotyp (Xu et al., 2009; Lamouille et al., 2014).

Das Zytokin TGF- $\beta$  ist ein Hauptinduktor der EMT (Heldin et al., 2008; Xu et al., 2009; Katsuno et al., 2013; David et al., 2016;). Diverse Signalwege, wie TGF- $\beta$ , WNT, NOTCH, Wachstumsfaktor-abhängige Tyrosinkinase (Yeung et Yang, 2017) und TNF- $\alpha$  (Wu et al., 2009) sind an der zellulären Entwicklung der EMT beteiligt. Sie führen zu einer Aktivierung von DNA-bindenden-Transkriptionsfaktoren, wie bspw. *high mobility group A2* (HMGA2), Helix-Loop-Helix-Proteine Twist, die Zinkfinger Proteine Snail1/2, Slug und ZEB1/2 (Peinado et al., 2007; Heldin et al., 2012). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren sich gegenseitig, so führt bspw. Snail zu einer Hochregulation von Slug (Thuault et al., 2008). Es kommt zu einer „nuklearen Umprogrammierung“ der Zelle (Xu et al., 2009). Gemeinsam inhibieren sie die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin und anderen epithelialen Markern, während sie die Expression von mesenchymalen Markern wie u.a. N-Cadherin und Fibronectin erhöhen (Xu et al., 2009; Heldin et al., 2012).

Die TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung von Smad-Komplexen und deren Interaktion mit essenziellen Transkriptionsfaktoren spielt eine elementare Rolle in der Induktion des EMT-Prozesses (Piek et al., 1999; Valcourt et al., 2005; Deckers et al., 2006). Während Smad3 und Smad4 die EMT fördern, inhibiert Smad2 die EMT (Hoot et al., 2008). Mechanismen, die die Smad-Aktivitätslevel verändern, beeinflussen ebenfalls die EMT, dass die Wichtigkeit der Smad-Komplexe innerhalb der TGF- $\beta$ -induzierten EMT zeigt: Eine Ubiquitinierung von Smad4 (Dupont et al., 2009) führt zu einer abgeschwächten EMT (Hesling et al., 2011). Ein Funktionsverlust von Smad4 kann in Pankreaskarzinomzellen eine EMT verhindern (David et al., 2016). Auf der anderen Seite führt eine Inhibition des EMT-hemmenden Smad2-Proteins zur einer verstärkten EMT (Hoot et al., 2008; Runyan et al., 2009). Der Smad-Signalweg induziert eine stark erhöhte Expression von HMGA2, ein nukleares Protein, das dazu in der Lage ist, weitere Transkriptionsfaktoren wie Snail1/2 und Twist zu erhöhen (Thuault et al., 2006; Thuault et al., 2008). Schließlich spielen microRNAs (miRNA) ebenfalls eine wichtige Rolle in der Stabilitäts-erhaltung des TGF- $\beta$ -Rezeptors und den Smad-Proteinen (Hao et al., 2019).

## 1.4 Rac1 und Rac1b

### 1.4.1 Rac1

Die G-Proteine Rac1 und Rac1b lassen sich der Familie der Rho-GTPasen zuordnen, zu denen u.a. auch *Rho* und *Cdc42* zählen. Sie sind kleine Proteine (190-250 Reste) und besitzen eine GTPase-Domäne, sowie kurze N- und C-terminale Erweiterungen. Sie binden GDP mit hoher Affinität und können über die Hydrolyseaktivität der GTPase-Domäne gebundenes GDP mit GTP austauschen. Damit befinden sie sich im aktiven Zustand und leiten anschließend intrazelluläre Signale weiter. Zusammenfassend zirkulieren sie in einem aktiven, GTP-gebundenen und inaktiven, GDP-gebundenen Zustand (Wennerberg, 2004).

Das ubiquitär exprimierte Mitglied der RhoGTP-Bindungsproteine Rac1 spielt eine zentrale Rolle in den zellulären Prozessen von Zellmorphologie, Mobilität und Mitoseverhalten: Rac1 ist an der Regulation des Aktinzytoskelettes, der Formierung von Lamellopodien sowie fokalen Adhäsionsverbindungen, die die Zellmotilität erhöhen, dem endozytotischen Vesikel-Transport und der Rezeptorendozytose beteiligt (Parri et. Chiarugi, 2010; Mack et al., 2011; Yang et al., 2012). Außerdem verstärkt Rac1 die Zellproliferation und schützt die Zellen vor Apoptose durch seine Fähigkeit der Aktivierung diverser Effektoren wie bspw. ERK1/2 (Rul et al., 2002), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K; Keely et al., 1997), Transkriptionsfaktor NFκB (Perona et al., 1997; Bosco et al., 2009) und p21-activated-kinase-1 (PAK1; Du et al., 2011). Weiterhin ist Rac1 in Neoplasien diverser Gewebe, wie bspw. von Brustdrüsen, Kolon und Pankreas (Fritz et al., 1997; Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000) reichlich überexprimiert. Überexprimierungen sind im Allgemeinen eine Folge der verbesserten, vorgeschalteten Signalaktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, PI3K oder einer reduzierten Rac-Inaktivierung durch GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase-accelerating proteins*; GAPs).

In PDAC-Zellen wurde eine fehlregulierte Expression von Rac1 im Tumorstroma detektiert (Crnogorac-Jurcevic et al., 2001) zusammen mit einer erhöhten Aktivität von Vav1, einem Guanin-Austauschfaktor (*guanin exchange factor*, GEF), der eine hohe GEF-Aktivität für Rac1 aufweist (Fernandez-Zapico et al., 2005). Fehlregulationen von RHO- oder Rac-Proteinen resultieren entweder aus Überexpression oder Überaktivierung bspw. aufgrund eines verbesserten GDP-GTP-Austausches und/oder beeinträchtigter GTP-Hydrolyse. Ein weiterer, seltener Grund sind aktivierende

Mutationen (Alan et Lundquist, 2013). Zusätzlich wirkt Rac1 stimulierend auf die Proliferation von Pankreastumorzellen, indem es synergistisch mit dem Liganden-aktivierten *epidermal growth factor receptor* (EGF-R) eine Hochregulation von *cyclin D1* bewirkt. (Fernandez-Zapico et al., 2005). Rho-GTPasen spielen bedeutende Rollen in der Regulation des korrekten Ablaufes des Zellzyklus. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivität von Rac1 suffizient zu einer Suppression von p21, einem *cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI) führt (Knight-Krajewski et al., 2004).

In Studien mit Maus-Modellen mit Pankreaskarzinomen konnte die zentrale Rolle der onkogenen K-Ras-gesteuerten Rac1-Signalgebung in der Initiierung und Progression dieser Tumorentität herausgestellt werden. Mutationen von *K-Ras*-Genen treten in 95% der Fälle von Pankreaskarzinomen auf (Uemura et al., 2004). Die Pankreas-spezifische Aktivierung von K-Ras führte zur Metaplasie von azinären zu duktalem Zellen (*acinar-to-ductal-metaplasia*; ADM) und zur Bildung von *PanIN*-Vorläuferläsionen. *K-Ras*-Gen-Mutationen wurden in intraduktalen Pankreastumoren, duktalem Hyperplasien und chronischer Pankreatitis detektiert (Maisonneuve et Lowenfels, 2002). Es wurde festgestellt, dass in diesen Modellen eine Pankreas-spezifische Depletion von Rac1 zu einer Aufhebung der Entwicklung einer ADM, einer verzögerten Bildung von *PanIN*, einer Blockade der Tumorentwicklung und einer signifikant höheren Überlebensrate führte (Kissil et al., 2007; Heid et al., 2011). Daher kamen die Autoren zu dem Schluss, dass bei Mäusen Rac1 schon in einer frühen Phase der Entwicklung von Pankreaskarzinomen für metaplastische Veränderungen und Neoplasie-assoziierte Aktin-Umbauten erforderlich ist. Dementsprechend könnte Rac1 als diagnostischer Marker oder therapeutisches Ziel für PDAC etabliert werden.

Ferner stellt die Aktivierung von RhoGTPasen, speziell von Rac1 einen zentralen Schritt im Prozess der EMT, einen wahrscheinlichen Mitverursacher der tubulointerstitiellen Fibrose (Patel et al., 2005) und der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) während der Somitogenese dar (Nakaya et al., 2004). Rac1 ist eine wichtige Untereinheit der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-produzierenden NADPH-Oxidase (NOX) und ist sowohl an der ROS-Produktion in diversen Tumorentitäten (Juhasz et al., 2009) als auch an der ROS-vermittelten Signalgebung beteiligt (Hordijk, 2006).

Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion vollzieht sich innerhalb der Smad-unabhängigen Signalwege neben u.a. PI3K/AKT, p38 MAPK und RAC/RHO auch über die ROS (Jiang

et al., 2003; Li et al., 2004). Die Aktivierung von Rac1 ist begleitet von seiner Translokation vom Zytosol zur Zellmembran, wo es einen Teil seiner Wirkungen als essenzielle Untereinheit der ROS produzierenden NOX ausübt (Bokoch et Diebold, 2002). Die NOX ist ein aus mehreren Komponenten bestehender multienzymatischer Komplex, der als Antwort auf Wachstumsfaktoren und Zytokinen (bspw. TGF- $\beta$ ) intrazellulär ROS produziert. NOX-abgeleitete ROS scheint besonders wichtig für die Aktivierung von p38 und ERK MAPKs zu sein (Rhyu et., 2005), ein Vorgang, der begleitet ist von der Inaktivierung zahlreicher Protein-Phosphatasen (PP1, PP2A, MKP-1, PTP). ROS fungiert hierbei als sog. *signal messenger*, der in der Lage ist, die Protein-Tyrosin-Phosphatase (*protein tyrosine phosphates*; PTP), die für die Tumorzellinvasion entscheidend ist, zu oxidieren (Hiraga et al., 2013; Korbecki et al., 2013; Ungefroren et al., 2018). ROS führt zu genomischer Instabilität in Tumorzellen und ist beteiligt an der EMT, Zellmigration und Progression von Karzinomen, u.a. in Pankreaskarzinomen (Du et al., 2011; Yu et Kim, 2014).

Eine Publikation der Arbeitsgruppe von Prof. Ungefroren hat den Einfluss von ROS auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigration genauer untersucht: Es konnte gezeigt werden, dass die Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und COLO 357 NOX4, eine Untereinheit der NADPH-Oxidase stark exprimieren und dass nach Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$  die Expression von NOX4 und demzufolge die ROS-Produktion gesteigert wurde. Ferner führte die pharmakologische Inhibition, sowie die Ausschaltung von NOX4 mittels RNA-Interferenz zur Abschwächung der TGF- $\beta$ -induzierten Zellmigration. Die pharmakologische Inhibition von Rac1 und die Depletion von Rac1 via RNA-Interferenz führten ebenfalls zur Abnahme der TGF- $\beta$ -induzierten Zellmigration, kohärent zu den bereits bekannten Daten (Ungefroren et al., 2011). Dementsprechend wirken Rac1 und ROS hier synergistisch. Außerdem wurde die Beteiligung der EMT- und migrationsfördernder p38 MAPK, die durch TGF- $\beta$ , aber auch durch Rac1 und ROS aktiviert wird, näher untersucht: Eine erniedrigte Aktivierung von p38 MAPK wurde durch die Inhibition von NOX4 und Rac1 ausgelöst. Das daraus resultierende abgeschwächte Migrationsverhalten der Zellen konnte durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Mutante von p38 MAPK revidiert werden. Aus diesen Abhängigkeiten wurde gefolgert, dass die TGF- $\beta$ -induzierte Migration der Zellen durch eine Rac1-, NOX4-, ROS-, und p38 MAPK abhängige Signalkaskade vermittelt wird (Witte et al., 2017).

Zusammenfassend vermittelt Rac1 die onkogenen Effekte von Wachstumsfaktorrezeptoren, speziell aus der sog. ErbB-Gruppe, wie bspw. EGF-R und ist ein Effektorprotein von Ki-Ras. Im Wissen um die essentiellen Rollen von TGF- $\beta$  und Rac1 hinsichtlich Tumorwachstum und der Beteiligung an diversen Stadien des Proliferations- und Migrationsprozesses von Tumoren, ist es nicht verwunderlich, dass Rac1 ebenfalls Signale von anderen Rezeptoren, v.a. diese von TGF- $\beta$ , die eine Serin-/Threoninkinaseaktivität besitzen, übermittelt. Rac1 kann seine spezifischen Funktionen entweder TGF- $\beta$ -abhängig (wenn Rac1 als Signalvermittler der Smad-unabhängigen TGF- $\beta$ -Signalkaskade wirkt) oder TGF- $\beta$ -unabhängig von diesem Wachstumsfaktor erfüllen (Melzer et al., 2017; Ungefroren et al., 2018). In Vorarbeiten meines Doktorvaters Prof. Ungefroren konnte deutlich gezeigt werden, dass Rac1 durch TGF- $\beta$  aktiviert werden kann und darüber hinaus in nachfolgende intrazelluläre Signaltransduktionsketten involviert ist. Es wurde demonstriert, dass Rac1 durch TGF- $\beta$  binnen Minuten aktiviert wird und seinerseits zusätzlich die TGF- $\beta$  liganden-induzierte C-terminale Phosphorylierung von p38 MAPK in PDAC-Zellen fördert. Die Inhibition der Rho-GTPase Rac1 mittels dominant negativer Inhibition bewirkt ferner die Aufhebung der Effekte sowohl der TGF-vermittelten p38 MAPK-Aktivierung als auch der Expression des kleinen leucinreichen Proteoglykans *Biglykan* (BGN). Beide spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Adhäsion und Migration. Diese außer Kraft gesetzten Wirkungen affizierten jedoch nicht die TGF- $\beta$ -induzierte Smad3-Phosphorylierung oder die Transkriptionsinduktion von GADD45 $\beta$ , der entscheidend für die TGF- $\beta$ -induzierte Regulation von BGN ist. Somit wirkt Rac1 verstärkend auf die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion durch eine Aktivierung bzw. Phosphorylierung der p38 MAPK (Groth et al, 2005).

Biglykan ist funktionell beteiligt an dem Aufbau der Extrazellulärmatrix, der zellulären Adhäsion und Migration, und der Regulation von Wachstumsfaktoren, wie bspw. die TGF- $\beta$ -Aktivität (Wadhwa et al., 2004). BGN ist deutlich hochreguliert in fibrotischen Erkrankungen wie der diabetischen Nephropathie (Schaefer et al., 2000) und im Stroma des Pankreaskarzinoms (Weber et al, 2001), übereinstimmend mit der zentralen Rolle von TGF- $\beta$  in der Pathogenese dieser Erkrankungen. Die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$  ist komplex und abhängig von der Aktivierung von Smad-Signalwegen (Chen et al., 2002), p38 MAPK (Ungefroren et al., 2003) und intermittierend von der Transkriptionsinduktion von GADD45 $\beta$  (Ungefroren et al., 2005).

In einer weiteren Vorarbeit von Prof. Ungefroren konnte gezeigt werden, dass Rac1 die TGF- $\beta$ -induzierten Effekte in PDAC-Zellen fördert, indem es durch selektive Smad2-Aktivierung proliferationsfördernd wirkt und gleichzeitig die TGF- $\beta$ -abhängige Migration der Zellen verstärkt (Ungefroren et al., 2011). Die Inhibition der Rac1-Expression durch RNA-Interferenz bzw. der Rac1-Aktivität (mittels einer ektopen dominant negativen Mutante von Rac1), sowie die pharmakologische Inhibition von Rac1 (via NSC23766) imitierten die Effekte der Smad2-Depletion der TGF-induzierten Wachstumshemmung und Migrationserhöhung. Ferner führte die Smad2-Hemmung einerseits zur Aufhebung der TGF- $\beta$ -induzierten Smad2-spezifischen C-terminalen Phosphorylierung und transkriptionellen Aktivität, andererseits aber zur Erhöhung der TGF- $\beta$ -vermittelten p21<sup>WAF1</sup> Expression, einem Zellzyklusinhibitor. Somit konnte eine funktionelle Verbindung der beiden Proteine (Rac1 und Smad2) bewiesen werden. Ebenfalls eine neue Erkenntnis dieser Studie war die gegenseitige Verstärkung der Effekte: so führte der Gen-Knockdown von Smad2 oder die Inhibition von Rac1 (ohne direkte Modulation von Smad3) zu einer Steigerung der Wachstumsinhibition, der Smad3-spezifischer transkriptioneller Aktivität und der C-terminalen Phosphorylierung von Smad3. Auf der anderen Seite bewirkte der Gen-Knockdown von Smad3 (ohne direkte Modulation von Smad2) eine Erhöhung der Smad2-spezifischen Zellmigration und der TGF- $\beta$ -vermittelten Smad2-Phosphorylierung. Dies deutet zum einen auf einen funktionellen Antagonismus zwischen den beiden R-Smads hin und zum anderen, dass das Verhältnis von Smad3 zu Smad2 über die endgültigen Auswirkungen der zellulären TGF- $\beta$ -Antwort bestimmt, speziell hinsichtlich der TGF- $\beta$ -induzierten Wachstumsinhibition in PANC-1-Zellen (Kim et al., 2005). Diese Studie zeigt, dass Rac1 eine proonkogene Wirkung hat, indem es die TGF- $\beta$ -Signalwirkung auf der R-Smad-Ebene von einem tumorunterdrückenden zu einem tumorfördernden Resultat ändert. Diesen Effekt erzielt Rac1 durch eine Verstärkung der TGF- $\beta$ -induzierten Smad2-Aktivierung, der EMT und der Zellmigration- und invasion (Ungefroren et al., 2011).

#### **1.4.2 Rac1b**

##### *Generelle Struktur und biochemische Eigenschaften*

Die Rho-GTPase Rac1b ist eine alternativ gespleißte Isoform von Rac1. Diese Spleißvariante wurde vorrangig in Haut- und Epithelgewebe des Darmtraktes

(Matos et al., 2000) sowie im Brustgewebe entdeckt (Schnelzer et al., 2000). Das Exon 3b von Rac1 umfasst 57 zusätzliche Nukleotide. Dies führt zu einer sog. „*in-frame Insertion*“ von 19 neuen Aminosäuren zwischen dem 75. und 76. Codon von Rac1 unmittelbar hinter der sog. *switch-II-region*, einschließlich zweier möglicher Threoninphosphorylierungsstellen für Kaseinkinase II und Proteinkinase C (Jordan et al., 1999; Schnelzer et al., 2000). Dies beschert Rac1b andere biochemische Eigenschaften als Rac1: So führt diese zusätzliche Proteinsequenz zu einem beschleunigten Guanin-Nukleotidaustausch-Faktor (GEF)-unabhängigen GDP/GTP-Austausch und zu einer beeinträchtigten GTP-Hydrolyse. Letztere wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) nur partiell wiederhergestellt (Haeusler et al., 2006). Rac1b liegt dadurch bevorzugt in einer GTP-gebundenen aktiven Form vor und ist leichter aktivierbar als Rac1 (Fiegen et al., 2004; Singh et al., 2004). Daraus ergeben sich unterschiedliche biochemische Eigenschaften, sowie variable Interaktionen und Beeinflussungen von Signalwegen im Vergleich zu Rac1 (Melzer et al., 2019).

Die Regulierung der Aktivität beider GTPasen Rac1 und Rac1b ist maßgeblich abhängig von GAPs. Hier liegt der Hauptunterschied jedoch in der Unfähigkeit von Rac1b sog. Rho-GDP-Dissoziationshemmer (*Rho-GDP-dissociation-inhibitor*, Rho-GDI) zu binden. Infolgedessen bleibt der größte Teil von Rac1b an die Plasmamembran gebunden und wird nicht durch die Rho-GDI im Zytoplasma aufgenommen. Die starke Assoziation von Rac1b mit der Plasmamembran, schafft eine gute Voraussetzung für die *Rac1*-Ubiquitinierung, die durch einen Jun-N-terminale Kinase (JNK)-aktivierten Prozess bewirkt wird. Die mangelhafte Ubiquitinierung von Rac1b erklärt sich folglich aus seiner Unfähigkeit JNK zu aktivieren (Matos et al., 2003; Singh et al., 2004), kann jedoch durch eine Koexprimierung von RAC1-Q61, eine konstitutiv aktive Rac1-Mutante, stimuliert werden. Dies führt zur Annahme einer positiven Regulierung der Rac1b-Ubiquitinierung durch Rac1 nachgeschaltete Signaleffekte (Visvikis et al., 2008). Rac1b kann weder mit *p21-activated kinase* (PAK) interagieren, noch kann es die Bildung von Lamellopodien, für die Zelllokomotion wichtige Zellfortsätze, induzieren (Matos et al., 2003).

#### *Biologische Funktionen bzgl. zellulärer Transformation und Tumorprogression*

Rac1b fördert die zelluläre Transformation u.a. durch eine Stimulation des dichte- und verankerungsabhängigen Wachstums in *NIH3T3*-Mausfibroblasten (Singh et

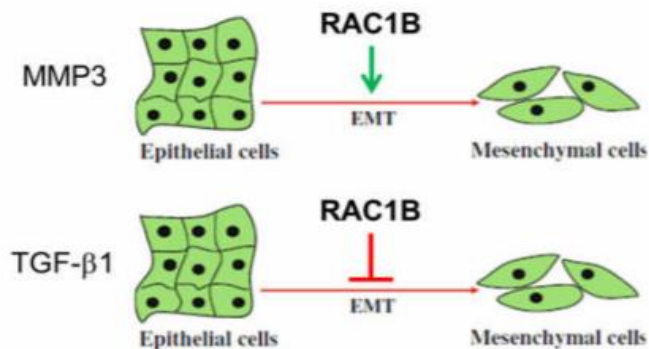
al., 2004). Die Überexpression von Rac1b kann ferner durch Interaktionen mit tumorassoziierten Signalwegen zur erleichterten Tumorprogression führen: so bewirkt eine erhöhte Rac1b-Expression in diversen Neoplasiestadien kolorektaler Karzinomzellen (CRC) eine Stimulation des *Wnt-Signalweges* und der Induktion von *Wnt-Zielgenen*, die spezifisch beteiligt sind, an der Reduktion adhäsiver Eigenschaften der CRCs (Ezufali et al., 2007). Rac1b ist überexprimiert in den Stadien 1 und 2 des menschlichen Lungenadenokarzinoms (Stallings-Mann et al., 2012). In einem Maus-Modell dieser Tumorentität, bei dem Rac1b konstitutiv aktiviert wurde, konnte ein synergetischer Effekt von Rac1b mit einem onkogenen Allel von K-ras detektiert werden. Dies führte zu einer gesteigerten Zellproliferation und beschleunigtem Tumorwachstum. Eine solitäre Rac1b-Expression war unzureichend für die Initiierung der Tumorbildung (Zhou et al., 2013). Es wurde festgestellt, dass eine Matrix-Metalloproteinase (MMP)-induzierte Rac1b-Erhöhung durch eine Umgehung des Onkogen-induzierten-Alterungsprozesses (oncogen induced senescence; OIS) in die Bildung von Lungenadenokarzinomen in Mäusen begünstigt. (Stallings-Mann et al., 2012). Durch eine Rac1b-induzierte Inhibition des *B-RAF-V600E*-Signalweges, vermögen auch CRC-Zellen den Prozess der OIS zu umgehen (Henriques et al., 2015). Beides deutet darauf hin, dass Rac1b durch die Umgehung der OIS die Tumorgenese in diesen Neoplasien verstärkt.

MMP gehören zur Gruppe der Proteinase und sind an Umbauprozessen der Extrazellulärmatrix während der Embryonalentwicklung, Wachstums- und Wundheilungsprozessen, der Angiogenese, aber auch Tumorinvasion und Metastasierung beteiligt (Galis et Khatri, 2002). MMP3 induziert die Rac1b-Erhöhung, dadurch kommt es zur Steigerung der zellulären ROS und Induktion der Snail -Expression. Diese Interaktionen fördern insgesamt den Prozess der EMT (Abbildung 2).

### *Epitheliale-mesenchymale Transition*

In Vorarbeiten von Prof. Ungefroren konnte deutlich gezeigt werden, dass Rac1b die TGF-vermittelte Aktivierung der Smad-unabhängigen MAP-Kinasen p38 und ERK, die zwei wichtige Komponenten der TGF- $\beta$ -vermittelten EMT darstellen, hemmt. Nach Rac1b-Knockdown konnte ferner die Expression der EMT-fördernder Transkriptionsfaktoren Slug und Snail gesteigert. Dagegen war die Expression von E-Cadherin vermindert. Diese Effekten wurden nach Inhibition von p38 MAPK

und ERK aufgehoben. Dies führt zu dem Schluss, dass Rac1b die TGF- $\beta$ -vermittelte EMT unterdrückt, indem es die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und ERK inhibiert (Witte et al., 2017). Im Prozess der EMT wirkt Rac1b somit dichotom, d.h. in Abhängigkeit vom Gewebe- und dem Effektormolekül (MMP3/TGF- $\beta$ ) entweder als Induktor oder Inhibitor (Abbildung 2).



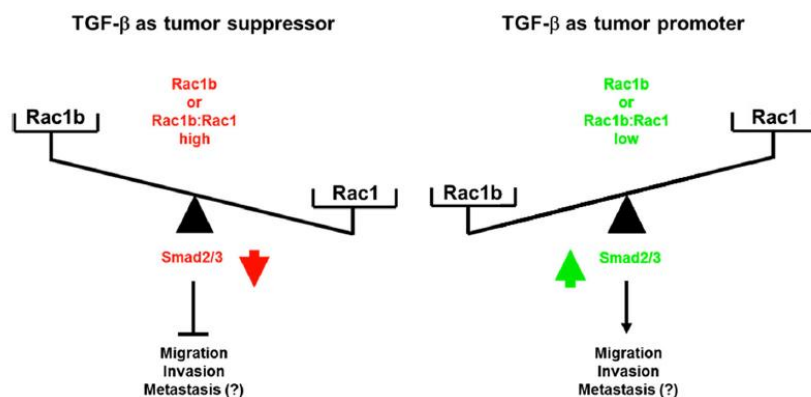
**Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Rollen von Rac1b im Prozess der EMT.** Je nach dem welches Signalmolekül beteiligt ist, wirkt Rac1b als Induktor oder Inhibitor. MMP3 fördert die EMT bspw. in Mammakarzinomzellen von Mäusen (s.o.). Die TGF- $\beta$ -induzierte EMT in PDAC-Zellen wird durch Beteiligung von Rac1b gehemmt (Witte et al., 2017). Die Grafik wurde modifiziert aus Melzer et al., 2019.

### *PDAC-Zellen und funktioneller Antagonismus von Rac1 und Rac1b*

Durch die Arbeiten von Prof. Ungefroren konnte gezeigt werden, dass Rac1 die TGF- $\beta$ -induzierte Wachstumshemmung antagonisiert und die Zellmigration von PDAC-Zellen fördert. (Ungefroren et al., 2011). Es wurde jedoch konstatiert, dass die Rac1-Depletion via RNA-Interferenz ebenfalls mit einer Rac1b-Erniedrigung der mRNA-Transkripte einherging, die Effekte sich folglich nicht allein auf Rac1 zurückführen ließen. Um zwischen den Rac1/Rac1b-Effekten zu unterscheiden, wurde in einer 2014 veröffentlichten Publikation eine spezifische, gegen Rac1b-mRNA gerichtete small interfering RNA (siRNA) verwendet. Zunächst ließ sich in 4 von 21 Patienten in duktalem Epithelzellen von PDAC (Stadium III) immunhistochemisch die Expression von Rac1b nachweisen. Die Rac1b-Expression in duktalem Gewebe von chronischer Pankreatitis war höher als in PDAC-Zellen. Rac1b ist in diesen

schwächer exprimiert, als in gesundem Pankreasgangepithel und stärkere Expression von Rac1b korreliert mit einer verminderten Metastasierung und gesteigerter Überlebenszeit. Vor dem Hintergrund der durch in vitro Daten gezeigten hemmenden Effekte von Rac1b auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Signalwirkung (Ungefroren et al., 2014; Witte et al., 2017) kann postuliert werden, dass geringe Rac1b-Expression/Aktivität bzw. eine geringe Rac1b:Rac1-Relation (wie sie in PANC-1-Zellen vorliegt) zu einem erhöhten Potenzial von Smad3-abhängiger bzw. unabhängiger Migration, Invasion und Metastasenbildung führt. Dieses Szenario scheint vor allem in späteren Stadien der Tumorprogression sowie in TGF- $\beta$ -reicher Tumormikroumgebung aufzutreten. Beides ist charakteristisch für PDAC-Zellen, hier überwiegt die tumorhemmende ggüb. der tumorfördernden Umgebung von Rac1b.

Der funktionelle Antagonismus von Rac1b und Rac1 innerhalb der TGF- $\beta$ -Signal-kaskade in Verbindung mit den relativen Aktivitätsänderungen der beiden G-Proteine während der Tumorprogression, stellt einen möglichen Mechanismus zur Erklärung des „TGF- $\beta$ -Paradoxon“ (Abbildung 3) dar.



**Abbildung 3: Darstellung der dualen Rolle von TGF- $\beta$  in der Tumorprogression in Abhängigkeit von der Rac1b- und Rac1-Expression.** Tumore im Frühstadium mit erhöhter Rac1b-Expression oder einer gesteigerten Rac1b:Rac1-Relation sind aufgrund der funktionellen Hemmung von Rac1 (linke Seite) weniger invasiv und metastasierend. Tumore im fortgeschrittenen Stadium mit geringer Rac1b-Expression bzw. niedrigem Rac1b:Rac1-Verhältnis wachsen invasiver und metastasieren stärker, möglicherweise durch ein Übergewicht der Rac1-tumorfördernden Wirkung (rechte Seite). Somit fungiert TGF- $\beta$  in Abhängigkeit von der Krebsprogredienz entweder als Tumorsuppressor (linkes Bild) oder Tumorpromotor (rechtes Bild), indem es die Zellprogression durch Migration, Invasion und Metastasierung über den Smad-Signalweg hemmt bzw. verstärkt. Dieses Phänomen wird auch "TGF- $\beta$ -Paradoxon" genannt.

Ferner wurde deutlich herausgearbeitet, dass Rac1b die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration hemmt, indem es die Aktivierung von Smad3 und den MAP-Kinasen p38 und ERK verhindert (Ungefroren et al., 2014; Melzer et al., 2017; Witte et al., 2017). Rac1 und Rac1b wirken also antagonistisch auf die TGF- $\beta$ -abhängige Zellmigration. Darüber hinaus führte die Rac1b-Depletion zu einer Verstärkung der TGF- $\beta$ -vermittelten Wachstumshemmung. Die Zellen zeigten ferner eine geringere Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Thymidin, dies deutet auf eine langsamere DNA-Replikation hin. Die Expression des TGF- $\beta$ -induzierten Zellzyklusinhibitor p21<sup>WAF21</sup> war hier verstärkt.

Rac1b reguliert die TGF- $\beta$ -induzierte EMT, EMT-Markerproteine und diverse Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweges negativ, während Inhibitoren dieses Signalweges positiv reguliert werden. Rac1b wirkt dementsprechend als generalisierter Antagonist von Rac1 (Witte et al., 2017).

Der funktionelle Antagonismus der zellulären TGF- $\beta$ -Effekte von Rac1b ggüb. Rac1 wurde bereits 2010 in einer Publikation beschrieben: In menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms konnte nach ektopter Rac1b-Expression festgestellt werden, dass Rac1b die PDGF- und EGF-induzierte Rac1-Aktivierung und die membrangebundene Rac1-Menge reduziert, was eine erhöhte *Rho*-Aktivität bewirkte (Nimnual et al., 2010). Der Antagonismus stört ferner die Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskelettes, das zu tumorbedingten Veränderungen der Zellmorphologie und Motilität führt.

## 1.5 Hypothese und Zielsetzung der Promotion

Das G-Protein Rac1b wurde von unserer Arbeitsgruppe als potenter Inhibitor der TGF- $\beta$ -Signalkaskade und der TGF- $\beta$ -induzierten Zellmigration (*Chemokinese*) in PDAC-abgeleiteten Zellen identifiziert (Ungefroren et al., 2014; Witte et al., 2017). Dieselbe hemmende Wirkung konnte auch in Mamma-Karzinomzellen festgestellt werden (Melzer et. al., 2017).

In unseren veröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass die Rac1b-induzierte Suppression der Zellmigration eine Erniedrigung der TGF- $\beta$ -induzierten Phosphorylierung von Smad3 (Ungefroren et al., 2014), p38 MAPK und ERK 1/2 MAPK (Witte et al., 2017) impliziert. Diese genannten Proteine sind allesamt entscheidend für die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration des Pankreaskarzinoms.

Diese Promotion soll den genaueren molekularen Wirkmechanismus der inhibitorischen Wirkung von Rac1b auf die TGF-vermittelte Signalwirkung untersuchen. Die Vielzahl der durch Rac1b gehemmten TGF-abhängigen Wirkungen lässt zu dem Schluss kommen, dass Rac1b bereits an einem sehr proximalen Punkt der TGF- $\beta$ -Signalkaskade angreift. Der membranassoziierte T $\beta$ RI (im Folgenden wird kontinuierlich das Synonym *ALK5* verwendet) spielt eine Schlüsselrolle bei der initialen Aktivierung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade. Wir postulieren, dass Rac1b möglicherweise die Expression und/oder die Kinaseaktivität von ALK5 hemmt. Somit könnte Rac1b durch Einflussnahme auf die Menge bzw. Expression von ALK5 die TGF- $\beta$ -Sensitivität der Zellen an einem strategisch wichtigen Punkt kontrollieren. Möglicherweise kommt es durch Rac1b zu einer Negativregulation der ALK5-Menge und/oder seiner Kinaseaktivitäten, womit insgesamt die nachfolgende TGF- $\beta$ -abhängige Signalkaskade hemmend beeinflusst werden würde.

Dazu soll in experimentellen Ansätzen die funktionelle Signifikanz der Rac1b-vermittelten Negativregulation von ALK5 im Kontext der TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellmigration untersucht werden. Hierzu verwenden wir die aus dem PDAC-abgeleitete Zelllinie *PANC-1*. Diese Zelllinie exprimiert Rac1b und ist TGF- $\beta$ -sensitiv. Wir möchten zu diesem Zweck,

1. die Negativregulation der ALK5-Expression auf Proteinebene durch Rac1b näher untersuchen. Es wird eine spezifisch gegen Rac1b gerichtete siRNA (siRac1b) verwendet. Ferner werden die Zellen unstimuliert gelassen oder es erfolgt die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1, um zu überprüfen, ob die Regulation TGF- $\beta$ 1-abhängig ist. Nach

Rac1b-Silencing erwarten wir ein stärkeres Signal für ALK5. ALK5 wird in den Zelllysaten im Western Blot nachgewiesen und anschließend mittels Densitometrie quantifiziert.

2. bei potenzieller Negativregulation von ALK5 durch Rac1b auf Proteinebene diese auf mRNA-Ebene verifizieren. Wir postulieren, dass sich die Erhöhung der ALK5-Menge nach Rac1b-Silencing sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene vollzieht. Die Quantifizierung der ALK5-mRNA-Menge in Kontrollzellen, nach Rac1b-Silencing und mit unterschiedlicher Dauer der TGF- $\beta$ 1-Stimulation, erfolgt mittels quantitativer realtime RT-PCR (qPCR).

3. überprüfen, ob die potenzielle durch Rac1b-Depletion evozierte Erhöhung von ALK5 tatsächlich der Grund für die verstärkte Migration der Tumorzellen ist. Hierzu werden Migrationsassays durchgeführt. Es werden PANC-1-Zellen, die eine dominant-negative Mutante von ALK5 (K232R, Inaktivierung nur der Serin/Threoninkinaseaktivität) stabil retroviral exprimieren oder Wildtyp-Zellen verwendet und jeweils mit Rac1b transfiziert. In einem parallelen Ansatz werden Wildtyp-Zellen mit siRac1b *und* siALK5 transfiziert. Die Migrationsassays werden in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 48 Stunden später den Migrationsassays zugeführt. Etwaige Unterschiede der Effekte von ALK5-K232R- und ALK5-siRNA-transfizierten Zellen hinsichtlich des Migrationsverhaltens lassen möglicherweise Rückschlüsse auf die an der Migrations (-kontrolle) beteiligten unterschiedlichen Kinasedomänen zu (Serin-/Threonin- und/oder Thyrosinkinaseaktivität).

4. untersuchen, ob Rac1b seine inhibitorischen Effekte auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade auch durch andere Signalmoleküle bzw. Effektoren bewirkt. Davon ausgehend, dass ALK5 durch Rac1b negativ reguliert wird, postulieren wir, dass dies entweder über ein transkriptionelles Gen-Silencing oder die posttranskriptionelle Regulation durch Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Signalweges geschieht. *Smad7* fungiert als zentraler Regulator der TGF- $\beta$ -Signalkaskade und hemmt diesen Signalweg direkt durch Bindung an ALK5 und Blockierung der Smad2/3-Phosphorylierung und indirekt durch eine Verstärkung der Ubiquitin-vermittelten Degradierung von ALK5 (Tang et al., 2019). Ausgehend von einer verlängerten Aktivierung von Smad3 und p38 MAPK und einer verstärkten Chemokinese in Rac1b-defizienten Zellen nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation (Witte et al., 2017; Otterbein et al., 2019) wollen wir evaluieren, inwiefern SMAD7 an diesen Effekten beteiligt ist.

## 2. Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt sind alle Materialien mit Hersteller aufgelistet. Ferner finden sich für Chemikalien, Lösungen und Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Software die jeweiligen Verwendungszwecke. Für Primer und siRNA sind die jeweiligen Sequenzen angegeben. Abschließend sind Informationen zu den Zellen zu finden.

### 2.1 Antikörper

#### 2.1.1 Primärantikörper

*Ausgangskonzentration: 200µg/ml*

<u>Bezeichnung</u>	<u>Wirt</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
HSP90	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Rac1b	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
SMAD7	Maus	1µg/ml	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
TGF-β-Rezeptor (V22/ALK5)	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

#### 2.1.2 Sekundärantikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Anit-Kaninchen IgG, HRP-konjugierter Antikörper	1:2000	Cell Signaling Technology, Denvers, MS, USA
Anit-Maus IgG, HRP-konjugierter Antikörper	1:2000	Cell Signaling Technology, Denvers, MS, USA

## 2.2 Chemikalien, Lösungen, Enzyme

<u>Chemikalie</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
Albumin	Zellkultur	Servar Electro phorsis GmbH, Heidelberg
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	Westernblot	GE Health- care, Little Cahfont, UK
Chloroform	RNA-Präparation	Merck, Darm- stadt
Cryo-safe I Einfriermedium	Kryokonservierung	c.c.pro, Ober- dorla
DC™ Protein-Assay Kit	Western Blot	Bio-Rad, Mün- chen
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	Reverse Transkription	New England BioLabs, Frankfurt
DMEM		Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
-serumfrei	Transfektion	
-0,5% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Stimulation	
-1% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Migrationsassay	
-10% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Kultivierung	
Dulbecco's Phoshatgepufferte lösung, (DPBS)	Zellkultur	Gibco/Life Salz- Technologies Carlsbad, CA, USA

Ethanol (80%)	RNA-Präparation	Apotheke des, UKSH, Campus Lübeck
Fötales Kälberserum (FKS)	Zellkultur	Capricorn, Ebsdorfergrund
Glycin	Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glykogen	RNA-Präparation	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol	RNA-Präparation	Merck, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMAX®	Transfektion	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Milchpulver	Western Blot	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Maxima™ SYBR Green/Fluorescein Master Mix	qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol	Western Blot	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
QIAGEN-Plasmid-Midi-Kit	Bakterientransformation	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Penicillin-Streptomycin-Glutamine, (100x)	Zellkultur	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA, USA
PCR-Mastermix	reverse Transkription	
-First Strand Buffer (5x)		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-DTT, 0,1 M		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-M-MLV Transkriptase 200U/μl		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-RNase Inhibitor 40000U/ml		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-dNTPs, 4mM		General Electric Company, Bos- ton, MA, USA
Peq-Gold RNA-Pure™	Zellyse	Peqlab, Erlan- gen
RNase-freies Wasser	diverse Verwendungen	Thermo Fisher Scientific Wal- tham, MA, USA
Roti-Free Stripping Buffer	Stripping	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30 %-Acryl- amid-Bisacrylamid-Stammlösung)	Stripping	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe

RPMI 1640		Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
-serumfrei	Transfektion	
-0,5% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Stimulation	
-1% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Migrationsassay	
-10% FKS, 1% NaPy, 1%PSG	Kultivierung	
Reducin Agent (DTT), 1,25 M (30x),	Gelelektrophorese	New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
Salzsäure (HCl)	pH-Wert-Einstellung	Merck, Darm- stadt
SDS Blue Loading Buffer, (3x)	Gelelektrophorese	New England BioLabs Inc., Frankfurt
Spektra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA, USA
TEMED	Gelelektrophorese	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TGF-β1 (5ng/ml)	Stimulation	ReliaTech GmbH, Wolfenbüttel
Trizma® base	diverse Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau 0,4%	Zellzählung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Western-Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.3 Geräte

Name	<u>Hersteller</u>
Absorptions-Microplate Reader SpectroStar nano	BMGLabtech, Ortenberg
Autoklav Systec VX65	Systec Lab, Linden
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank HERA cell® 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chemielumineszenz-Detektor ChemiDoc™ Imaging System	Bio-Rad, München
CIM plates-16	OLS, Bremen
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Magnetrührer Rct basic IKAMAG	IKA Werke, Staufen im Breisgau
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Multipette Eppendorf plus	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH+Co. KG, Wertheim
PCR-Cycler PCR Express Thermal-Cycler	Thermo Hybaid, Ashford, UK
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Neckartenzlingen
ph-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg

Plattformschüttler Duomax 1030 (wippend)	Heidolph Instruments, Schwabach
Plattformschüttler Polymax 1040 (taumelnd)	Heidolph Instruments, Schwabach
Plattformschüttler Rotamax 120 (rotierend)	Heidolph Instruments, Schwabach
Präzisionswaage PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen
qRT-PCR-Cycler Quantstudio 5™ Realtime PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sicherheitswerkbank MSC Advantage™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Spannungsgerät POWER PAC300	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Stickstofftank Statebourne biorack 3000	Statebourne Cryogenics, Washington, UK
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen, Wangen
Ultratiefkühlschrank HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex MS2 Minishaker	IKA Werke, Staufen im Breisgau
Wasserbad LS 200	Grant Instruments, Cambridge, UK
Westernblot Wet-Blot System	Bio-Rad, München
Real-Time-Cell-Analyzer Dual Purpose xCELLigence®	ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau

- Biofuge A
- Biofuge fresco
- Multifuge 3 S-R

## 2.4 Primersequenzen

<u>Ziel m-RNA</u>	<u>Oligonukleotid-Sequenz</u>	<u>Hersteller</u>
ALK5 forward	GCGACGGCGTTACAGTGTTTCTGC	metabion international AG
ALK5 reverse	ATGGTGAATGACAGTGCGGTTGTGG	Planegg, Deutschland
Rac1b forward	GGGGCAAAGACAAGCCGAT	Thermo Fisher Scientific,
Rac1b reverse	CTCGGATCGCTTCGTCAAAC	Waltham, MA, USA
TBP forward	GCTGGCCCATAGTGATCTTT	metabion international AG,
TBP reverse	CTTCACACGCCAAGAAACAG	Planegg, Deutschland
SMAD7 forward	GGAAGATCAACCCCGAGCTG	Thermo Fisher Scientific,
SMAD7 reverse	TTGGGAATCTGAAAGCCCC	Waltham, MA, USA

## 2.5 Puffer und Lösungen (inklusive Sammel- und Trenngel)

<u>Puffer/Lösungen</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Antikörper-Puffer	monoklonal: 5% Magermilch in TBS-T (2,5g/50ml) polyklonal: 5% BSA in TBS-T (2,5g/50ml)
Blockpuffer	5% Magermilch in TBS-T, 1x

Elektrophoresepuffer, 1x	1:10 Verdünnung Elektrophorese Puffer, 10x mit VE H <sub>2</sub> O
Elektrophoresepuffer, 10x	250mM Trizma <sup>®</sup> base 192 mM Glycin 35 mM SDS
RIPA-Puffer	NP-40 1% SDS 0,1% Sodium Desoxycholat 0,5% DPBS 198ml Proteaseinhibitorcocktail "Complete"
Sammelgel (Gelelektrophorese)	Spacer-Puffer 1,25ml Aqua dest. 2,43ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 0,82ml APS (10%) 22,5µl TEMED 7,5µl
Spacer-Puffer	0,5M Trizma <sup>®</sup> base 0,4% SDS pH 6,76 (eingestellt mit HCl 5N)
TBS	20mM Trizma <sup>®</sup> base 137mM NaCl pH 7,6 (mit HCl 5N eingestellt)
TBS-T	1xTBS 0,1% Tween
TE	10mM Trizma <sup>®</sup> base 1mM EDTA
Transferpuffer	25mM Trizma <sup>®</sup> base 192mM Glycin 20% MeOH pH 8,6 (mit HCl 5N eingestellt)

Trenngel (Gelelektrophorese)	Trenngel-Puffer 3ml Aqua dest. 5ml Rotiphorese® Gel 30 3,97ml APS (10%) 80µl TEMED 8µl
Trenngel-Puffer	1,5mM Trizma® base 0,4% SDS pH 8,8 mit HCl 5N eingestellt)

## 2.6 Small interfering RNAs (siRNAs)

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Hersteller</u>
siCo	sense: ACGUGGCGGAAAUAUAAAtt antisense: UUAUUUUUCCGCCACGUtt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
siRac1b	sense: ACGUACGGUAAGGAUAUAAtt antisense: UUAUAUCCUUACCGUACGUtt	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
siALK5	sense: GCAUCUCACUCAUGUUGAUGGUCUA antisense: GCCAAAUGAAGAGGACCCUUCAUUA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.7 Software

<u>Name</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
BMG LABTECH MARS Data Analysis Software	Protein Assay	BMG LAB-TECH GmbH, Ortenberg, Deutschland

QuantStudio™ Desktop Software Design&Analysis	qRT-PCR	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, MA, USA
Image Lab 5.2.1	Western Blot	Bio-Rad Labor- atories Inc, Her- cules, CA, USA
RTCA 2.1.0 Software	Zellmigrationsassay	ACEA Biosci- ences, San Diego, CA, USA

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Hersteller</u>
CIM-Plate ® 16 RTCA	Migrationsassay	ACEA Biosciences. San Diego, CA, USA
Einmalpipetten (5,10,15ml)	Zellkultur	Greiner bio- one, Krems- münster, Österreich
Eppendorfgefäße „Safe-Seal“ (0,5, 1,5, 2,0ml)	diverse Verwendungen	Eppendorf AG, Hamburg
-Normal (0,5, 1,5, 2,0)	diverse Verwendungen	
-Braun (1,5ml)	qRT-PCR	
Filterpapier	Westernblot	Whatman plc, Maidstone, UK
Filterspitzen	Transfektion, RNA	Sarstedt AG & Co. KG, Nürm- brecht

	RNA-Präparation	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Kryokonservierungsröhrchen	Kryokonservierung	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Küvetten	RNA-Konzentrationsbestimmung	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Nunclon Delta Surface		Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
-6-Wellplatte	Zellkultur	
-12-Wellplatte	Zellkultur	
-96-Wellplatte	Zellkultur qRT-PCR	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
	Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Parafilm „M“	Einfrieren von Wellplatten	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten	Zellkultur	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim

PCR-Folie (adhäsiv)	qRT-PCR	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Pippenspitzen	diverse Verwendungen	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Polysterolröhrchen	Transfektion	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
PVDF-Membran (Porengröße 0,45µm)	Westernblot	Merck, Darmstadt
sterile Handschuhe peha-soft®	steriles Arbeiten	Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Brenz
Zellkulturflaschen T25/T75 (Wachstumsflächen: 25cm <sup>2</sup> /75cm <sup>2</sup> )	Kultivierung	Sarstedt AG & Co. KG, Nürmbrecht
Zentrifugieröhrchen (15,50ml)	diverse Verwendungen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

## 2.9 Zelllinie

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Medium</u>	<u>Firma/Bezug</u>
PANC-1	Pankreasadenokarzinom-Zelllinie	RPMI 1640 +10% FKS +1% PSG +1% Na-P	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

### 2.9.1 Zellen

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden die PDAC-Zelllinie *PANC-1*, erworben von der American Type Culture Collection (ATCC®CRL-1469), verwendet. *PANC-1* wurde aus einem duktalem Adenokarzinom des Pankreaskopfes (Primärtumor) eines 56-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen (Lieber et al., 1975). Die Verdopplungszeit in Kultur beträgt laut Herstellerangaben (American Type Culture Collection, 2017) 52 Stunden (h).

## 2.10 Zellkultur

Im Folgenden werden die korrekte Lagerung und die allgemeine Arbeitsweise für den adäquaten Umgang mit Zellkulturen bzw. den unterschiedlichen Zelllinien dargestellt. Sämtliche Tätigkeiten im Kontext der Zellbehandlung, wie bspw. Revitalisierung, Zellaussaat, Transfektion, Stimulation oder Splitting wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Um potenzielle Kontaminationen zu vermeiden, wurde in allen Arbeitsschritten mit Einmal-Latexhandschuhen gearbeitet, sowie vor und nach den Arbeiten die Sterilwerkbank mit 80%-igem Ethanol desinfiziert. Ferner wurden entweder steril verpackte Einmalartikel oder bei 120°C durch Wasserdampf autoklavierte, wiederverwendbare Geräte und Materialien gebraucht. Die befüllten Zellkulturflaschen- und platten befanden sich stets in einem Inkubator „HERA cell 150“, unter den Bedingungen von 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und 95% relativer Luftfeuchte.

### *Kryokonservierung*

Die Zellen, die in den jeweiligen Experimenten verwendet wurden, waren zur Langzeitlagerung bei -196°C in einem Stickstofftank kryokonserviert. Hierzu wurden als Behältnis eigens dafür vorgesehene Kryokonservierungsröhrchen namens „nunc Cryo Tube“ der Marke Nalge Nunc International (Rochester, NY, USA) benutzt, die

mit jeweils 1ml des Einfriermediums „Cryo-safe I“ (c.c.pro, Oberdorla) befüllt waren. Sowohl bei der Kryokonservierung als auch bei der Revitalisierung durch Auftauen wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (Statebourne Cryogenics, Washington, UK).

### *Revitalisierung von Zellen*

Zur Revitalisierung der Zellen, wurde die Zelllinien aus dem Stickstofftank entnommen, umgehend im Wasserbad bei 37,6°C aufgetaut und in einem Zentrifugierröhrchen (15ml) unter Zugabe von 3ml Medium, ebenfalls vorgewärmt im Wasserbad, in Suspension gebracht. Das für die jeweilige Zelllinie vorgeschriebene Medium (RPMI 1640) ist in der Zusammensetzung seiner Ingredienzien unter dem Abschnitt 2.9 „Zelllinie“ aufgeführt. Anschließend wurden die in Suspension befindlichen Zellen zentrifugiert (300xg bei 4°C für 6 Minuten (min) in einer Zentrifuge „Multifuge 3 S-R“, Heraeus, Hanau) und der Überstand wurde abgenommen. Danach wurde das Pellet mit dem jeweiligen supplementiertem 7ml Medium (10% fetales Kälberserum (FKS), 1% Natriumpyruvat (NaPy), 1% Pencillin-Streptomycin-Glutamin (PSG)) resuspendiert und in einem Gesamtvolumen von 20ml in eine Zellkulturflasche überführt.

### *Kultivierung*

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75cm<sup>2</sup> (und 25cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen mit supplementiertem Medium (10% (FKS), 1% NaPy, 1% PSG) im Brutschrank unter permanenter 5%CO<sup>2</sup>-Begasung. Die kultivierten Zellen, wurden jeden Tag hinsichtlich ihrer Dichte (Konfluenz) und ihres stetigen Wachstums lichtmikroskopisch kontrolliert. Es wurde spätestens nach drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt (20ml bei 75cm<sup>2</sup> und 10ml bei 25cm<sup>2</sup>). Dazu wurde das verbrauchte Medium mit Pasteurpipetten und Vakuumpumpe aus der Flasche abgesaugt und frisches Medium hinzugegeben. Sofern die Zellen einen Konfluenzgrad von 80% überschritten, wurden sie gesplittet (subkultiviert), d.h. in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt.

### *Splitten von Zellen*

Das Splitten dient der Zellzahlreduktion pro Kulturflasche, und erfolgte ab einem Konfluenzgrad von 80%. Alle hierzu benötigten Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad bei 37,6° erhitzt. Anschließend wurde das Kulturmedium mit einer

Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen mit 5ml *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) gewaschen, um es anschließend direkt abzusaugen. Durch Zugabe von 3ml Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und fünfminütiger Inkubation im Brutschrank wurden die als Monolayer wachsenden Zellen von der Wachstumsfläche gelöst. Trypsin-EDTA-Lösungen werden für das Passagieren von Monolayer-Kulturen eingesetzt, da sie u.a. interzelluläre Mukoproteine schädigen und so die Zelladhärenz aufheben (Thermo Fisher Scientific, o.J.). Sobald durch lichtmikroskopische Inspektion die Ablösung und Verteilung der Zellen gewährleistet war, wurden 10ml supplementiertes Medium hinzugefügt. Die Suspension wurde in ein 50ml Falconröhrchen überführt und es erfolgte bei 300xg und 4°C eine sechsminütige Zentrifugation. Nach Absaugen des flüssigen Überstandes und anschließender Resuspension des Zellpellets mit 3ml Medium, wurde die so erzeugte Zellsuspension im Verhältnis 1:2 bis 1:10 erneut in Zellkulturflaschen (T25/T75), unter Vorlage von 20ml supplementiertem Medium überführt. Der erläuterte Vorgang wurde zweimal innerhalb einer Woche pro Zellkulturflasche durchgeführt und eine Passagenzahl von 30 pro revitalisierte Zelllinie wurde nicht überschritten.

#### *Bestimmung der Zellzahl und Zellaussaat*

Zur Versuchsdurchführung mit den kultivierten Zellen wurde diese gezählt und in einer definierten Zellzahl in Wellplatten ausgesät, um dort mit weiteren Versuchsreagenzien behandelt zu werden. Wie beim Splitten der Zellen wurden diese aus der Kulturflasche abgelöst und das durch Zentrifugation erhaltene Zellpellet mit 3ml supplementiertem Medium resuspendiert. Zur exakten Bestimmung der Zellzahl in Volumina pro Well wurden 10 µl eines Aliquots einer Zellsuspension entnommen und mit 90µl einer 0,4%-igen Trypanblau – Lösung verdünnt (Verhältnis 1:10 bzw. 1:5 Verdünnung bei Migrationsassays). Bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen durch Resuspension mit der Stabpipette und sorgfältiges Schwenken gleichmäßig verteilen. Nach Einbringen von 10µl der Suspension in eine Neubauer – Zählkammer werden die vitalen, farblosen Zellen in den sich ergebenden vier Quadranten ausgezählt. Da Trypanblau zytotoxisch (Sigma-Aldrich, o.J.) ist, muss die Auswertung unmittelbar nach Zugabe desselben erfolgen. Zur Bestimmung der Zellzahl kam folgende Formel zum Einsatz:

$MW \times 10^4 \times V = \text{Zellzahl/ml}$  ( $MW = \text{Mittelwert vitaler Zellen in vier Quadranten}$ ,  
 $V = \text{Verdünnungsfaktor (1:10)}$ )

Anhand einer Tabelle für die korrekte Zellzahl pro Well in Korrelation zur verwendeten Zellkulturplatte und Zelllinie (Tabelle 1), wurde für die zu füllende Wellzahl eine Suspension aus Nährmedium und Zellen vorgelegt. Die mehrmalige Resuspension verhindert ein Absacken der Zellen im Falconröhrchen und beugt eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen im Well vor.

Wellanzahl	Zellzahl/Well für PANC-1	Nährmedium pro Well (RPMI)
96-Well	$2 \times 10^4 / 1,5 \times 10^4$	100µl
24-Well	$2 \times 10^5$	500 µl
12-Well	$1 \times 10^6 / 0,5 \times 10^6$	1ml
6-Well	$3 \times 10^5 / 4 \times 10^5 / 5 \times 10^5 / 1 \times 10^6$	2ml

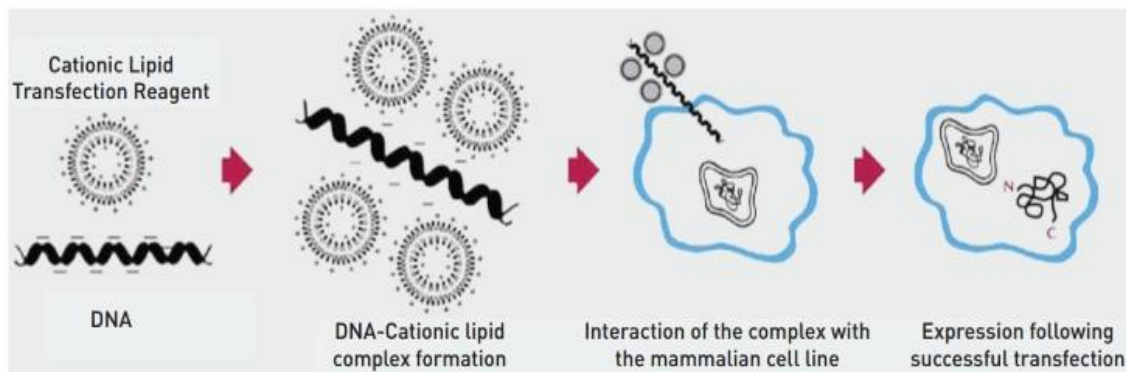
**Tabelle 1: Aussaatschema der Zellen.** Laborinterne Tabelle für mögliche Aussaatschemata und Nährmedien pro Well in Korrelation zur Wellanzahl pro Platte und unter Berücksichtigung der jeweiligen Zelllinie.

Es wurden 50.000 Zellen pro Well einer 24-Wellplatte ausgesät, sofern Proben zur RNA-Analyse bereitgestellt wurden (qRT-PCR). Für Proteinanalytik-Proben (Westernblot) wurde mit einer Zellzahl von 120.000 Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte ausgesät. Für die Migrationsassay-Versuche wurden 300.000 Zellen pro Well einer 6-Wellplatte ausgesät. Um die Zellen gleichmäßig in den Wells zu verteilen, wurde die Platte geschwenkt und umgehend in den Inkubator deponiert.

### *Transfektion mit siRNA*

Unter dem zellbiologischen Verfahren der Transfektion versteht man das Einbringen fremder Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) in eukaryotische Zellen. Für die Versuche dieser Arbeit wurden unter den gängigen Transfektionsverfahren die Methode der *Lipofektion* ausgewählt: Bei der Lipofektion wird die einzubringende Nukleinsäure von speziell hierfür designierten kationischen Lipiden umhüllt, die die Aufnahme in die Zelle erleichtern. Das verwendete Transfektionsreagenz

Lipofectamine RNA<sup>®</sup>MAX besitzt eine positiv geladene Kopfgruppe, die die Interaktion des positiv geladenen Lipids mit dem negativ geladenen Phosphatrest der Nukleinsäure bewirkt. Ebenso wird hierbei die DNA-Kondensation erleichtert. Im Folgenden ergibt sich eine unilamellare, lysosomale Struktur, die eine positive Oberfläche besitzt. Der Komplex aus anionischer Nukleinsäure und kationischen Lipiden erlaubt nun durch die positive Oberfläche dieses sogenannten Lyposoms, die Fusion mit der negativ geladenen Zellmembran. Der Liposom/Nukleinsäure-Komplex wird durch *Endozytose* in die Zelle aufgenommen. Innerhalb des Zytoplasmas erleichtern die kationischen Lipide die Umgehung des endosomalen Abbauweges und die Diffusion in den Nukleus zur Genexpression (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Transfektions-Mechanismus durch kationische Lipide.** Kationische Lipide (hier Lipofectamine RNAMAX<sup>®</sup>) bewirken Aufnahme von Nukleinsäure durch die Phospholipiddoppelschicht einer eukaryontischen Zelle (Abbildung aus Thermo Fisher Scientific o. J.)

Der physiologisch vorkommende zelluläre Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) dient der zielgerichteten Abschaltung von Genen („gene silencing“). Der in mehreren Phasen ablaufende Vorgang führt zu einer Unterbrechung der Übersetzung der mRNA in ein Protein (Translation). Das zentrale Glied der RNAi ist der RNA-induced silencing complex (RISC). Für dessen Funktion sind sog. Argonautproteine verantwortlich (evolutionär stark konservierte Proteine, bestehend aus zwei Domänen), die eine Domäne besitzen um mRNA endonukleolytisch zu schneiden. Die Aktivierung des Komplexes erfolgt durch siRNAs, die aus kurzen, nicht-kodierenden, doppelsträngigen Ribonukleinsäuremolekülen bestehen. Im RISC kommt es nach dessen Aktivierung durch die siRNAs nun zur Wechselwirkung von *guide-Strang* der siRNA mit der dazu komplementären zellulären mRNA, die ebenfalls in

den RISC aufgenommen wurde. Folglich handelt sich um einen sequenzspezifischen, posttranskriptionellen Mechanismus der Unterdrückung der Genexpression eines bestimmten Gens. Erstmals wurde dieser Vorgang von Fire et al. 1998 beschrieben. Dient die RNAi physiologisch der Abwehr gegenüber RNA-Viren, so verwendet man in der molekularbiologischen Grundlagenforschung synthetische siRNAs zur gezielten Funktionsuntersuchung bestimmter Gene, die durch RNAi ausgeschaltet werden (Gen-Knockdown), um daraus resultierende Effekte zu beobachten. Laut Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific, o.J.), ist das in den Versuchen verwendete Lipofectamine RNA<sup>®</sup>MAX<sup>™</sup> hinsichtlich des Einbringens von siRNAs und miRNA in alle Zelltypen spezifisch und besitzt eine hohe Transfektionseffizienz speziell für siRNA vermittelte Gen-Knockdown-Experimente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mit siRNA transfiziert. Als Negativkontrolle dienten hierbei parallel transfizierte Wells mit Kontroll-siRNA (siCo). Die Transfektionen erfolgten immer zweimal für 4h (anschließender Mediumwechsel auf 10%FCS) und im Abstand von 24h am Folgetag der Zellaussaat nach Erreichen einer Konfluenz von 60-80%.

Well	Behandlung mit
1	50nM siCo
2	25nM siCo+25nM siRac1b
3	25nM siCo+25nM siALK5
4	25nM siRac1b+ siALK5/siRac1b

**Tabelle 2: Transfektionsbeispiel Migrationsassay.** Transfektionsbeispiel Migrationsassay 6-Wellplatte

Die Zellen wurden mit 5ng siRNA pro Well transfiziert. Zunächst wurden sowohl das Transfektionsreagenz *Lipofectamine RNAiMAX* im Verhältnis 1:20 sowie die jeweilige siRNA im Verhältnis 1:40 mit Medium in Polyesterolröhrchen verdünnt. Anschließend wurde mit Medium ohne FCS auf 1/10 des Gesamtvolumens aufgefüllt und 5min zur Inkubation gewartet. Um Störungen des Transfektionsprozesses zu vermeiden, wurde für die verschiedenen Zelllinien die entsprechenden Medien ohne Zusatz von Antibiotika oder Seren genutzt. Der Inhalt wurde vom Eppendorfgefäße in das jeweilige komplementäre Polyesterolröhrchen gefüllt und erneut für 20min bei

Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend wurde auf das Endvolumen aufgefüllt (200µl/24-Wellplatte und 400µl/6-Wellplatte), gemischt und im Falle einer 24-Wellplatte 198µl Transfektionsgemisch (6-Wellplatte: 398µl). Es wurde für 4h im Brutschrank auf den Zellen belassen, anschließend abgesaugt und mit 10%igem FCS supplementiertem Medium ersetzt.

Der beschriebene Vorgang wurde am darauffolgenden Tag in identischer Weise wiederholt, sodass die Zellen immer zweimal mit der gleichen siRNA transfiziert wurden.

### *Stimulation mit TGF-β1*

Am vierten Tag nach der Zellaussaat erfolgte die Stimulation der Zellen mit dem rekombinant hergestellten TGF-β1. Die Endkonzentration betrug 5ng/ml in allen Versuchen (Verdünnungsfaktor 1:2000). Vor Stimulation der Zellen mit TGF-β1 wurde die Serumkonzentration im Medium auf 0,5% reduziert (für mindestens 4h). Die Zellen wurden in beschriebener Konzentration für 24h und 48h stimuliert.

Durch die Kombination von RNAi und Stimulation der Zellen mit TGF-β1 kann eine durch veränderte Genexpression modifizierte Responsivität der Zellen auf TGF-β-Signale hin untersucht werden.

### *Zellyse*

Ziel der Zellyse ist die Destruktion der Zellmembran nach erfolgter Transfektion bzw. Stimulation, zur Freisetzung von Proteinen, DNA und Zellorganellen. Hierbei werden unterschiedliche Lyse-Protokolle verwendet, da die Lyse-reagenzien die weiter zu untersuchenden Zellbestandteile (Proteinproben bzw. RNA-Analyse) vor dem Abbau schützen. Somit unterscheiden sich die Lyseprotokolle zur Gewinnung von Protein – bzw. RNA – Proben:

Sollen nachfolgend Proteinproben gewonnen werden, wird ein Lysepuffer verwendet mit den Bestandteilen Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Zellmembranlyse. Weitere Komponenten des Lysepuffers sind Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), das Serin- und Cysteinproteasen inhibiert, der Phosphataseinhibitor Natriumfluorid, sowie Natriumorthovanadat zur Inhibition von Adenosintriphosphatasen (ATPasen), alkalische und saure Phosphatasen und Protein-Phosphotyrosin-Phosphatasen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Für die Gewinnung von Protein-

proben wurde zunächst das Medium abpipettiert, die Zellen mit eiskaltem PBS gespült und mit 120µl Lysepuffer versetzt. Anschließend wurde die Platte mit Parafilm abgedichtet und die Zellen unter regelmäßigem Schwenken für 30min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden sie bei -80°C gelagert.

Sofern Proben für eine RNA-Analyse gewonnen wurden, wurde als Erstes das Medium aus den Wells abgesaugt und anschließend unter dem Abzug 250µl *peqGOLD RNAPure™* in jedes Well pipettiert. *peqGOLD RNAPure™* enthält u.a. Guanidinisothiocyanat und Phenol, das die Zellen lysiert und RNasen und andere Enzyme inhibiert. Die Wellplatte wurde für 15min inkubiert und bei -80°C eingefroren.

## 2.11 Molekularbiologische Arbeiten

Im folgenden Abschnitt sind die Arbeitsschritte zur Isolation von RNA aus Zelllysaten und Messung der Konzentration derselben dargestellt. Anschließend wurde die gesamt-RNA mittels reverser Transkription in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben und es erfolgte die quantitative real-time PCR (qPCR) zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression eines Zielgens.

### *RNA-Präparation*

Beim Vorgang der RNA – Aufbereitung wird die gesamt-RNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und aufgereinigt. Hierbei wurde nach dem *peqGOLD RNA Pure* Protokoll des Herstellers vorgegangen (VWR Peqlab, o.J.).

Das verwendete Kit *peqGOLD RNA Pure™* enthält u. a. Guanidinisothiocyanat und Phenol. Das chaotrope Denaturierungsmittel Guanidinisothiocyanat dient hierbei der Lyse der Zellen. Zusätzlich sorgt es für die Inaktivierung von Proteinen und Ribonukleasen durch Denaturierung mittels seines 2-Mercaptoethanolgehaltes. In der schwachen organischen Säure Phenol (pKs: 9,99) löst sich die RNA und es erfolgt die Senkung des pH-Wertes der Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bilden sich drei Phasen: In der unteren organischen *Phenol-Chloroform-Phase* sammeln sich Proteine (und teilweise DNA), wobei der Großteil der DNA eine sog. Interphase ausbildet. Die RNA bleibt löslich und befindet sich in der oberen, wässrigen Phase. Die RNA der oberen Phase wird mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen. Das beschriebene biochemische Verfahren wird als *single-step Methode* bezeichnet und erlaubt die gleichzeitige Zelllyse

und RNA-Gewinnung mittels der dargelegten *Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion* (Chomczynski et Sacchi, 1987).

Um Kontamination der Zelllysate zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte mit eigenen für die RNA-Präparation zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien unter dem Abzug und auf Eis durchgeführt. Nach der Zellyse wurden die Zellen aufgetaut und zusammen mit dem zur Zellyse eingesetzten peqGOLD in Reaktionsgefäße überführt und für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurde je eingesetztem Milliliter peqGOLD 200µl Chloroform zur Extraktion des Lysates hinzugegeben und für 15 Sekunden (s) gevortext. Es erfolgte eine Inkubationszeit der Proben auf Eis für 10min und anschließende Zentrifugation der Proben für 5min (12.000×g bei 4°C) in der Kühlzentrifuge. Von den drei gebildeten Phasen wurde der oberste Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol (100%) und 2µl Glykogen versetzt. Nach dem Vortexen wurden die Proben erneut für 15min bei 4°C inkubiert und für 10min zentrifugiert (12.000×g bei 4°C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und je 1ml Ethanol (80%, unvergällt, gekühlt) auf jedes Pellet gegeben, gevortext und nochmalig für 10min zentrifugiert (12.000×g bei 4°C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für 10min an der Luft getrocknet, bevor es mit jeweils 20µl RNase freiem Wasser resuspendiert wurde. Danach wurden die Proben im Thermomixer bei 55°C für 10min unter leichtem Schütteln inkubiert und abschließend auf Eis gestellt und am Biophotometer gemessen.

#### *Messung der RNA-Konzentration*

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am Biophotometer in Kunststoffküvetten. Hierbei wurde die für Nukleinsäuren (DNA, RNA) notwendige Wellenlänge von 260nm verwendet. Zwei Mikroliter jeder Probe wurden mit 98µl RNase freiem Wasser verdünnt und deren Absorptionsmaxima bei oben genannter Wellenlänge gemessen. Als Reinheitskontrolle diente der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  dessen Wert 1,8 nicht unterschreiten sollte. Die Konzentrationen wurden direkt durch das Gerät berechnet.

#### *Reverse Transkription zur cDNA-Synthese*

Die reverse Transkription dient der Umschreibung der gesamt-RNA in cDNA, da die in der sich anschließenden qPCR eingesetzte Polymerase DNA-abhängig arbeitet.

Sämtliche Proben wurden durch Zugabe von RNase-freiem Wasser verdünnt. Hierbei wurde zu je 1µg RNA 10µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und anschließend im PCR-Cycler PCR Express Thermal-Cycler (Thermo Hybaid, Ashford, UK) für 5min bei 65°C im sog. Programm 23 denaturiert. Den Reaktionsgefäßen wurden nun jeweils 10µl Mastermix hinzugegeben, bestehend aus 10µl First Strand Puffer (5x), 2µl Dithiothreitol (DTT), sowie jeweils 1µl 4mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), RNase Inhibitor, Hexanukleotid Random Primer und Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) -Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte für 1h bei 37°C, abschließend wurden die Proben für 5min auf 95°C erhitzt, auf Eis gekühlt und mit 20µl (80µl) RNase-freiem Wasser verdünnt. Die synthetisierte cDNA wurde beschriftet zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.11.1 Quantitative real-time-PCR (qPCR)

Der Nachweis der relativen mRNA-Expression eines Zielgens ist ein gängiges molekularbiologisches Verfahren. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Verfahren handelt es sich um eine relative Quantifizierung. Hierbei wird zur Normalisierung der Expressionsergebnisse die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes *Housekeeping Gene* (HKG) bezogen (Rasmussen, 2001).

Sowohl das Verfahren der PCR als auch der qPCR basieren auf der Amplifikation eines kurzen und genau definierten Teils eines DNA-Stranges. Bei Letzterer erfolgt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression des Zielgens über eine Fluoreszenzmessung mit Hilfe eines zunächst inaktiven Fluoreszenzfarbstoffes. In dieser Arbeit wurde SYBR Green verwendet, der durch die DNA-Produktion aktiviert wird und sich in die DNA einlagert. Der fluoreszierende Interkalator sendet nun ein Fluoreszenzsignal aus, das von einer Kamera im PCR-Cycler gemessen wird. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen, die sich bei der Interkalation des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA während der Amplifikation erhöht. Hierbei wird ein sog. *threshold cycle* (Ct) - Wert jeder Probe gemessen, der ein Korrelat für die Zyklusanzahl ist, nach denen sich das detektierte Fluoreszenzsignal erstmalig vom Hintergrundsignal abhebt. Der Ct-Wert des untersuchenden Gens wird auf den Ct-Wert eines Haushaltsgens bezogen, in dieser Arbeit auf das

Haushaltsgen TATA-Box-bindendes Protein (TBP), dessen Wert auf 1 gesetzt wird, und somit als Referenz für die relative mRNA-Expression anderer Zielgene dient. Die Durchführung eines qRT-PCR-Laufes erfolgte in 96 Well-Platten unter Verwendung des Maxima™ SYBR Green/Fluorescein Master Kits, das neben der Maxima Hot Start-Taq-DNA-Polymerase auch dNTPs, sowie den SYBR Green Interkalationsfarbstoff enthält (Thermo Fisher Scientific, o.J.). Es wurden pro Reaktionsgefäß 23µl Mastermix (bestehend aus 12,5µl thermostabilem Maxima™ SYBR Green, 8,5µl RNase-freiem Wasser, je 1µl reverse- und forward-Primer in 1:10 Verdünnung) und 2µl cDNA gemischt, die Platte kurz auf 13.000xg anzentrifugiert und anschließend in das *qRT-PCR-Cycler Quantstudio 5™ 5 Realtime PCR System* gegeben.

Die qPCR besteht aus drei wesentlichen Schritten:

1. *Denaturierung:*

Bei ca. 95°C wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch die Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen in zwei Einzelstränge (ssDNA) getrennt.

2. *Annealing:*

Anlagerung der Primer an die ssDNA bei 55°C.

3. *Elongation:*

In diesem Schritt werden die Komplementärstränge der jeweiligen ssDNA synthetisiert. Die DNA-abhängige DNA-Polymerase als Bestandteil des Reaktionsgemisches lagert sich an den jeweiligen Primer und synthetisiert den komplementären Strang in 5'→3'-Richtung. Die Temperatur ist dabei abhängig von der Polymerase, liegt jedoch meist bei ca. 72°C.

Das hier verwendete Protokoll bestand aus einer initialen Denaturierung für 10min bei 95°C und anschließenden 40 identisch ablaufenden Zyklen aus Denaturierung für 30s bei 95°C, Annealing für 30s bei 60°C und Elongation für 30s bei 72°C.

Für die Auswertung erfolgte die Errechnung der mRNA-Expression im Sinne der relativen Quantifizierung mit den Ct-Werten des Zielgens, bezogen auf ein zweites ubiquitär exprimiertes Housekeeping-Gen, in dieser Arbeit TBP (s.o.). Die Ct-Werte wurden jeweils als Doppelwerte bestimmt, in ein laborinternes Template mit Hilfe der QuantStudio™ Design & Analysis Desktop Software eingetragen und der Quotient (Zielgen/Housekeeping-Gen) durch eine laborinterne PCR-Calculator Tabelle ermittelt.

## 2.12 Methoden der Proteinanalytik

### *Proteinbestimmung*

Nach der *Lyse der Zellen* und der *Proteinextraktion* erfolgte die quantitative Messung der enthaltenen Proteinkonzentrationen. Um in der sich anschließenden Gelelektrophorese (SDS-Page) gleiche Mengen an Protein einsetzen zu können, kam ein auf dem Verfahren von Lowry basiertes Protokoll zur Anwendung (Lowry, 1951). Die Durchführung desselben erfolgte in dieser Arbeit mit dem Protokoll des Herstellers des verwendeten Kits *DC™ Protein-Assay Kits* (Bio-Rad, München).

Der verwendete Protein-Assay setzt sich aus drei Reagenzien zusammen: Reagens A enthält eine alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung und Reagenz B enthält Folin und Reagenz S als Tensid. Nach Zugabe reagieren die Peptidbindungen der Proteine mit der alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung. Durch die Interaktionen der Peptidbindungen mit den  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen der Lösung entsteht ein blauvioletter Farbstoffkomplex. Das durch die Peptidbindung von  $\text{Cu}[\text{II}]$  auf  $\text{Cu}[\text{I}]$  reduzierte Kupfer reduziert wiederum das im Reagenz B enthaltene Folin, dass in reduzierter Form ein Absorptionsmaximum bei 750nm hat (Bio-Rad, o.J.). Als Proteinstandard wurde eine laborintern erstellte Rinderserum Albumin (BSA)-Standardreihe verwendet (0,1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,5mg/ml, 1,0mg/ml und 1,5mg/ml).

Zur *Proteinextraktion* wurden die Proben aufgetaut und mittels eines Schabers von den Wells abgelöst. Nach Überführung in Reaktionsgefäße erfolgte eine Zentrifugation für 10min ( $14.000\times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$ ), danach wurde der proteinhaltige Überstand in neue Reaktionsgefäße gegeben und das Nukleinsäurepellet verworfen. Sämtliche Proben wurden sowohl in konzentrierter, reiner Form, als auch in einer 1:5 Verdünnung in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gemessen. In eine 96-Wellplatte wurden jeweils 5 $\mu\text{l}$  Leerwert, Standardreihe oder Probe in Doppelbestimmung pipettiert. In jedes Well wurde zusätzlich mit einer Multipipette 25 $\mu\text{l}$  Reagenz AS in 1:50 Verdünnung (980 $\mu\text{l}$  Reagenz A und 20 $\mu\text{l}$  Reagenz S), sowie 200 $\mu\text{l}$  Reagenz B pipettiert. Durch die Lichtempfindlichkeit des Reagenzes B wurde die fertig pipettierte 96-Wellplatte für 15min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gelagert, hier fand die Reduktion des Folins statt. Anschließend wurde am Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 750nm die Absorption errechnet. Mittels der zugegebenen BSA-Standardreihe erfolgt die Kalibrierung der Proteine anhand des Bradford-Protokolls

(Bradford, 1976), das die Errechnung der Proteinkonzentration ermöglicht. Die Auswertung fand mit dem Programm BMG Labtech statt.

### *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)*

Mit der SDS-Gelelektrophorese erfolgt die analytische Auftrennung von proteinhaltigen Zellslysaten in einem elektrischen Feld. Bei dieser Art der Elektrophorese wandern die Proteine durch ein Trennmedium (Matrix), bei dem es sich um ein diskontinuierliches Gel auf Acrylamid-Bisacrylamidbasis (APS) handelt. Das polymerisierende Gel bildet ein Netzwerk von Poren, durch das die proteinhaltigen Zellbestandteile, beladen mit SDS als Denaturierungs- bzw. Negativladungsdetergenz innerhalb des elektrischen Feldes hin zur Anode (Plus-Pol) wandern. Das elektrophoretische System ermöglicht eine Trennung von Proteinen mit Molekülmassen von 5 bis 250kD (Laemmli, 1970). Je höher der Anteil an Bisacrylamid im Gel, desto enger sind die Poren. Für diese Arbeit wurden 10%-ige, diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit 15 Taschen verwendet, die selbstständig angefertigt wurden.

### *Herstellung des diskontinuierlichen Gels*

Das Trennmedium besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese). Das Sammelgel (oberer Teil der Matrix) hat einen neutralen pH-Wert und diente der Aufkonzentrierung der Proben. Das Trenngel besitzt einen basischen pH-Wert (8,8), nach Durchwandern des Sammelgels erfolgt hier die Auftrennung der Proben. Die Gellösung wurde zwischen zwei Glasplatten (Abstand 0,75-1,5mm) mit Abstandshaltern gegossen, die in einem Ständer fixiert waren. Die sonst offene Unterseite war durch die Abstandshalter geschlossen. Für das Ansetzen der Gellösung wurden Acrylamid als Gelbildner, Methylbisacrylamid zur Quervernetzung, Sammel- oder Trenngelpuffer sowie Wasser und SDS gemischt. Der Beginn der Polymerisation des Geles erfolgte durch die Zugabe von Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumperoxydisulfat (APS) als Radikalstarter. Die Lösung wird anschließend blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Nach dem Gießen des unteren Gels (Trenngel), wurde 1ml Ethanol dazugegeben, um am oberen Rand der Matrix Blasen zu entfernen. Das Ethanol wurde nach einer Wartezeit von 20min abgekippt und die Reste mit Filterpapier entfernt. Nach Zugabe von TEMED und APS zum bereits angesetzten

Sammelgel wurde dieses auf das feste Trenngel gegossen und ein Probenkamm (mit 15 Taschen) blasenfrei zwischen die Glasplatten eingesetzt. Nach 30-minütiger Polymerisationszeit des Sammelgels wurde der Probenkamm vorsichtig herausgezogen, sodass Taschen für den Probenauftrag entstanden.

#### *Vorbereitung und Einsetzen der Proben*

Die Proben werden mit einem Probenpuffer vermischt, der verschiedene Bestandteile enthält, u.a. Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) und Dithiothreitol (DTT). SDS ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen, indem es an Proteine bindet und deren Tertiär- und Quartärstruktur vollständig und deren Sekundärstruktur teilweise zerstört. Folglich werden die ursprünglichen Ladungsungleichheiten entfernt und durch die Negativladungen der SDS-Moleküle ersetzt (*konstantes Ladungs-Massen-Verhältnis*). Die Proteine gehen in eine einheitliche, stabförmig bzw. ellipsoide Form über und es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit mit ca. 1,4g SDS pro Proteinprobe. Die Inkubation bei 95°C (s.u.) trägt neben der SDS-Zugabe zur vollständigen Denaturierung der Proteine bei. Die reduzierende Thiolverbindung DTT bewirkt die Aufspaltung von Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen. Ferner erfolgt die Zugabe von Glycin zur Dichtererhöhung der Proben, sodass diese in der Probentasche des Sammelgels direkt nach unten wandern. Ebenfalls hinzugefügt wird der anionische Farbstoff Bromphenolblau zur optischen Kontrolle des Durchwanderns der Proben im Sammelgel während der laufenden Elektrophorese. Das von Laemmli eingeführte SDS-haltige, diskontinuierliche *Tris-HCL/Tris-Glycin-Puffer-system* zur Proteintrennung hält den pH-Wert konstant bei 6,8.

Die Proben wurden vor der Beladung mit Probenpuffer und RIPA-Puffer verdünnt: Jede Tasche wurde mit 18µl Gesamtvolumen beladen. Dieses enthielt jeweils 10µg Probe, dessen entsprechendes Volumen vorher aus dem Proteinassay berechnet wurde. Das Volumen der Probe wurde bis auf 12µl mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Zusätzlich wurde einem Drittel des Gesamtvolumens (6µl) Elektrophoresereagenz hinzugegeben, bestehend aus Probenpuffer (3x) und DTT (30x) im Verhältnis 10:1. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 5min im Heizblock bei 95°C inkubiert, sodass die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle aufgelöst wurden.

## *Gelelektrophorese*

Zur Auftrennung wurden die Proben auf das diskontinuierliche Polyacrylamidgel geladen, das sich eingelegt in Elektrophoresepuffer in einer Elektrophoresekammer befand. In die erste Tasche wurden stets 10 µl des Proteinmarkers *Spektra™ Multi-color Broad Range Protein Ladder* gegeben, der einen Detektionsgrößenbereich von 10-260kDA abdeckt (Thermo Fisher Scientific, o.J.). Die Auftrennung erfolgte durch die angelegte elektrische Spannung, die eine Migration der negativ geladenen Moleküle durch das Gel hin zur Anode (Plus-Pol) bewirkte. Aufgrund der einheitlichen Ladung wandern die SDS-Proteine mit gleicher Geschwindigkeit in das Trenngel ein, nachdem sie vorher im Sammelgel stapelförmig angeordnet worden sind. Die nun folgende Auftrennung beruht auf der Größe bzw. auf der Molekülmasse der Proteine, bedingt durch die „Siebwirkung“ des porenförmigen Netzwerkes, indem kleine Moleküle schneller zur Anode wandern als größere Proteine. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100V für 5min und 120V für eine Stunde.

Die sog *Laufmittelfront* wird dabei von den am schnellsten wandernden Proteinen (Molmasse unter 5kDA) und den ebenfalls durch das Gel wandernden anionischen Bestandteilen des Elektrophoresepuffers gebildet. Die Sichtbarkeit wird durch den kleinen, anionischen Farbstoff Bromphenolblau bewirkt. Aufgrund seiner relativ geringen Molekülgröße wandert es schneller als Proteine durch das Gel und sorgt so für eine optische Kontrolle zur Abschätzung des Voranschreitens der Gelelektrophorese. Eine längere Laufzeit führt zu einem besseren Auseinanderstrecken der Banden in der Vertikalen, sodass etwaige Bandenunterschiede in der späteren optischen bzw. densitometrischen Auswertung vereinfacht werden.

### **2.12.1 Western Blot (Proteintransfer)**

Das Ziel dieses Arbeitsschrittes ist die Übertragung mittels Elektrotransfer der zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine (PVDF)-Membran, auf der sie detektiert werden können. Anschließend werden die Proteine immunologisch nachgewiesen, um sie anhand der Proteinmenge eines Haushaltsgens quantifizieren zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hitzeschock Protein (HSP) 90 verwendet. Der Western Blot wurde im „tank-blot“-Verfahren durchgeführt, bei dem ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld (Elektroblot) angelegt wird. Die hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran besitzt eine Porengröße von

45µm und wurde zunächst für 10min in Methanol eingelegt, um ihre Bindungskapazität zu erhöhen. Die Proteine bleiben aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften. Die Schwämme und die Filterpapiere wurden zeitgleich in Blotpuffer eingelegt. Die Anordnung der mit Blotpuffer gefüllten Blotkassette war von Anode zur Kathode: Schwamm – Filterpapier - PVDF-Membran – SDS-PAGE-Gel – Filterpapier-Schwamm.

Der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte bei einer Spannung von 100V für eine Stunde, wobei der Elektrotransfer der Proteine aufgrund des negativ geladenen SDS in Richtung der Anode erfolgte. Während der Übertragung wurde die Blotapparatur mit einem Kühlakku und unter Einsatzes eines Magnetrührers gekühlt. Im Anschluss wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde mit 5%iger Magermilch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abgießen der Magermilch erfolgte die erneute Waschung mit TBS-T (dreimal für jeweils 15min).

### *Immunodetektion*

Für die Proteindetektion wurde die Membran über Nacht mit 12ml eines gegen das untersuchte Protein gerichteten Primärantikörpers versetzt und auf einem Schwenker bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper bindet direkt an einzelne Epitope des gesuchten Proteins. Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung abgegossen und dreimal für jeweils 15min mit TBS-T gewaschen. Durch das mehrmalige Waschen werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Nun wurden 10ml des Sekundärantikörpers, der 1:2000 in 5%iger Magermilchlösung verdünnt worden war, auf die Membran gegeben. Dieser ist mit einem signalbildenden Molekül, der horseradish peroxidase (HRP) konjugiert (Reporterenzym) und haftet an der Fc-Region des Primärantikörpers. Daher wird der mit dem Primärantikörper korrespondierende Sekundärantikörper, versehen mit einem signalbildenden Molekül, als *Antikörperkonjugat* bezeichnet. Nach dem Abgießen der Sekundärantikörperlösung erfolgte die erneute dreimalige Waschung für 15min mit TBS-T.

Nun wurden beide Lösungen A und B des Detektionsreagenz *enhanced chemoluminescence (ECL)* im Verhältnis 1:1 (insgesamt 10ml) auf die Membran gegeben. Zur Chemielumineszenz-Reaktion kommt es nun durch den HRP-gekoppelten Sekundärantikörper: HRP katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophtalsäure-

hydrazid) in 3-Aminophtalat, das Licht emittiert. Das emittierte Licht wird vom *Chemilumineszenz-Detektor ChemiDoc™ Imaging System* zu verschiedenen Expositionszeiten aufgenommen. Hierbei ist die Intensität der Lichtemission ein Korrelat für die relative Menge des Zielproteins im Verhältnis zu anderen aufgetragenen Proteinen.

Nach erfolgter Messung wurde das ECL abgegossen und die Membran mit TBS-T abgewaschen. Danach konnte ein weiterer Primärantikörper auf die Membran gegeben werden.

### *Auswertung*

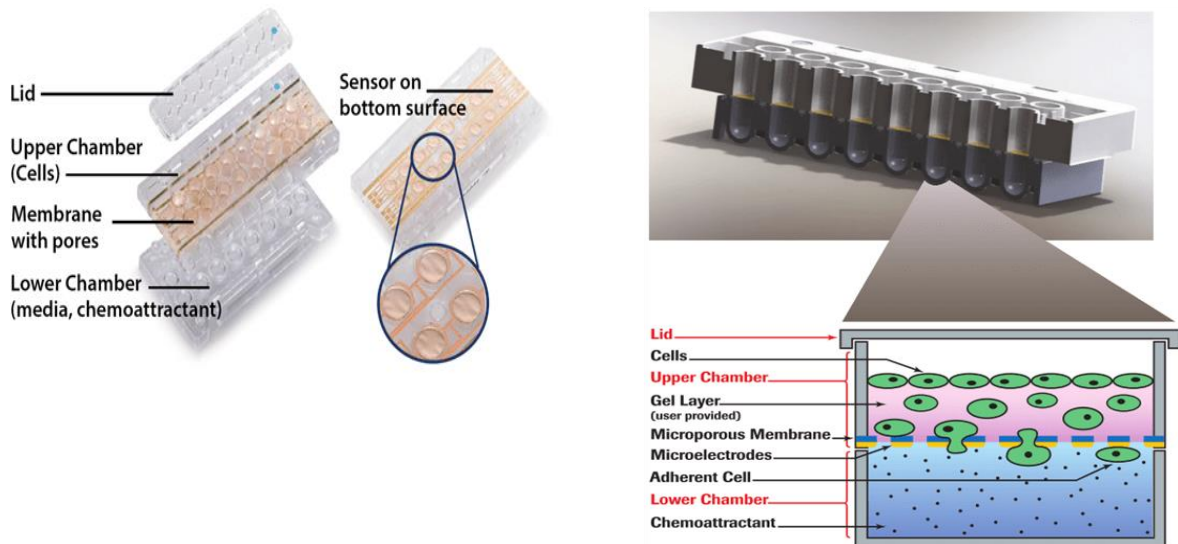
Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit dem Programm *Image Lab 5.2.1* der Firma Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA (s. 2.7 Software). Nach Angaben des Herstellers wurde die optische Dichte der Vergleichsbanden ermittelt und mögliche Ladungsunterschiede durch einen Bezug auf das jeweilige Haushaltsgen ausgeglichen. Aus diesem Vorgang resultierte ein dimensionsloser Wert, der ein Maß für die Schwärzung der jeweiligen Vergleichsbanden darstellte.

## **2.13 Echtzeit-Zell-Migrationsassay mittels xCELLigence RTCA DP**

Zur Durchführung der Migrationsstudien wurde der xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Dual Plate (RTCA DP) der Firma ACEA Biosciences (San Diego, CA, USA) verwendet. Während konventionelle Migrations (bzw. Invasions) -verfahren zumeist eine Markierung der Zellen voraussetzen oder kein kontinuierliches Monitoring der Zellwanderung im zeitlichen Verlauf ermöglichen, basiert das Funktionsprinzip des RTCA DP-Gerätes auf der Detektion von Impedanzänderungen, um die Zellmigration in Echtzeit zu ermitteln. Im Vergleich mit konventionellen, etablierten Methoden der Migrationsmessung, zeigen Ergebnisse des xCELLigence RTCA DP Assays eine hohe Korrelation und werden als adäquates Mittel zur Detektion der Zellbewegung und- migration definiert (Limame et al., 2012).

Diese Fähigkeiten sind auf den Aufbau des Gerätes zurückzuführen: Das RTCA DP Gerät besteht aus einer Analyseeinheit, die in einem Inkubator platziert wird, sowie einem als Kontrolleinheit dienenden Laptop. Die Migrationsassays wurden in einer elektronisch integrierten Boyden-Kammer durchgeführt, eine modifizierte 16-Well-

Plate, der *cell invasion and migration (CIM)-Plate®16*. Drei separat angeordnete Schlitten der CIM-Plate®16 ermöglichen eine unabhängige und zeitgleiche Nutzung. Die kontinuierliche Weiterleitung der ausgelesenen Signale an die Kontrolleinheit erlaubt dadurch die Echtzeit-Auslesung der dargestellten Graphen der migrierenden Zellen mittels der *RTCA 2.1.0 Software*.



**Abbildung 5: Aufbau der CIM-Plate®16.** Links: Komponenten der CIM-Plate®16. Rechts: Ein Well der CIM-Plate®16 mit oberer (upper chamber) und unterer (lower chamber) Kammer im Detail. Die Zellen werden in die obere Kammer eingebracht. Ihr Boden besteht aus einer porösen Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) mit 8µm großen Poren. An der Unterseite der Membran befinden sich Goldelektroden (Mikroelektroden). Auf das Matrigel (gel layer) wurde bei diesem Versuch verzichtet, da die Zellen direkt auf die Membran gegeben wurden (nach Figure 1 CIM Plate Overview, („Cell Migration & Cell Invasion Assay Application | ACEA Biosciences“ o. J.)

Die funktionellen Einheiten der CIM-Plate®16 sind die Goldelektroden an der Unterseite der Membran (microporous membrane). Sind diese umgeben von Nährmedium, wie in den Versuchen dieser Arbeit mit RPMI (1%FCS), bewirkt das angelegte elektrische Potenzial ein Potentialgefälle von 22mV und einen Elektronenfluss durch das elektrisch leitende Medium. Wandern nun Zellen von der oberen in die untere Kammer, haften sie an den Goldelektroden und behindern den Elektronenfluss. Das Zellmigrationsverhalten erhöht somit die Impedanz. Unter Impedanz versteht man den Strömungswiderstand, der sich erhöht, sobald Zellen durch die Poren der PET-Membran bewegen und an den Goldelektroden haften. Dadurch wirken die Zellen als Isolatoren und erhöhen die Impedanz. Die Höhe der Impedanzänderung

korreliert mit der Anzahl, Größe und Form der migrierenden Zellen. Weder die Mikroelektroden noch das angelegte elektrische Potenzial haben einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität. Die Impedanzänderung wird alle 15min für mindestens 48h von der Software gemessen und in einen dimensionslosen *Cell Index (CI)* umgerechnet. Der CI ist somit ein Maß für die relative Zellmigration. Sein Wert ist 0, sofern keine Zellen durch die poröse Membran wandern. Die ermittelten Graphen (CI gegen die Zeit) können somit Rückschlüsse auf die Migrations- und Invasionsgeschwindigkeit und - Kapazität der Tumorzellen ermöglichen (Mandel et al., 2013). Das Verfahren ist geeignet um Tumorzellen, die unbehandelt oder unter Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen in den Migrationsassay gegeben werden, hinsichtlich ihres Migrations- und invasiven Verhaltens zu beurteilen.

Bei der Versuchsdurchführung wurde nach zuvor etablierten Protokollen vorgegangen (Ungefroren et al., 2013). Zu Beginn wurden die Goldelektroden an der Unterseite der unteren Kammer mit 30µl Kollagen I (400µg/ml) beschichtet und ca. zwei Stunden trocknen gelassen. Es wurde besonders auf das blasenfreie Auftragen des Kollagens I geachtet. Durch diesen Arbeitsschritt sollte die Haftung der Zellen an den Goldelektroden verstärkt werden, um bei der Migration der Zellen durch die poröse Membran die Wahrscheinlichkeit eines Zell-Elektrodenkontaktes zu erhöhen. Bei der Befüllung der CIM-Plate®16 wurden zunächst zuerst in die Wells der unteren Kammer jeweils 165µl serumreduziertes Medium (RPMI mit 1%FCS) pipettiert. Beide Kammern wurden über einen Klickmechanismus miteinander verbunden und in die Wells der oberen Kammer wurden mit je 50µl serumreduzierten Medium (RPMI mit 1%FCS) gefüllt. Insgesamt sechs mit luftgefüllten Kammern am oberen und unteren Rand der Platte werden mit je 80µl PBS gefüllt, um Verdunstungseffekte zu minimieren. Die Platte wurde nun für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Auf die transfizierten Zellen wurde mindestens 16h vor der Ablösung serumreduziertes Medium gegeben. Die Zellen wurden abgelöst und für jeden Ansatz wurde Mix aus Zellsuspension und serumreduziertes Medium (RPMI mit 1%FCS) erstellt. TGF-β1 wurde der Hälfte der Ansätze zur Stimulation hinzugegeben. Von jedem geplanten Ansatz wurden je vier Kammern stimuliert und je vier Kammern unstimuliert mit jeweils 100µl befüllt. Nach zwanzigminütiger Inkubation, während dieser das Gerät kalibriert wurde, wurden die beladenen Platten in die Messkammern des xCELLigence Gerätes eingeführt. Nach Starten des Programmes RTCA Software

2.0 wurde für mindestens 48h alle 15min die Impedanzänderung gemessen. Anschließend erfolgte die Auswertung ebenfalls mit der mitgelieferten RTCA Software.

## **2.14 statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung dieser Arbeit erfolgte hinsichtlich der Densitometrie bei Western Blot-Analyse mit Hilfe des Programmes *Image Lab 5.2.1* der Firma Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA (s. 2.7 Software). Je nach Experiment erfolgte die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen mittels Microsoft Excel 2017. Die Durchführung der statistischen Signifikanzprüfungen erfolgten anhand des Students t-Test (zweiseitig, ungepaart). Von statistischer Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  (\*) ausgegangen. Höhere Signifikanzlevel wurden deklariert bei  $p < 0,01$  (\*\*) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*).

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss das siRNA-vermittelte Ausschalten des für Rac1b codierenden Genes auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion hat. Unter der Annahme, dass die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion an einem proximalen Punkt durch Rac1b negativ beeinflusst wird, wurde die Proteinexpression und mRNA-Menge von ALK5 quantifiziert. Ferner wurde in experimentellen Untersuchungen die funktionelle Signifikanz der Rac1b-vermittelten Negativregulation von ALK5 im Kontext der TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellmigration untersucht. Des Weiteren sollten Zielproteine identifiziert werden, die an diesen regulatorischen Effekten von Rac1b beteiligt und essenziell für das genauere Verständnis des molekularen Wirkmechanismus sind.

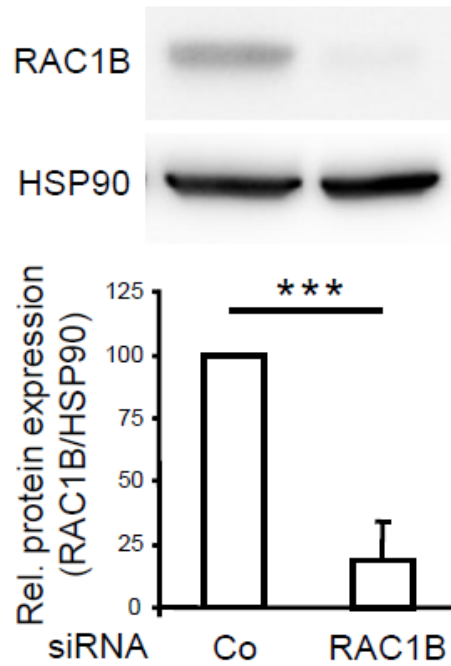
Für die Umsetzung dieser Vorhaben bildeten in multimodalen Ansätzen (Western Blot, quantitative Echtzeit-PCR-Analyse) PANC-1-Zellen, die Rac1b exprimieren und ein gutes Ansprechen auf TGF- $\beta$ 1-Stimulation zeigen, das primäre Zellmodell. Neben den oben erwähnten, etablierten molekularbiologischen Methoden wie Western Blot und qPCR, wurden u.a. Zellmigrations-Assays mit dem *xCELLigence DP-System* der Firma Area Biosciences durchgeführt. Dieses System misst in Echtzeit, basierend auf einer elektrischen Widerstandsmessung, die Zahl der Zellen, denen es gelungen ist, in einem Zwei-Kammersystem durch eine poröse Trennmembran von der oberen in die untere Kammer zu gelangen. Auf Basis dieser Wanderung der Zellen, lassen sich Rückschlüsse auf die Metastatisierungsfähigkeit der verwendeten Tumorzellen schließen.

### 3.1 Überprüfung der siRNA Wirkung von Rac1b

Der für diese Arbeit gewählte molekulare, experimentelle Versuchsaufbau setzt ein erfolgreiches Ausschalten des für Rac1b-kodierenden Gens voraus. Durch Transfektion mit siRNA wurde hierfür eine adäquate Methode gewählt, die ein Abschalten von transkriptionell aktiven Genen bewirkt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte auf Protein-Ebene durch Western Blot (mittels Rac1b- und Referenzprotein HSP90-Antikörper), sowie zusätzlich als Quantifizierung im Balkendiagramm nach densitometrischer Auswertung der Proteinbanden (Abbildung 6).

Hierbei zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit Rac1b-siRNA auch empirisch quantifizierbar zu einem hochsignifikanten Rückgang (\*\*\*) entspricht ( $p < 0,001$ ) der Proteinmenge von Rac1b führte. Die relative Proteinexpression von Rac1b wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen (siCo) um mehr als 80% verringert (Abbildung 6).

Aufgrund des dargelegten Experiments und des belegbaren starken Rückganges der Rac1b-Proteinmenge nach Silencing dieses Zielgens via RNAi, war davon auszugehen, dass der Einsatz der nachfolgend verwendeten siRNA von Rac1b in weiteren Experimenten ein suffizientes Ausschalten dieses Zielgens bewirkt.



**Abbildung 6: Quantifizierung der Rac1b Proteinexpression in Rac1b-depletierten-PANC-1-Zellen.** Die PANC-1-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit siRac1b transfiziert und anschließend für die Analyse mit Hilfe des Western Blots mit Rac1b- und HSP90-Antikörper präpariert. Das Diagramm unterhalb des Western Blots zeigt die Quantifizierung der Daten aus der densitometrischen Analyse der Proteinexpression. Die Signalstärken von Rac1b wurden im Bezug zu HSP90 normalisiert und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander identisch durchgeführten Experimenten.

### **3.2 Einfluss von Rac1b auf die ALK5-Expression in PANC-1-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene**

Rac1b ist ein potenter Inhibitor des TGF- $\beta$ -Signalweges und der TGF- $\beta$ -induzierten Zellmigration, möglicherweise an einem proximalen Punkt der TGF- $\beta$ -Signalkaskade beginnend. Daher steht ALK5 als Rezeptor im Fokus der Untersuchung dieser Arbeit. In den zellulären TGF- $\beta$ -Wirkungen spielt dieser Rezeptor mit Serin-/Threoninkinaseaktivität, aber auch Tyrosinkinaseaktivität, eine zentrale Rolle, da ihm eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des TGF- $\beta$  Signalweges zukommt und somit PANC-1-Zellen über Rac1b die TGF- $\beta$ -Sensitivität der Zellen an einen strategisch wichtigen, proximalen Punkt kontrollieren.

Mittels Western Blot und qPCR wurde untersucht, inwiefern Rac1b die Quantität der Protein- und mRNA -Menge von ALK5 in PANC-1-Zellen reguliert.

#### **3.2.1 Regulation der ALK5-Expression durch Rac1b auf Protein-Ebene**

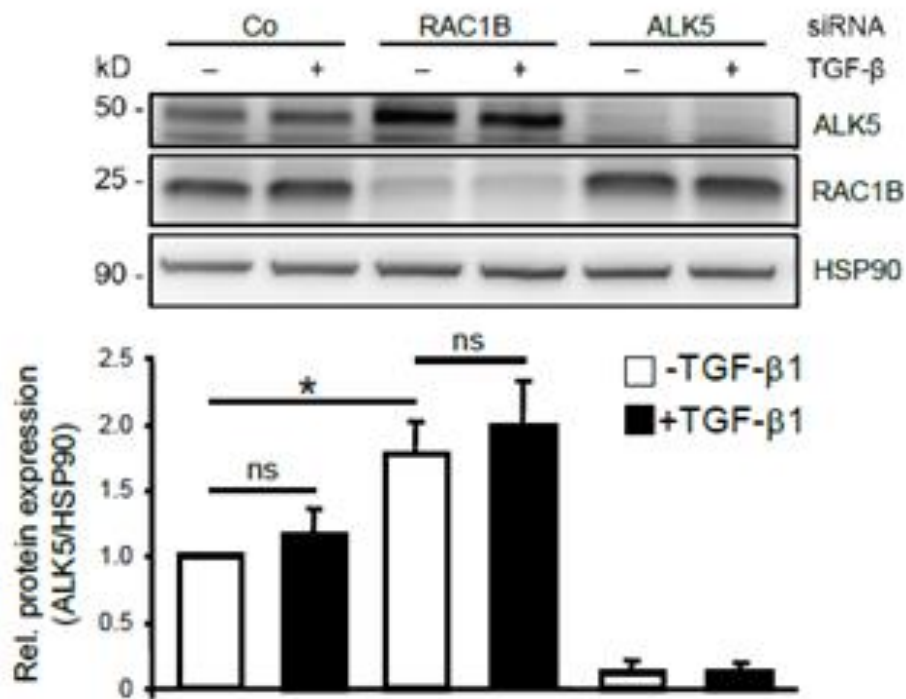
Die ALK5 Expression in Abhängigkeit von Rac1b auf Proteinebene wurde näher untersucht. Hierfür wurden PANC-1-Zellen mit siRac1b transfiziert und die Zellen wurden entweder mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert oder unbehandelt belassen, um zu überprüfen, ob die Regulation der ALK5-Expression TGF- $\beta$ -abhängig ist. Anschließend wurde ALK5 in den Zelllysaten im Western Blot nachgewiesen und durch ein densitometrisches Verfahren mittels der Software „Image Lab 5.2.1“ der Firma Bio-Rad Laboratories (s. 2.7 Software) quantifiziert. Dabei bestand in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen eine residuale Expression von endogenem Rac1b Protein. (vergleiche Abbildung 6).

Dennoch zeigte sich in diesem Experiment, dass die Rac1b-depletierten Zellen eine deutlich höhere ALK5-Proteinmenge aufwiesen als die Kontrollzellen, die lediglich mit siCo transfiziert wurden (Abbildung 7). Dabei war die ALK5-Proteinmenge der siRac1b-depletierten, unstimulierten PANC-1-Zellen 1,6fach höher als ihr Pendant der siCo-transfizierten, unstimulierten Kontrollzellen. Speziell diese Erhöhung war statistisch signifikant (Abbildung 7, \*).

Ferner zeigte sich zwar innerhalb der Kontrollzellen, und den siRac1b-transfizierten Zellen ein ALK5-Proteinanstieg, sofern sie für 12 bzw. 24h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 7, ns).

Außerdem beweist die Darstellung der Proteinbanden, dass die Behandlung der PANC-1-Zellen mit siALK5 zu einem suffizienten Ausschalten der dafür kodierten Proteine führte.

Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass das erfolgreiche Silencing von Rac1b in den PANC-1-Zellen in Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 zu einem signifikanten Anstieg der ALK5-Proteinmenge führt. Stimuliert man diese mit siCo bzw. siRac1b genetisch veränderten Zellen mit TGF- $\beta$ 1 für 12h bzw. 24h, lässt sich ebenfalls ein Anstieg der ALK5-Proteinmenge detektieren, der jedoch statistische Signifikanz vermissen lässt.



**Abbildung 7: Einfluss der Rac1b-Depletion auf die Proteinexpression von ALK5 in PANC-1-Zellen.** Dargestellt sind die Ergebnisse der mittels Western Blot analysierten Proteinexpression von ALK5. Die PANC-1-Zellen wurden zu diesem Zweck an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Kontroll (Co)-, Rac1b- oder ALK5-siRNA transfiziert. 48h nach der zweiten Transfektion wurden die Proben für 12h und 24h mit 5ng/ml TGFβ-1 stimuliert und anschließend wurden die Zelllysate für die Analyse mittels Western Blots von ALK5, Rac1b und dem Hitze-Schock-Protein (HSP90) verarbeitet. Die Banden wurden mit Hilfe eines nicht abgebildeten Größenstandards identifiziert. Als Referenzprotein für die Beladung der verschiedenen Spuren diente HSP90. Die Graphen zeigen die Quantifizierung der ALK5-Daten, normalisiert in Relation zu dem Referenzprotein HSP90 und repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängig voneinander, identisch durchgeführten Experimenten.

Das Sternchen zeigt statistische Signifikanz an. ns, nicht signifikant.

### 3.2.2 Regulation der ALK5-Expression durch Rac1b auf mRNA-Ebene

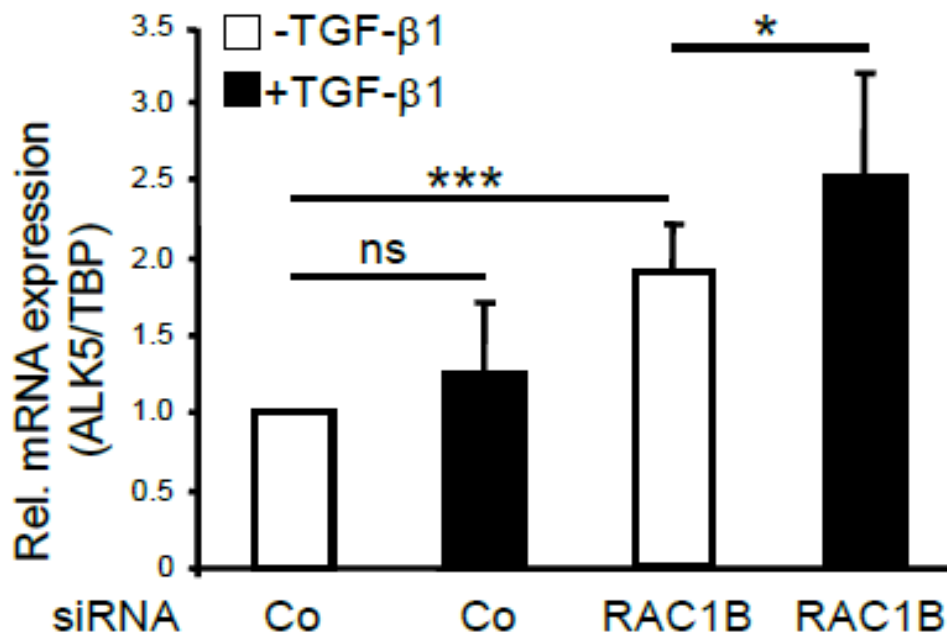
Da im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, dass durch Rac1b-Silencing in unstimulierten PANC-1-Zellen die ALK5-Proteinexpression signifikant gesteigert wird (Abbildung 7). Nun sollte im folgenden Versuch bestimmt werden, ob der negative Effekt von Rac1b auf die ALK5-Proteinmenge ebenfalls mit einer Erhöhung der ALK5-mRNA korreliert.

Hierzu wurden in PANC-1-Zellen (nach Transfektionsprotokoll) mit siRac1b transfiziert und die Proben wurden entweder mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der ALK5 mRNA-Menge in der qPCR nach Normalisierung der Messdaten auf TATA-box-binding protein (TBP).

Es zeigte sich eine deutlich signifikante Zunahme der ALK5-mRNA in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen, im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 8). Dieser Effekt war unter basalen Bedingungen, d.h. ohne Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 statistisch hoch signifikant (Abbildung 8, \*\*\*).

Unter TGF- $\beta$ 1 Stimulation der Rac1b-depletierten Zellen zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der ALK5-mRNA Menge, die als statistisch signifikant zu bewerten ist (\*). In den Kontrollzellen konnte ebenfalls eine Erhöhung der ALK5-mRNA festgestellt werden, diese war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 8; ns).

Festzustellen war durch das dargelegte Experiment erstens, dass es auch auf mRNA-Ebene in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen zu einer statistisch signifikanten Hochregulation der Menge von ALK5 kommt. Zweitens ist die Erhöhung der ALK5-mRNA in Rac1b-depletierten Zellen durchaus in Abhängigkeit von der TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu betrachten: Eine statistisch signifikante Erhöhung der ALK5-mRNA-Menge war nach Stimulation der Zellen zu beobachten, während der Anstieg von ALK5-mRNA in den stimulierten Kontrollzellen, nicht statistisch signifikant war. Zusammenfassend konnte der Abschnitt 3.2 zeigen, dass eine Korrelation der ALK5-Hochregulation auf Protein (Abbildung 7) - und mRNA-Ebene (Abbildung 8) durch Rac1b-Silencing in PANC-1-Zellen besteht. Die TGF- $\beta$ 1-abhängige Hochregulation der ALK5-Menge wurde lediglich auf mRNA-Ebene, in den durch siRac1b transfizierten Zellen statistisch signifikant bewiesen.



**Abbildung 8: Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse (qPCR) der mRNA von ALK5 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.** Dargestellt sind die Ergebnisse der mittels qPCR analysierten mRNA-Expression von ALK5. Die Proben wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Kontroll (Co)-, Rac1b-siRNA transfiziert. 48h nach der zweiten Transfektion erfolgte 24h lang die Stimulation der Proben mit 5ng/ml TGF-β1 (- TGF-β1 weißer Balken, + TGF-β1 schwarzer Balken). Jede Probe wurde doppelt analysiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung nach Anpassung der Messdaten auf TBP ( $\Delta\Delta$  Ct-Werte der qPCR). Sich statistisch signifikant (T-Test) unterscheidende Proben wurden mit „\*“ ( $p < 0,05$ ) bzw. „\*\*\*“ ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet. ns, nicht signifikant.

### **3.3 Überprüfung der funktionellen Bedeutung der ALK5-Induktion auf die Migration in PANC-1-Zellen mit Hilfe von xCELLigence-Migrationsassays**

Mit Hilfe von xCELLigence-Migrationsassays und der durch sie detektierbaren Wanderung der Zellen (in vitro) durch eine poröse Trennmembran, können Schlussfolgerungen auf die Fähigkeit der Zellen zu metastasieren gezogen werden. Daher wurde nun im Folgenden überprüft, ob die durch Rac1b-Depletion vermittelte Hochregulation von ALK5 tatsächlich für die verstärkte Migration der Tumorzellen verantwortlich ist.

Für diese Fragestellung führten wir diverse Versuche mit jeweils unterschiedlicher Behandlung der Zellen, hinsichtlich genetischer Manipulation oder Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 durch. Zunächst verwendeten wir PANC-1-Zellen, die eine dominant-negative Mutante von ALK5 (K232R-Mutante) stabil retroviral exprimieren oder Leervektor- und Wildtyp-Kontrollzellen mit siRac1b (3.3.1, Abbildung 9).

Außerdem transfizierten wir PANC-1-Wildtyp-Zellen mit einer Kontroll-siRNA (siCo) und siRNA für ALK5 und führten die Transfektate ebenfalls einem Migrationsassay zu (3.3.2, Abbildung 10). In einem parallelen Ansatz kotransfizierten wir konventionelle PANC-1-Wildtyp-Zellen mit siRNAs gegen ALK5 *und* Rac1b (3.3.3, Abbildung 11). Unter An- bzw. Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 wurden mit beiden Ansätzen 48h nach siRNA-Transfektion die Migrationsassays gestartet.

#### **3.3.1 Einfluss der ALK5 Serin/Threoninkinase-Aktivität auf die durch TGF- $\beta$ -Stimulation induzierte Zellmigration in PANC-1-Zellen nach Rac1b-Silencing**

Die Zellen mit der ALK5-KR-Mutante und PANC-1-Wildtyp-Zellen wurden entweder mit 50nM siCo oder mit 50nM siRac1b transfiziert. 48h nach siRNA-Transfektion wurden die Proben unter Anwesenheit von TGF- $\beta$  den Migrationsassays zugeführt und die Migration der Zellen über die poröse Trennmembran wurde über einen Zeitraum von 48h detektiert.

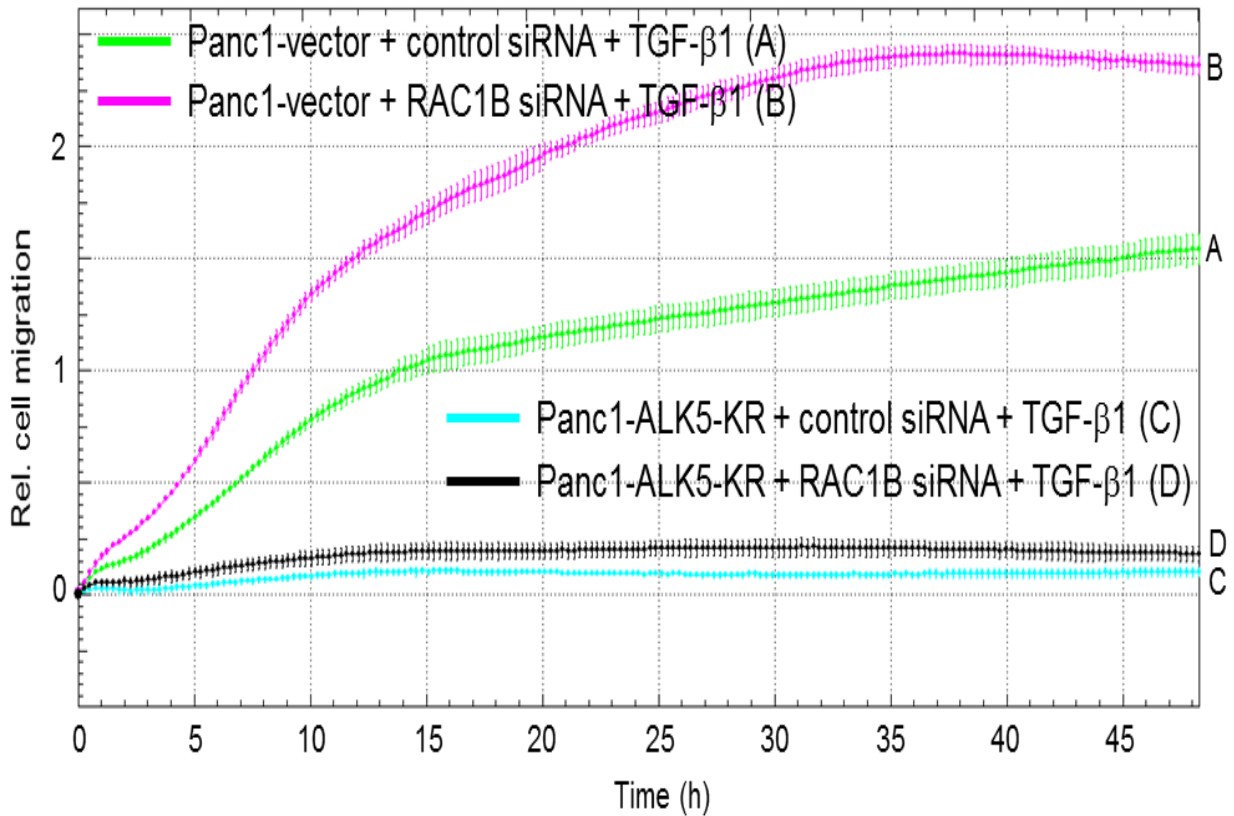
Die basale Migrationsfähigkeit der verwendeten Zellen ist anhand der Kontrollzellen abzulesen (Abbildung 9, Panc-1-vector + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur A). Nach Rac1b-Silencing der PANC-1-Vektorzellen kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Zellmigration (Abbildung 9, Panc-1-vector + Rac1b siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur B).

Ausgesprochen beachtlich war, dass in den ALK5-K232R-transduzierten Zellen die Rac1b siRNA-induzierte Erhöhung der durch TGF $\beta$ -1-ausgelösten Zellmigration vollständig gedämpft war (Abbildung 9, Panc-1-ALK5-KR + Rac1b siRNA + TGF- $\beta$ 1, schwarze Kurve, Spur D).

Auch in den ALK5-KR-Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abbildung 9, Panc1-ALK5-KR + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, hellblaue Kurve, Spur C), war die Migration der Zellen im Vergleich zu den PANC-1-Leervektorzellen ohne ALK5-KR-Mutante (Abbildung 9, Panc-1-vector + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur A) deutlich verringert.

Die Unterschiede der Messwerte zwischen den Kurven der Proben Panc-1-vector + RAC1b siRNA + TGF- $\beta$ 1 (Abbildung 9, magentafarbene Kurve, Spur B) und die Kurve der Probe Panc1-ALK5-KR + RAC1b siRNA + TGF- $\beta$ 1 (Abbildung 9, schwarze Kurve, Spur D) waren signifikant ab 00:15 nach Startzeit der Messung und in allen späteren Messzeitpunkten.

Anhand des dargestellten Graphen konnte deutlich gemacht werden, dass erstens das Rac1b-Silencing zu einem migrationsfördernden Effekt der PANC-1-Wildtyp-Zellen führt. Zweitens wird dieser Effekt der Erhöhung der Migrationsfähigkeit eindrucksvoll in den ALK5-K232R-transduzierten Zellen wieder aufgehoben (Abbildung 9, Panc-1-ALK5-KR + Rac1b siRNA + TGF- $\beta$ 1, schwarze Kurve, Spur D). Dabei wird die dämpfende Wirkung der ALK5-K232R-Mutante sowohl in den Leervektorzellen (Abbildung 9, Panc-1-ALK5-KR + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, hellblaue Kurve, Spur C) als auch in den Rac1b-depletierten Zellen (Abbildung 9, Panc-1-ALK5-KR + Rac1b siRNA + TGF- $\beta$ 1, schwarze Kurve, Spur D) deutlich.



**Abbildung 9: Einfluss der RNA-Interferenz mit ALK-K232R auf die TGF- $\beta$ -induzierte Migration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.** Dargestellt ist die mittels xCELLigence analysierte Migrationsaktivität von PANC-1-Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 48h eines repräsentativen Experiments. Hierfür wurden PANC-1-Zellen, die eine dominant-negative Mutante von ALK5 (K232R) tragen und Leervektor-PANC-1-Zellen mit 50nM von Kontroll (siCo)-oder Rac1b-siRNA transfiziert und dem Echtzeit-Zell-Migrationsassay zugeführt. Die jeweilige, detaillierte Behandlung der Zellen ist in der Legende vermerkt. Der *cell index* korreliert mit der Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit von der oberen Kammer der CIM-16 Platte in die untere, durch eine poröse Membran von der ersten Kammer getrennte Kammer migrieren. Der dargestellte Migrationsassay steht repräsentativ für drei unabhängig voneinander, identisch durchgeführte Experimente. Die Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-4 unterschiedlich analysierten Wells dar.

### 3.3.2 Untersuchung der TGF- $\beta$ -abhängigen Zellmigration in PANC-1-Zellen nach ALK5-Silencing

Im vorherigen Experiment konnten wir zeigen, dass die Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen eine starke Erhöhung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration bewirkt (Abbildung 9, vergleiche magentafarbene Kurve, Spur B mit grüner Kurve, Spur A). Die Aktivität der ALK5-Kinase spielt offensichtlich ebenfalls eine zentrale Rolle, da in ALK5-KR-Zellen die TGF- $\beta$ 1-abhängige Chemokinese deutlich gedämpft war (Abbildung 9, s. schwarze Kurve, Spur D).

Um die entscheidende Rolle von ALK5 auf das Migrationsverhalten weiter zu differenzieren, transfizierten wir PANC-1-Zellen mit einer siALK5 und führten diese Zellen in An- bzw. Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 einem Migrationsassay zu. Im Vergleich zu den siALK5-transfizierten Zellen ließen wir Kontrollzellen mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation im Migrationsassay detektieren. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde für insgesamt 48 h aufgezeichnet.

Deutlich wurde, dass die TGF- $\beta$ 1-Behandlung der PANC-1-Zellen die Migrationsaktivität erhöht; so war die basale Zellmigration der Kontrollzellen (Abbildung 10, Panc-1 + control siRNA, rote Kurve, Spur A) geringer, als in den PANC-1-Zellen, die mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert wurden. (Abbildung 10, Panc-1 + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur B).

Durch Transfektion der Zellen mit siALK5, kam es zu einer starken Reduktion der Zellmigration. Diese Verringerung betraf sowohl die stimulierten (Abbildung 10, Panc-1 + ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D), als auch die unstimulierten PANC-1-Zellen (Abbildung 10, Panc-1 + ALK5 siRNA, blaue Kurve, Spur C).

Die Vermittlung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Chemokinese ist an das Vorhandensein eines funktionsfähigen ALK5 geknüpft. Mit dem siRNA-vermittelten Ausschalten von ALK5 reduzierte sich in den unstimulierten PANC-1-Zellen fast vollständig die Fähigkeit von der oberen in die untere Kammer zu migrieren (Abbildung 10, Panc-1-ALK5 siRNA, blaue Kurve, Spur C). Sie fielen hinsichtlich der Migrationsaktivität unter das Niveau der unstimulierten Kontrollzellen (Abbildung 10, Panc-1 + control siRNA, rote Kurve, Spur A).

Des Weiteren bewirkte die Stimulation der ALK5-depletierten Zellen mit TGF- $\beta$ 1 keinen signifikanten Anstieg der Migration (Abbildung 10, Panc-1-ALK5 siRNA+ TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D).

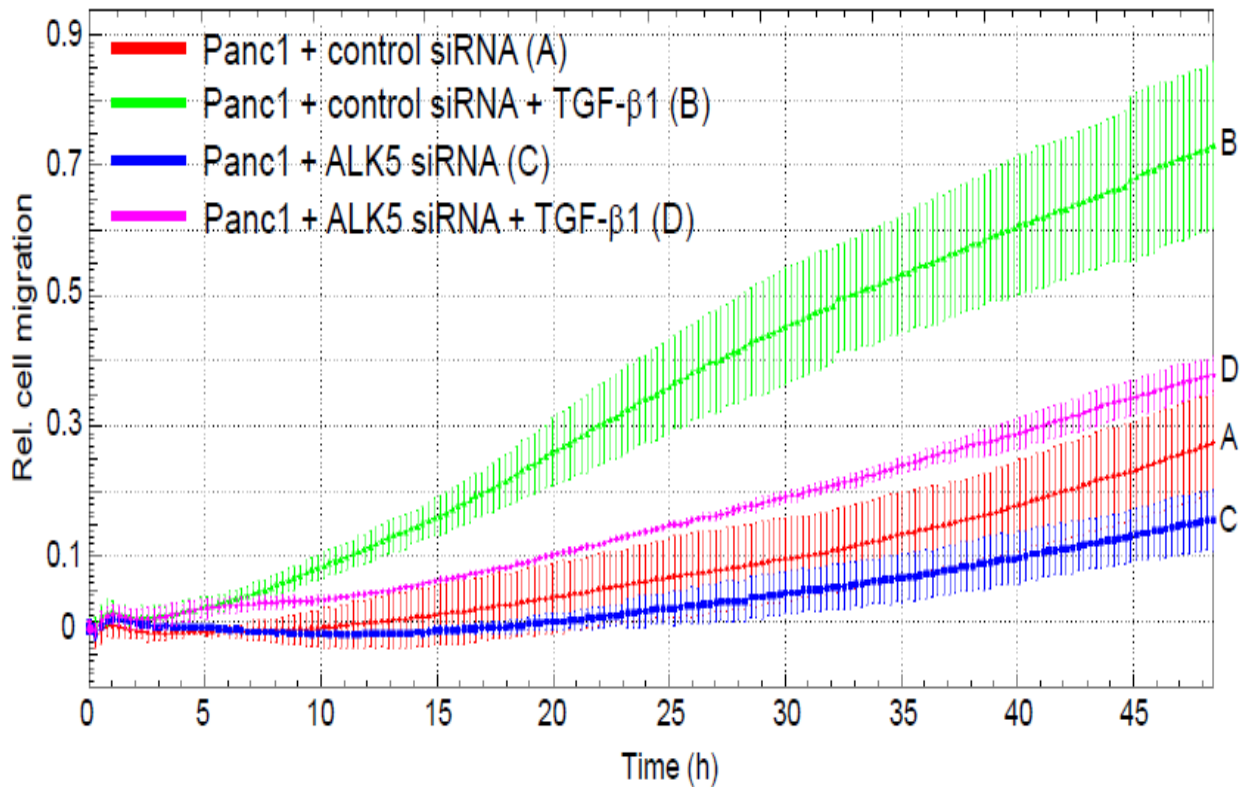
Vergleicht man die beiden Kurven der siALK5-behandelten Zellen (Abbildung 10, Panc-1-ALK5 siRNA, blaue Kurve, Spur C und Panc-1-ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D) fällt auf, dass die TGF- $\beta$ 1-Stimulation einen marginalen positiven Effekt auf die Migrationsfähigkeit der Zellen hat.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass das siRNA-vermittelte Ausschalten der ALK5-Kinase in den PANC-1(-Wildtyp) -Zellen eine signifikante Reduktion der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration (Abbildung 10, Panc-1-ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D) hervorruft. Dies lässt sich v.a. aus dem Vergleich mit dem Graphen der Kontrollzellen (Abbildung 10, Panc-1 + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur B) ableiten: Wie in dem repräsentativen Experiment in Abbildung 10 dargestellt, legen die stimulierten Kontrollzellen das stärkste TGF- $\beta$ 1-vermittelte Migrationsverhalten von allen Zellreihen an den Tag.

Dies lässt Rückschlüsse auf die hohe Bedeutung von ALK5 bei der durch ihn vermittelten Chemokinese zu: Die Anwesenheit und die adäquate Funktion von ALK5 scheint für die TGF- $\beta$ 1-abhängige Signaltransduktion notwendig zu sein.

Die Unterschiede zwischen Panc-1 + ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1 (magentafarbene Kurve, Spur D) und Panc-1 + control siRNA + TGF- $\beta$ 1 (grüne Kurve, Spur B) waren ab 07:45 Uhr und allen darauffolgenden Messzeitpunkten signifikant.

Wird die Funktion der ALK5-Kinase mittels RNAi ausgeschaltet, reduziert sich die Migrationsaktivität der Zellen deutlich, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 (Abbildung 10, s. beide Transfektate: Panc-1-ALK5 siRNA, blaue Kurve, Spur C und Panc-1-ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D), wobei die TGF- $\beta$ 1-Behandlung hier durchaus für einen migrationsfördernden Effekt sorgt (Panc-1-ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur D).



**Abbildung 10: Effekt der siRNA-vermittelten Interferenz von ALK5 auf die TGF- $\beta$ -induzierte Migration von PANC-1-Zellen.** Dargestellt ist die mittels xCELLigence analysierte Migrationsaktivität von PANC-1-Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 48h eines repräsentativen Experiments. Die jeweilige, detaillierte Behandlung der Zellen ist in der Legende vermerkt. Die Zellen wurden nach Transfektionsprotokoll an zwei aufeinander folgenden Tagen mit 50nM entweder einer Kontroll- (siCo) oder einer ALK5 siRNA transfiziert. 48h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen für den Migrationsassay aufbereitet und dem Echtzeit-Zell-Migrationsassay zugeführt. Unmittelbar vor dem Start des Migrationsassays erhielten die Hälfte der Proben 5ng/ml TGF- $\beta$ 1. Der *cell index* korreliert mit der Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit von der oberen Kammer der CIM-16 Platte in die untere, durch eine poröse Membran von der ersten Kammer getrennte Kammer migrieren. Der dargestellte Migrationsassay steht repräsentativ für ein Experiment und die Daten stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-4 unterschiedlich analysierten Wells dar.

### 3.3.3 Wirkung des ALK5-Silencing auf die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.

Wie in Abschnitt 3.3.2 dargestellt, bewirkte die siRNA-vermittelte Eliminierung der ALK5 Kinase, eine deutliche Verringerung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Migration der PANC-1-Zellen.

Im nächsten Schritt der weiteren Experimente wollten wir nun die funktionale Rolle der ALK5-Kinase auf das Migrationsverhalten in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen näher differenzieren.

Es wurden Migrationsassays mit mehreren parallelen Ansätzen durchgeführt: Zusätzlich zu den bereits betrachteten Kontroll- und siRac1b-transfizierten Zellen, wurden in einem parallelen Ansatz PANC-1-Zellen mit siRNA gegen Rac1b *und* ALK5 kotransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach siRNA-Transfektion wurden die Migrationsassays mit den Transfektaten (in An- und Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1) gestartet. Insgesamt wurde die Migration der Zellen für 48h aufgezeichnet. Ziel war es, Evidenz zu gewinnen, dass die Erhöhung der ALK5-Menge ebenfalls verantwortlich für die TGF- $\beta$ -vermittelte, verstärkte Chemokinese der Rac1b-depletierten Zellen ist. Die basale Migrationstätigkeit unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation der Kontrollzellen ist in der grünen Kurve dargestellt (Abbildung 11, Panc-1 + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur A).

Wie bereits in der vorherigen Versuchsreihe der Migrationsassays dargestellt, wurde auch in diesem Versuch die Migrationsfähigkeit der Zellen deutlich gesteigert, sofern man PANC-1-Zellen mit siRac1b transfiziert (Abbildung 11, vergleiche Panc-1-vector + control siRNA + TGF- $\beta$ 1, grüne Kurve, Spur A als basale Migrationsrate mit Panc-1-vector + RAC1BsiRNA + TGF- $\beta$ 1, magentafarbene Kurve, Spur B).

In diesem Versuch wurde zusätzlich festgestellt, dass die hohe Migrationsaktivität der durch Rac1b-depletierten Zellen unter Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 signifikant reduziert wird, sofern man in den PANC-1-Zellen *zusätzlich* die ALK5 -Kinase eliminiert (Panc-1 + RAC1B siRNA + ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, schwarze Kurve, Spur C).

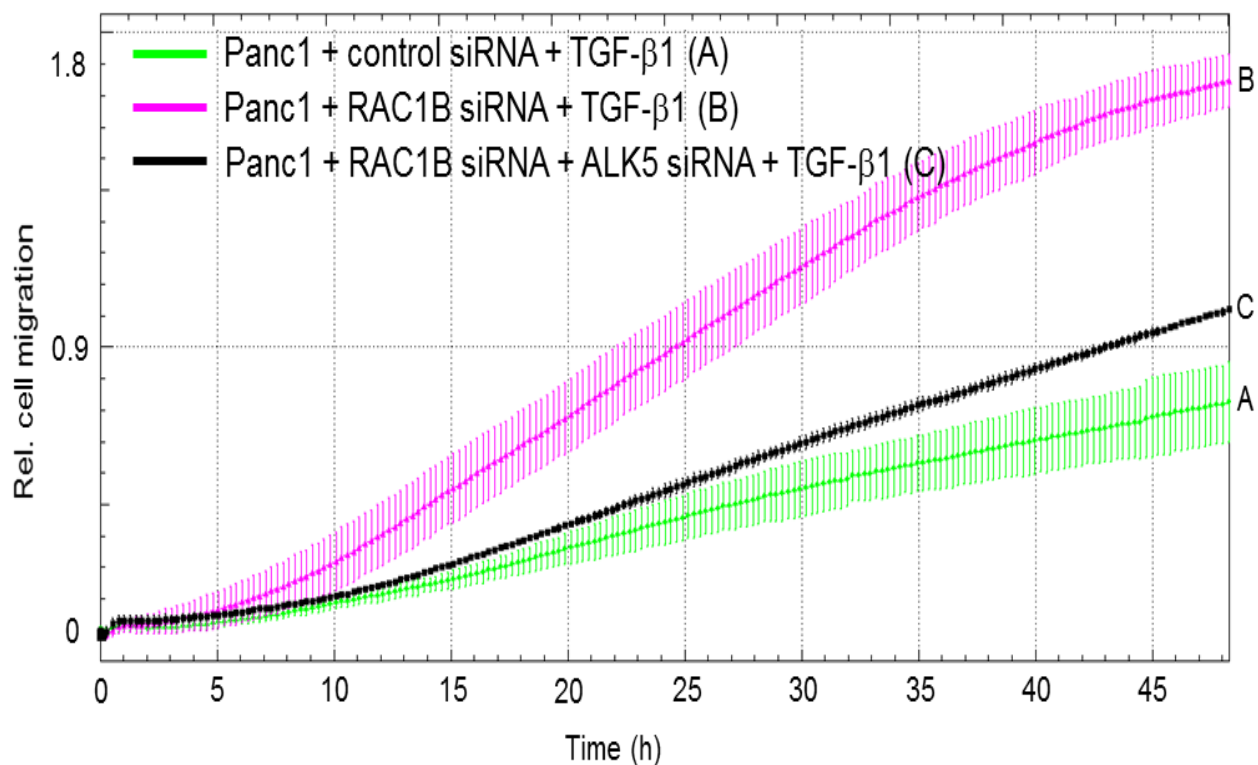
Die Migration dieser kotransfizierten Zellen (Panc-1 + RAC1B siRNA + ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, schwarze Kurve, Spur C) ist dabei im Vergleich zur basalen Migrationsfähigkeit der Kontrollzellen (Panc-1 + control siRNA + TGF $\beta$ -1, grüne Kurve, Spur A) marginal erhöht.

Die quantitativen Migrationsunterschiede zwischen Panc-1 + RAC1B siRNA + ALK5 siRNA + TGF- $\beta$ 1, (Abbildung 11, schwarze Kurve, Spur C) und Panc-1 + RAC1B

siRNA + TGF- $\beta$ 1 (Abbildung 11, magentafarbene Kurve, Spur B) werden ab dem Zeitpunkt 7 Stunden nach Start und zu allen folgenden Messzeitpunkten des Migrationsassays statistisch signifikant.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment deutlich, dass bei Kotransfektion der PANC-1-Zellen mit siRNA von Rac1b *und* ALK5 der TGF- $\beta$ 1-induzierte, migrationsfördernde Effekt der Rac1b-Depletion in den Tumorzellen durch Ausschalten der ALK5-Kinase signifikant gedämpft, ja sogar aufgehoben, wird.

Die dargestellten und beschriebenen Daten führen zu der Schlussfolgerung, dass eine erhöhte Expression und adäquate Funktionstüchtigkeit der ALK5-Kinase eine entscheidende Rolle spielt, die TGF- $\beta$ 1-induzierte Chemokinese der Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen weiter zu verstärken.



**Abbildung 11: Einfluss des ALK5 - Silencing auf die durch TGF- $\beta$ -induzierte Migration in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.** Dargestellt ist die mittels xCELLigence analysierte Migrationsaktivität von PANC-1- Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 48h eines repräsentativen Experiments. Die Zellen wurden nach Transfektionsprotokoll an zwei aufeinander folgenden Tagen mit 50nM entweder einer Kontroll-(siCo), 25nM Rac1b siRNA + 25nM siCo siRNA oder 25nM Rac1b siRNA + 25nM ALK5 siRNA transfiziert. 48h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen für den Migrationsassay aufbereitet und dem Echtzeit-Zell-Migrationsassay zugeführt. Unmittelbar vor dem Start des Migrationsassays erhielten die Hälfte der Proben 5ng/ml TGF- $\beta$ 1. Der *cell index* korreliert mit der Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit von der oberen Kammer der CIM-16 Platte in die untere, durch eine poröse Membran von der ersten Kammer getrennte Kammer migrieren. Der dargestellte Migrationsassay stammen aus einem repräsentativen Experiment und stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-4 unterschiedlich analysierten Wells dar.

### **3.4 Expression von Smad7 in Rac1b-depletierten, mit TGF- $\beta$ stimulierten bzw. unstimulierten PANC-1-Zellen**

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob Rac1b seine inhibitorischen Effekte auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade auch durch andere Signalmoleküle bzw. Effektoren bewirkt.

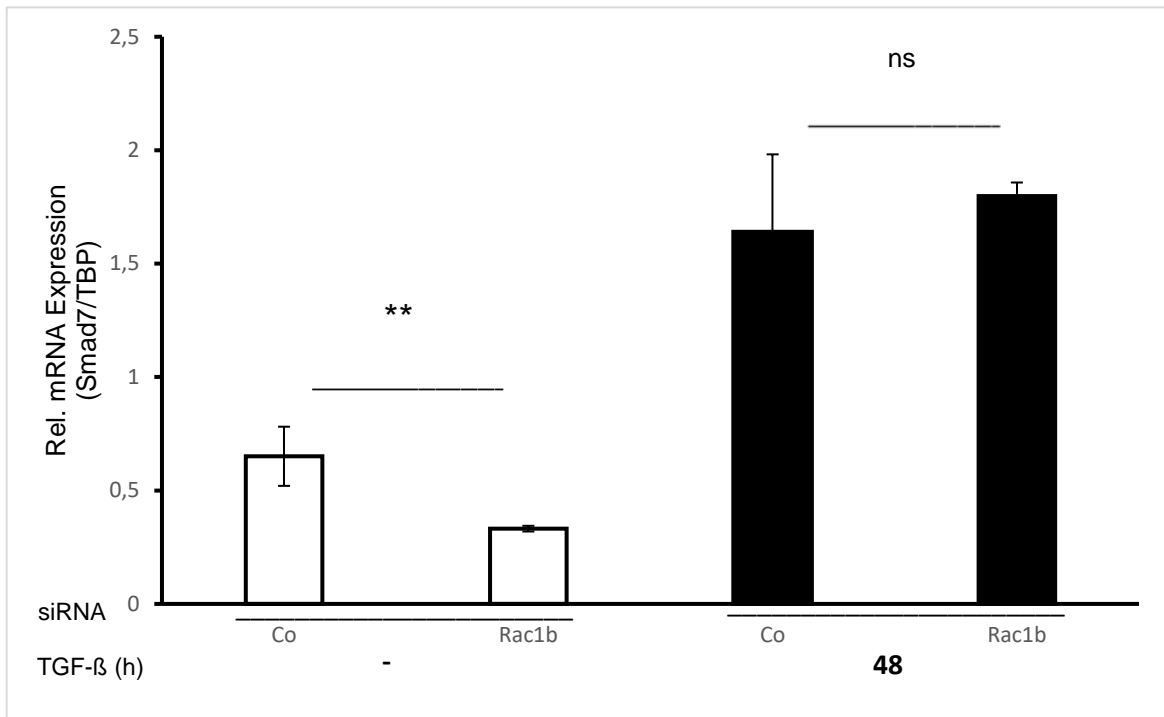
Das I-Smad-Protein *Smad7* fungiert als zentraler Regulator der TGF- $\beta$ -Signalkaskade und inhibiert diesen Signalweg direkt durch Bindung an ALK5 und Blockierung der Smad2/3-Phosphorylierung und indirekt durch eine Verstärkung der Ubiquitin-vermittelten Degradierung von ALK5 (Tang et al., 2018). Ziel war die Evaluation, inwiefern SMAD7 von Rac1b für dessen hemmenden Effekten auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade beeinflusst wird.

Daher soll im Folgenden die Wirkung der Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen auf die Expression von Smad7 untersucht werden. Für diesen Zweck wurden PANC-1 Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit siCo und siRac1b transfiziert. Die Hälfte der Proben wurde mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert und die andere Hälfte wurde unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Smad7 mRNA-Menge in der qPCR nach Normalisierung der Messdaten auf das TBP.

Bemerkenswerterweise kam es nach Rac1b-Depletion der Zellen zu einem deutlichen Abfall der Smad7-mRNA-Menge (Abbildung 12). Dieser Abfall war statistisch signifikant (\*\*,  $p < 0,01$ ).

In den Proben der für 48h stimulierten Zellen kam es nach Rac1b-Silencing zu einem Anstieg der Smad7-mRNA, der sich hinsichtlich der unstimulierten als statistisch nicht signifikant erwies (Abbildung 10, ns). Eine längerfristige Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 scheint keinen starken Einfluss zu haben.

In Zusammenschau mit den vorherigen Ergebnissen beeinflusst Rac1b damit bemerkenswerterweise positive Regulatoren des TGF- $\beta$ -Signalweges wie ALK5 negativ, und fördert auf der anderen Seite inhibitorische Faktoren wie Smad7. Rac1b steuert damit ganz unterschiedliche Regulatoren des TGF- $\beta$ -Signalweges in einer solchen Weise, dass diese zu einer Hemmung der TGF- $\beta$ -Wirkungen führen.



**Abbildung 12: Expression von SMAD7 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen.** Dargestellt sind die Ergebnisse der mittels qPCR analysierten mRNA-Expression von Smad7. Die Proben wurden nach Transfektionsprotokoll an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Kontroll (Co)-, und Rac1b siRNA transfiziert. 48h nach der zweiten Transfektion erfolgte 48h lang die Stimulation der Proben mit 5ng/ml TGF-β1 (- TGF-β1 weißer Balken, + TGF-β1 schwarzer Balken). Jede Probe wurde doppelt analysiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung nach Anpassung der Messdaten auf TBP ( $\Delta\Delta$  Ct-Werte der qPCR). Sich statistisch signifikant (T-Test) unterscheidende Proben wurden mit „\*\*“ ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet. ns, nicht signifikant.

## 4. Diskussion

Das PDAC ist ein hochaggressiv wachsender Tumor mit einer ausgesprochen schlechten Prognose. In westlichen Industrienationen rangiert er auf dem viert-höchsten Platz hinsichtlich Tumor-assoziiierter Todesursachen, wobei die Prävalenz steigend ist (Adamska et al., 2017). Die durchschnittliche fünf Jahresüberlebensrate von unter 5% ist dem Umstand geschuldet, dass das PDAC in den allermeisten Fällen in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, wenn die neoplastischen Zellen bereits metastasiert sind (Schneider et al., 2005). Die therapeutischen Strategien haben daher häufig eine palliative Intention; sie implizieren neben einer operativen Resektion, Strahlen- und Chemotherapie, auch den Einsatz der Immuntherapie. Langezeit stellte das Zytostatikum Gemcitabin den einzig wirkungsvollen pharmakologischen Therapieansatz in der Behandlung von Neoplasien des Pankreas dar. Mittlerweile kommen zusätzlich in Kombination sog. *biologicals* wie der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib, der speziell in Tumorgenese-fördernde Signalwege eingreift zum Einsatz (Moore et al., 2007). Dennoch brachte die Verwendung von *targeted therapies*, gerichtet gegen spezifische tumor-fördernde molekulare Signalwege, bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Adamska et al., 2017). Der TGF- $\beta$ -Signalweg ist als einer von vier maßgeblich an der PDAC-Entstehung beteiligten Signalkaskaden identifiziert worden und ist im Tumorgewebe überexprimiert (Jones et al., 2008; Goggins et al., 1998). Da er zwar hemmend auf Proliferation, aber fördernd auf Migration, Metastasierung und EMT-Induktion wirkt, ist das exakte Verständnis des TGF- $\beta$ -Signalweges immens wichtig zur zielgerichteten Therapie des PDAC oder auch anderer maligner Neoplasien, bei denen dieser Signalweg in der Pathogenese eine Rolle spielt. Nur durch genaue Kenntnis der an der Pathogenese beteiligten intrazellulären Signalverarbeitung, molekularen Mechanismus und spezifischer Zielproteine, gelingt es, therapeutisch nutzbare Angriffspunkte zu detektieren und zu etablieren.

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, den molekularen Wirkmechanismus der hemmenden Wirkung von Rac1b auf die TGF- $\beta$ -abhängige Signaltransduktion im PDAC näher zu untersuchen. Da Rac1b den TGF- $\beta$ -Signalweg auf einer sehr frühen (proximalen) Ebene inhibiert, sind nachgeschaltete Signalkaskaden bis hin zur Genexpression, EMT, Wachstumshemmung und Zellmigration beeinflusst. Auf die Rolle von Rac1b bei der Zellmigration im PDAC richtete sich ein Hauptaugenmerk

dieser Promotion. Wir wollten der Frage nachgehen, an welchen konkreten Punkten bzw. an welchen Signalproteinen Rac1b durch regulierende Effekte negativ in die TGF- $\beta$ -abhängige Signalgebung eingreift. Hierbei geht es v.a. um seinen Effekt auf die ALK5-Regulation und wie Hoch-bzw. Herunterregulationen der ALK5-Expression durch Rac1b zellmigrationsbezogene Prozesse beeinflussen.

Des Weiteren geht es um die Identifikation potenzieller Zielproteine, über die Rac1b möglicherweise seine inhibitorische Wirkung fördert, vermittelt oder aufrechterhält.

#### **4.1 Suffiziente Depletion der Rac1b-Proteinmenge durch RNA-Interferenz**

Um die regulatorischen Effekte von Rac1b hinsichtlich der Hemmung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade näher zu untersuchen, musste via RNAi ein erfolgreiches Ausschalten des für Rac1b kodierenden Gens in PANC-1-Zellen gewährleistet sein („gene silencing“).

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Behandlung der PANC-1-Zellen mit Rac1b-siRNA quantifizierbar zu einem hochsignifikanten Rückgang der Proteinmenge von Rac1b führte (Abbildung 6), sodass verifiziert war, dass die nachfolgend verwendete siRNA von Rac1b ein suffizientes Ausschalten des Zielgens bewirkt.

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass Rac1 antagonistisch auf die TGF- $\beta$ -induzierte Wachstumsinhibition und fördernd auf die Migration von PDAC-Zellen wirkt (Ungefroren et al., 2011). Der in dieser Studie verwendete RNAi-basierte Ansatz (siRNA von Rac1) führte neben der Rac1-Depletion auch zu einer Co-Depletion der Rac1b-mRNA-Transkripte. Die damals beobachteten Effekte lassen sich somit nicht allein Rac1 zuordnen und es wurde nicht zwischen den Effekten von Rac1 und Rac1b unterschieden (Heid et al., 2011). Rac1b ist in PDAC-Zellen im Vergleich zu gesundem Pankreasgangepithel schwächer exprimiert. Ferner besteht eine positive Korrelation zwischen verstärkter Rac1b-Expression in Karzinomen und einer verlängerten Überlebenszeit (Ungefroren et al., 2014). Die in dieser Arbeit verwendete spezifische siRNA, gerichtet gegen die Sequenz des vom Exon 3b in *RAC1* abgelesenen Teils der Rac1b-mRNA, erlaubte es, die regulatorischen Effekte von Rac1b auf den TGF- $\beta$ -Signalweg zu untersuchen.

Zur Bestätigung RNAi-basierter Ergebnisse und um die TGF- $\beta$ -abhängigen zellulären Reaktionen in einem Rac1b-freien Hintergrund zu untersuchen, wurde in einer

weiteren Arbeit mit Hilfe der sog. CRISPR/Cas9-Technologie (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; beschrieben in Mihara et al., 2016) in PANC-1-Zellen das Exon 3b von *RAC1* gelöscht. In diesen sog. „PANC-1-Rac1b-KO-Zellen“ war eine Rac1b-Proteinexpression im Western Blot und eine mRNA-Expression in der qPCR nicht detektierbar; schlussfolgernd auf ein suffizientes, vollständiges Auslöschen der Genantwort. Dies stand im Kontrast zu dem Rac1, dessen Protein und mRNA-Expression in den Kontroll- und in den PANC-1-Rac1b-KO-Zellen messbar war (Ungefroren et al., 2019).

Im Gegensatz dazu behielten die in dieser Arbeit verwendeten, durch siRac1b-transfizierten Zellen, trotz suffizienter Rac1b-Depletion von mehr als 80%, eine endogene Rac1b-Restexpression. Diese relative endogene Rac1b-Proteinexpression in den siRac1b-behandelten Zellen betrug 19%, im Vergleich zu den Kontrollzellen siCo (Abbildung 6).

## **4.2 Gen-Silencing von Rac1b erhöht die ALK5-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene**

In diversen Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe Rac1b als potenten Inhibitor des TGF- $\beta$ -Signalweges identifizieren: Rac1b hemmt die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration von PDAC-Zellen, indem es die Aktivierung von Smad3 (Ungefroren et al., 2014) und der MAPK-Kinasen p38 und ERK hemmt (Witte et al., 2017) und wirkt somit als funktioneller Antagonisten gegenüber Rac1. Diese antagonistische Eigenschaft wurde ebenfalls in Zellen des Mammakarzinomes (Melzer et al., 2017) und Zervixkarzinomes beschrieben (Nimnual et al., 2010).

Überwiegend an der Membran lokalisiert bildet Rac1b in Mammakarzinomzellen von Mäusen, durch MMP3 induziert, einen Komplex mit NOX und fördert die Produktion von ROS, sowie die Expression von Snail, einem EMT-assoziierten Transkriptionsfaktor. Dieser ist sowohl an der physiologischen als auch pathologischen EMT beteiligt (Radisky et al., 2005; Stallings-Mann et Radisky, 2007; Lee et al., 2012;). Somit spielt Rac1b eine zentrale Rolle in einem mechanotransduktiven Signalweg der epithelialen Formbarkeit bzw. Veränderung (Lee et al., 2012).

In Vorarbeiten von Prof. Ungefroren wurde die durch TGF- $\beta$ -induzierte EMT in PDAC-Zellen untersucht. Erstaunlicherweise spielt Rac1b dabei eine inhibitorische Rolle. Die spezifische Rac1b-siRNA, erlaubte es, in den PDAC-Zelllinien *PANC-1*

und COLO 357 die Effekte von Rac1b auf die EMT zu untersuchen. Deutlich konnte gezeigt werden, dass Rac1b die TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung der Smad-unabhängigen MAP-Kinasen p38 und ERK, die zwei wichtige Komponenten der TGF- $\beta$ -vermittelten EMT darstellen, hemmt. Rac1b-depletierte PANC-1-Zellen wuchsen nach 48h Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 weniger dicht und zeigten eine stärker fibroblastenartige Morphologie als die mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Kontrollzellen. Ferner wurden nach Rac1b-Knockdown die Expression der EMT-fördernden Transkriptionsfaktoren Slug und Snail gesteigert. Dagegen war die Expression von E-Cadherin vermindert. Diese Effekte wurden nach Inhibition von p38 MAPK und ERK aufgehoben. Dies führt zu dem Schluss, dass Rac1b die TGF- $\beta$ -vermittelte EMT unterdrückt, indem es die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und ERK inhibiert (Witte et al., 2017). Im Prozess der EMT wirkt Rac1b somit dichotom, d.h. in Abhängigkeit vom Gewebe- und dem Effektormolekül (MMP3/TGF- $\beta$ ) entweder als Induktor oder Inhibitor (Melzer et al., 2019; Abbildung 2).

Die hohe Diversität der durch Rac1b vermittelten TGF- $\beta$ -abhängigen Zellantworten wie bspw. EMT oder Chemokinese/Zellmigration lässt einen proximalen Angriffspunkt des G-Proteins Rac1b auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade vermuten: Unser Ziel war es also die mechanistische Grundlage der hemmenden Wirkung von Rac1b näher zu untersuchen. Als potenzielles Angriffsziel vermuteten wir regulatorische bzw. inhibitorische Effekte von Rac1b auf ALK5, der als membranassoziierter Rezeptor am Anfang potenzieller intrazellulärer Signalvermittlungen steht.

Zur Untersuchung des Expressionslevels von ALK5 kamen mit dem Western Blot und der qPCR zwei gängige Verfahren zur Bestimmung der relativen Menge an Protein bzw. mRNA zum Einsatz. Eindrucksvoll beobachteten wir sowohl eine erhöhte mRNA- als auch Proteinexpression von ALK5 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass die gesteigerte Expression von ALK5 und die damit verbundene Zunahme der Kinase-Aktivität des Rezeptors verantwortlich sind, für eine erhöhte Empfindlichkeit der PANC-1-Zellen gegenüber TGF- $\beta$ 1-vermittelten, nachfolgenden Zellantworten. Diese der TGF- $\beta$ -Signalkaskade folgenden Effekte konnte mein Doktorvater bereits in einigen Publikationen verifizieren: So konnte in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen bereits in vergangenen Arbeiten eine erhöhte basale und Liganden-abhängige Phosphorylierung der ALK5-Substrate Smad3 (Ungefroren et al., 2014) sowie MKK6-p38 und MEK-ERK1/2 (Witte et al., 2017) festgestellt werden. Eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen für

TGF- $\beta$ -abhängige, intrazelluläre Signalkaskaden und die damit verbundenen Effekte wie EMT und Zellmigration könnten kausal durchaus auf eine erhöhte ALK5-Expression zurückzuführen sein.

In einer Publikation, die Ergebnisse dieser Promotion beinhaltet, wurden die Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen (*knockdown of Rac1b*; KD Zellen) mit genomisch durch CRISPR/Cas9-Technologie veränderten PANC-1-Zellen (*knockout of Rac1b*; KO Zellen), die keine Rac1b-Restmenge mehr enthielten, hinsichtlich ihrer ALK5 mRNA- und Proteinexpression verglichen: Während die Proteinmenge von ALK5 in den Rac1b KD Zellen um das 1,6fache anstieg, ließ die zusätzliche Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 bzgl. einer weiteren Expressionserhöhung jedoch statistische Signifikanz vermissen (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu, zeigten die Rac1b KO Zellen auch nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung einen starken Anstieg der ALK5-Proteinmenge, v.a. auch im Vergleich zu den Vektorkontrollzellen (Ungefroren, Otterbein et al., 2019). Betrachtet man die Regulation der ALK5-mRNA-Menge, so zeigten die Rac1b KO Zellen ebenfalls eine gesteigerte Expression von ALK5 nach TGF- $\beta$ -Stimulation sowohl im Vergleich zu den Kontrollzellen als auch im Vergleich zu den stimulierten Rac1b-KD Zellen. Die ALK5-mRNA- und Proteinmenge war ebenfalls in der PDAC-abgeleiteten Zellen COLO 357 erhöht, nach Transfektion mit siRac1b (Ungefroren, Otterbein et al., 2019).

Die Steigerung der ALK5-mRNA und Protein-Quantität war in PANC-1-Rac1b KO Zellen stärker als in PANC-1-Rac1b KD Zellen. Zwar konnte nach 12h- und 24h TGF- $\beta$ 1-Behandlung keine weitere TGF- $\beta$ 1-induzierte Zunahme der Proteinhäufigkeit von ALK5 in PANC-1-Rac1b KD Zellen beobachtet werden (Abbildung 7; *ns*), jedoch stieg diese bei den PANC-1-Rac1b KO Zellen nach TGF- $\beta$ -Stimulation stark an (Figure 1B \*\*; aus Ungefroren, Otterbein et al., 2019). Dies unterstützt die Annahme, dass bei einem vollständigen Verlust von Rac1b in den Zellen die Sensitivität von ALK5 für eine TGF- $\beta$ 1-Stimulation erhöht wird.

Die Beobachtung der ALK5-Proteinerhöhung durch Rac1b-Silencing ist auch vor dem Hintergrund interessant, da bekannt ist, dass Tumorzellen die Expression ihrer membranassoziierten Rezeptoren (bspw. ALK5 in PANC-1-Zellen) verändern können, um die Sensitivität der Zellen ggü. TGF- $\beta$ 1 zu modulieren.

Bspw. untersuchen Herhaus und Sapkota in einem Review die Regulation der Proteinkomponenten der TGF $\beta$ /BMP-Signaltransduktionswege durch Ubiquitylierung und Deubiquitylierung durch sog. Deubiquitylierende Enzyme (DUBs). In den letzten

15 Jahren haben umfangreiche Forschungsarbeiten zur Entdeckung und Charakterisierung mehrerer E3-Ubiquitin-Ligasen geführt, die den TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg beeinflussen (Herhaus et Sapkota, 2014). Die Modifikation sowie Expressions- bzw. Quantitätsveränderung von ALK5 kann sich dementsprechend über mehrere Wege vollziehen und hat eine hohe Relevanz auf die Aktivität der TGF- $\beta$ -Signalkaskade und die Sensitivität der PDAC-abgeleiteten Zellen auf die TGF- $\beta$ -Stimulation. Unabhängig von dem genauen Wirkmechanismus von Rac1b auf die ALK5-Menge, scheint Rac1b bereits an einem sehr proximalen Punkt entscheidend inhibitorisch auf die TGF- $\beta$ -Signalkaskade einzuwirken.

Die erhöhte ALK5-Expression nach Rac1b-Silencing im Vergleich zu Kontrollzellen ist möglicherweise mit einer verbesserten Signalwirkung mit Beteiligung der Smad-Proteine durch TGF- $\beta$  assoziiert: Die Ergebnisse einer in dieser Arbeitsgruppe entstandenen Publikation belegen, dass Rac1b KO PANC-1-Zellen die TGF- $\beta$ 1-induzierte C-terminale Phosphorylierung von Smad3 (und damit dessen Aktivierung) steigern. Ferner kommt es zur Verstärkung der transkriptionellen Aktivität, Wachstumshemmung und Zellmigration. Darüber hinaus wurden die Migrationsraten von Rac1b KO- und Rac1b KD Zellen von PANC-1-Zellen verglichen: Die Rac1b KO Zellen (mit nicht detektierbarer Protein/-und mRNA-Menge) migrierten signifikant stärker als die Rac1b KD Zellen (mit einem 19%-igen Rest-Expressionslevel von Rac1b, Abbildung 6). Kohärent zu den Daten dieser Promotion kann daraus geschlossen werden, dass Rac1b in Abhängigkeit von der Dosis die ALK5-Expression und als Konsequenz die Smad3-Aktivierung und die Smad3-assoziierten Zellantworten kontrolliert.

### **4.3 ALK5-Kinaseaktivität ist erforderlich für den siRac1b-induzierten Anstieg der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration in PANC-1-Zellen**

Anhand des dargestellten Graphen konnte deutlich gemacht werden, dass das Rac1b-Silencing zu einem migrationsfördernden Effekt der PANC-1-Wildtyp-Zellen führt. In diversen Vorarbeiten ist bereits herausgearbeitet worden, dass Rac1b die TGF- $\beta$ -induzierte Zellmigration hemmt, indem es die Aktivierung von Smad3 (Ungefroren et al., 2014) und den MAP-Kinasen p38 und ERK verhindert (Melzer et al., 2017; Witte et al., 2017).

Ziel war es nun zu verifizieren, ob die durch Rac1b-vermittelte Hochregulation von ALK5 auf Protein- und mRNA-Ebene ein tatsächlicher Grund für die verstärkte Migration der Tumorzellen darstellt. Die Alternativhypothese wäre, dass die Verringerung der ALK5-Menge durch Rac1b lediglich ein Epiphänomen darstellt und keine kausale Rolle in der Negativregulation des TGF- $\beta$ -abhängigen Signals einnimmt. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass PANC-1-Zellen, die eine dominant-negative Mutante von ALK5 (ALK5-K232R) exprimieren, die TGF- $\beta$ -induzierte Hochregulation von phospho-p38 in Rac1b-depletierten PANC-1-Zellen verhindert (Witte et al., 2017). Da sowohl die Aktivität der ALK5-Kinase als auch die p38 -Aktivierung für die TGF- $\beta$ 1-induzierte Migration benötigt werden (Witte et al., 2017), wurde angenommen, dass dementsprechend die Expression einer ektope ALK5-KR-Mutante die Rac1b-depletierten-PANC-1-Zellen-abhängige Erhöhung der Zellmigration abschwächt. Um diese Vermutung zu evaluieren, wurden PANC-1-Zellen verwendet, die ALK5-K232R stabil retroviral exprimieren, sodass in diesen Zellen lediglich die Serin-/Threoninkinaseaktivität inaktiviert ist (Schniewind et al., 2007).

Eindrucksvoll wurde in diesem Versuch mit dem bewährten Zellmigrations-Assays xCELLigence DP-System gezeigt, dass der Effekt der Erhöhung der Migrationsfähigkeit nach Rac1b-Depletion in den ALK5-K232R-transduzierten Zellen wieder aufgehoben wurde (Abbildung 9).

Darüber hinaus konnte in der Publikation von Ungefroren, Otterbein et al. aus dem Jahr 2019 gezeigt werden, dass sehr ähnliche Daten mit COLO 357-Rac1b KD Zellen erhalten wurden, die mit dem ALK5 Kinase-Inhibitor *SB431542* behandelt wurden: So wurde auch in den COLO 357-Rac1b KD Zellen ohne pharmakologischen Inhibitor eine verstärkte Migration der Zellen detektiert. Die gesteigerte Migrationsfähigkeit wurde durch Behandlung der Zellen mit SB431542 gedämpft (Ungefroren, Otterbein et al., 2019 in supplementary material, Figure 3).

In derselben Publikation wurden ebenfalls die bereits erwähnten Rac1b-depletierten- KO Zellen verwendet, die ebenfalls mit der inaktivierten Kinasedomäne ALK5-K232R transfiziert wurden. Auch in diesen Versuchen zeigte sich, dass die Expression einer ektope ALK5-KR-Mutante den Effekt der Rac1b KO Zellen-abhängigen Erhöhung der Zellmigration deutlich abschwächte (Ungefroren, Otterbein et al., 2019).

Sofern eine erhöhte ALK5-Kinaseaktivität, assoziiert mit einer erhöhten ALK5-Proteinexpression, tatsächlich verantwortlich für eine Rac1b KD/KO- vermittelten Steigerung der TGF- $\beta$ 1-abhängigen Zellmigration in PANC-1-Zellen ist, würde eine ektope Expression einer dauerhaft aktiven ALK5-Kinase in PANC-1-Zellen diesen Effekt nachahmen. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe PANC-1-Zellen mit einer konstitutiv-aktiven ALK5 Mutante, die sog. *ALK5-T204D* (ALK5-TD) transfiziert. Bemerkenswerterweise waren die ALK-TD-transfizierten PANC-1-Zellen (ohne begleitenden Rac1b- „Knockdown“ oder „Knockout“) in der Lage, die Migrationsfähigkeit der PANC-1-Zellen im Vergleich zu Leervektor-Zellen deutlich zu steigern (Ungefroren, Otterbein et al., 2019).

Die *ALK5-TD*-Mutante wurde bereits 2007 in einer von Schniewind et al. veröffentlichten Publikation verwendet. Dabei zeigte sich u.a., dass dominant-negative Mutanten TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ 1/ALK5 oder Typ 2 in TGF- $\beta$ -sensitiven PDAC-abgeleiteten PANC-1-Zellen die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivierung von transfizierten Smad-reaktiven Reportergenen und die Wachstumshemmung verhinderten. Die wachstumshemmende Wirkung in den PANC-1-Zellen wurde durch die konstitutiv aktive ALK5-T204D nachgeahmt. Dieser Effekt war abhängig von der Fähigkeit von ALK5, die Smad-Signaltransduktionskette zu aktivieren, da eine weitere ALK5-Mutante namens RImL45 mit intakter Kinase-Domäne aber defizienter Fähigkeit Smad-Proteine zu aktivieren, nicht in der Lage war, das Zellwachstum zu unterdrücken (Schniewind et al., 2007).

Im Vorfeld der Arbeit bestand die Alternativhypothese, dass die ALK5-Verringerung durch Rac1b eher ein Epiphänomen darstellt, anstatt kausal an der negativen Regulierung der TGF- $\beta$ -Signalgebung beteiligt zu sein. Wir versuchten daher die funktionelle Rolle von ALK5 speziell in der TGF- $\beta$ -induzierten Zellmigration zu untersuchen, um eine kausale negativregulierende Wirkung näher zu differenzieren. Wir konnten zeigen, dass Rac1b sowohl die ALK5-mRNA- als auch die Proteinexpressionsmenge verringert (Abbildung 7 und 8) um die TGF- $\beta$ -induzierte Chemokinese zu hemmen. Die damit einhergehende Abnahme der ALK5-Kinase-Aktivität ist diesbezüglich von großer Bedeutung. Dieser Aspekt wurde verstärkt, durch den Nachweis, dass ektope Expression der Serin/Threoninkinaseaktivität-Kinase-inaktivierten ALK5-KR-Mutante in PANC-1-Rac1b KD Zellen (Abbildung 9) und PANC-1-Rac1b KO Zellen oder die SB431542-Behandlung von COLO 357-Rac1b KD Zellen

(Ungefroren, Otterbein et al., 2019) die siRac1b-induzierte Zunahme der Migrationsaktivität deutlich abschwächte.

Auf der anderen Seite zeigte sich, dass bei der Überexpression von ALK5-TD in PANC-1-Zellen die Zugabe eines TGF- $\beta$  Liganden und/oder die Depletion von Rac1b nicht notwendig war, um die Zellmigration in diesen Zellen zu steigern (Ungefroren, Otterbein et al., 2019, supplementary material). Die dargestellten Daten im Vergleich mit weiteren Publikationen demonstrieren deutlich, dass die Erhöhung der ALK5-Menge und die Steigerung der ALK5-Kinaseaktivität kein Epiphänomen darstellt. Dies konnte an der Verringerung des durch siRac1b-induzierten Anstieg der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration in PANC-1-Zellen mittels der inaktivierten Serin/Threoninkinaseaktivität der ALK5-KR232-Mutante verdeutlicht werden. Der hemmende Einfluss von Rac1b auf die ALK5-Menge stellt eine zentrale und voraussichtlich kausale Rolle in der Negativregulation der TGF- $\beta$ -abhängigen Zellmigration dar.

#### **4.4 Reduktion der ALK5-Proteinmenge supprimiert die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigrations-Erhöhung in PANC-1-Zellen**

Konkludent zur vorherigen Versuchsreihe (Abbildung 9) zeigte nun Versuchsreihe Abschnitt 3.3.2, dass die siALK5-Behandlung der PANC-1-Wildtyp-Zellen eine signifikante Reduktion der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration unterhalb des Niveaus der (Leervektor-) Kontrollzellen evozierte (Abbildung 10).

In einem parallelen Versuchsaufbau unter der Verwendung von COLO 357 Zellen konnten kohärente Ergebnisse gezeigt werden: Auch hierbei zeigte sich das stärkste Migrationsverhalten bei den mit TGF- $\beta$ -stimulierten Kontrollzellen, während im Vergleich dazu, die Migrationsfähigkeit nach ALK5-Silencing deutlich reduziert wurde. Hierbei konnte ebenso unter den siALK5 behandelten Zellen eine leichte Erhöhung der Zellmigration nach TGF- $\beta$ -Stimulation festgestellt werden (Ungefroren, Otterbein et al., 2019; supplementary material, S3).

Dies unterstreicht die essenzielle Wichtigkeit von ALK5 auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigration: Wird die ALK5- Expressionsmenge mittels RNAi depletiert, reduziert sich die Migrationsaktivität der Zellen deutlich, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1. Die ausreichende Anwesenheit und die adäquate Funktion von

ALK5 scheint wie in dem vorausgegangenen Experiment für die TGF- $\beta$ 1-abhängige Signaltransduktion bzw. Zellmigration notwendig zu sein.

Dennoch bewirkt eine ektope Stimulation der PANC-1- (und COLO 357-) Zellen mit TGF- $\beta$ 1 eine Verstärkung der aufgrund defizienter ALK5-Menge reduzierten Migrationsfähigkeit. Dabei wird jedoch deutlich das Migrationsniveau der stimulierten Kontrollzellen unterschritten. Dies suggeriert zum einen, dass durch die Zugabe von ektopem TGF- $\beta$ 1 (bzw. von der Zelle intrinsisch produziertem TGF- $\beta$ 1) die malignen Zellen eine inadäquate Menge oder das Fehlen von ALK5 zumindestens teilweise kompensieren können. Und zum anderen wird erneut die hohe Relevanz der funktionalen Rolle eines intakten ALK5 als proximaler, membranständiger Fixpunkt der TGF- $\beta$ -Signalkaskade deutlich.

#### **4.5 Depletion der ALK5-Proteinmenge supprimiert die TGF- $\beta$ -vermittelte Zellmigrations-Erhöhung durch Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen**

Die in dieser Versuchsreihe durchgeführte erstmalige *Kotransfektion* von siRac1b und siALK5 in PANC-1-Zellen sollte Evidenz erbringen, dass die Hochregulation der ALK5-Menge ebenfalls verantwortlich für den Rac1b-Silencing-vermittelten Anstieg der TGF- $\beta$ -abhängigen Zellmigrationsfähigkeit ist.

Kohärent zu der Versuchsreihe aus Abschnitt 3.3.2 wurde auch bei dieser Versuchsreihe der erhöhte Migrationseffekt durch Rac1b-Depletion durch die Kotransfektion mit siRNA von ALK5 stark reduziert (Abbildung 11).

Die migrationsbezogene Restaktivität bei den Rac1b-depletierten-PANC-1-Zellen mit RNAi-basiertem Ausschalten von ALK5 lag höher als bei der Transfektion der Zellen mit der ALK5-Mutante KR232, bei denen eine komplette Abwäsung der Migrationsrate detektiert wurde (Abbildung 9). Die Rac1b- und ALK5-depletierten PANC-1-Zellen behielten eine migratorische Restaktivität, die über dem basalen Niveau der TGF- $\beta$ 1-stimulierten Kontrollzellen lag (Abbildung 11).

Die zellulären TGF- $\beta$ -Wirkungen werden durch zwei Rezeptoren vermittelt, die vorwiegend Serin-/Threoninkinaseaktivität aber auch Tyrosinkinaseaktivität (Lee et al., 2007; Heldin et al., 2016) besitzen.

Ein Ausschalten nur der Serin-/Threoninkinaseaktivität wie dies bei der ALK5-K232R-Mutante durchgeführt wurde, führt zur Stagnation jeglicher Migrationsfähigkeit. Dies lässt Rückschlüsse auf die an der Migrationskontrolle beteiligten Kinase-Domänen von ALK5 zu: Eine solitäre Tyrosinkinasedomäne -Aktivität kann diesen Funktionsausfall der anderen beiden Kinasen nicht kompensieren und die Migration der TGF- $\beta$ -1-stimulierten PANC-1-Zellen wird gänzlich abgeschwächt (Abbildung 9).

Auf der anderen Seite führt die Kotransfektion von siRac1b und siALK5 zu einer starken Reduktion der Migrationsfähigkeit, jedoch nicht zur kompletten Abschwächung. Dies suggeriert, dass die Zunahme der ALK5-Expression zu mindestens teilweise für die erhöhte TGF- $\beta$ 1-induzierte Chemokinese in Rac1b-defizienten Zellen verantwortlich ist.

Wie dargestellt, kann Rac1b bereits an einem sehr frühen und entscheidenden Punkt der TGF- $\beta$ -Signalgebung hemmend auf den Signalweg einwirken: die Vermutung wurde bestätigt, dass Rac1b bereits auf der Ebene des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes eingreift. Die Depletion von Rac1b führt zu einer gesteigerten Expression von ALK5, sowohl von Protein als auch mRNA (Abbildung 7 und 8). Dies legt nahe, dass die hemmende Wirkung von Rac1b auf den TGF- $\beta$ -Signalweg durch eine Verringerung der ALK5-Menge zu Stande kommt. Dies konnte in dieser Arbeit deutlich am zellulären Vorgang der Migration bzw. Chemokinese demonstriert werden. Die Menge an ALK5 von einer Zelle, kann dementsprechend in ihrer Quantität durch Rac1b verändert werden. Die Reduktion der ALK5-Komplexmenge durch Rac1b korreliert demnach mit der Stärke der TGF- $\beta$ -Signalgebung und der zellulären Reaktionsfähigkeit. Somit besitzt der ALK5-vermittelte Rac1b-Rückgang einen bedeutenden Einfluss auf die TGF- $\beta$ -Tumorbiologie (Liu et al., 2009). Der Ligenabhängige-aktivierte Rezeptorkomplex setzt nachfolgend intrazelluläre Signalgebungen in Gang, die in Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signawege differenziert werden. Rac1b inhibiert die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, die entscheidend an der TGF- $\beta$ 1-vermittelten EMT und Zellmigration beteiligt sind. Die RNAi basierte Depletion von Rac1b führte zur verstärkter EMT und migratorischer Aktivität aller PDAC-abgeleiteten Zelllinien, eine gleichzeitige Inhibition von p38 und MAPK konnte diesen Effekt wieder aufheben (Witte et al., 2017). Dies ist kohärent zu den vorliegenden Daten, dass die dargelegte Kodepletion von ALK5 die siRac1b-

induzierte Migrationssteigerung der TGF- $\beta$ 1-stimulierten PANC-1-Zellen deutlich abschwächt.

Rac1b beeinflusst auf direktem Weg hemmend auch Smad-Proteine. Es wirkt inhibitorisch auf die Zellmigration, indem es Smad3 funktional blockiert (Ungefroren et al., 2014). Rac1b KO PANC-1-Zellen ohne Rac1b-Restaktivität erhöhen die TGF- $\beta$ 1-induzierte C-terminale Phosphorylierung der Smad3-Phosphorylierung, sowie Smad3-bezogene transkriptionelle Aktivierung, Wachstumshemmung und Zellmigration (Ungefroren, Otterbein et al., 2019). Die Veränderungen der erhöhten Smad3-bezogenen zellulären Wirkungen könnten auf eine ALK5-Proteinerhöhung (durch Rac1b-Silencing) zurückgeführt werden und mit einer damit verbundenen erhöhten Kinaseaktivität. Dies ist eine Annahme, die dadurch unterstützt wird, dass die ektope Expression von ALK5-K232R zur starken Abschwächung der Rac1b KD-induzierten Steigerung der Zellmigration führt sowie zur Hemmung der Hyperphosphorylierung der MAP-Kinase p38 in PANC-1-Zellen (Witte et al., 2017). Eine verlängerte Aktivierungsdauer von p38 bzw. Smad3 kann jedoch vermutlich nicht allein auf quantitative Veränderungen der ALK5-Menge zurückzuführen sein.

#### **4.6 Rac1b-Depletion in PANC-1-Zellen evoziert eine Reduktion der Smad7-mRNA**

Der Ligand TGF- $\beta$ 1 bindet hochspezifisch an die Extrazellulärdomäne des konstitutiv-aktiven T $\beta$ RII (Lin et Wang, 1992), das als Homodimer vorliegt. Bei der Bindung bildet T $\beta$ RII wiederum mit zwei ALK5 Molekülen einen heterotetrameren Komplex (Ehrlich et al., 2012; Massagué, 2012). T $\beta$ RII phosphoryliert die Serin- und Threoninreste von ALK5 und aktiviert diesen Rezeptor. Die Initiierung des Smad-abhängigen Signalweges impliziert die C-terminale Phosphorylierung von Rezeptor-regulierten Smads 2/3 (R-Smads), die Komplexbildung mit Smad4 und die transkriptionelle Regulierung von TGF- $\beta$ -assoziierten Zielgenen.

Ein essenzieller, TGF- $\beta$ -vermittelter intrazelluläre Signalweg wird über die Smad-Proteinfamilie bewirkt. Ein aktivierter ALK5- Rezeptor vermittelt im Folgenden intrazelluläre Prozesse Smad-abhängiger und Smad-unabhängiger Art, und führt u.a. zu einer TGF- $\beta$ /Smad2/3-abhängigen Expressionsinduktion der I-Smad-Proteine Smad6 bzw. Smad7.

Diese I-Smads bewirken über sehr variable Mechanismen eine Hemmung der Wirkungen der TGF- $\beta$ -induzierten Signalkaskade (Singh et al., 2012; Miyazawa et Miyazono, 2017), wobei Smad6 präferiert den BMP-initiierten Smad-Signalweg hemmt, und Smad7 mit dem BMP- und TGF- $\beta$ -induzierten Smad-Signalweg (Miyazawa et Miyazono, 2017) interferiert.

Rac1b stellt ebenfalls einen potenten Negativregulator des TGF- $\beta$ -abhängigen Signalweges dar und spielt wie in dieser Arbeit dargelegt, eine zentrale Rolle in der zellulären Sensitivität in Bezug auf den Rezeptor (Ungefroren et al., 2020). Die mechanistische Grundlage dieses elementaren regulierenden Effektes ist bislang nicht vollständig geklärt. Fest steht jedoch, dass sich die prolongierte Aktivität von p38 MAPK (Witte et al., 2017) und Smad3 (Ungefroren, Otterbein et al., 2019) nicht ausschließlich auf eine veränderte ALK5-Menge zurückführen lassen. Wir postulierten, dass Modifikationen der nachfolgenden Signalwirkungen, wie eine veränderte Regulation von Smad7, ebenfalls in diesen Effekt involviert sind.

Die Daten Abschnitt 3.4. zeigen, dass das Ausschalten von Rac1b mittels RNAi zu einer signifikanten Erniedrigung von Smad7 in TGF- $\beta$ 1-behandelten PANC-1-Zellen führt. Dies lässt den Schluss zu, dass Rac1b seine inhibierende Wirkung auf den TGF- $\beta$ -abhängigen Signalweg u.a. über eine Erhöhung des Negativregulators Smad7 vollzieht.

In Zusammenschau der Ergebnisse und im Vergleich mit der aktuellen Literatur scheint Rac1b durch die diversen negativen Auswirkungen auf die EMT-assoziierte Genexpression, Migration und Wachstumshemmung, sowie bei der Smad- und MAPK-Signalisierung auf zentrale Komponenten des TGF- $\beta$ -Signalweg negativ-regulierend einzuwirken. Bemerkenswerterweise scheint Rac1b die Expression von PAR2, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der von unserer Arbeitsgruppe als essentiell für die Smad-Aktivierung und TGF- $\beta$ 1-abhängige Zellmotilität identifiziert wurde (Zeeh et al., 2016), zu reduzieren. Während einerseits die positiv regulierenden TGF- $\beta$ 1-, ALK5- und PAR2-abhängigen Zielgene alle unter negativer Kontrolle von Rac1b stehen, werden zwei endogene Inhibitoren des TGF- $\beta$ -Signalweges, nämlich Smad7 und BGN (Witte et al., 2017), positiv reguliert. Dies unterstreicht die Bedeutung von Rac1b als stark wirksamer Inhibitor der TGF- $\beta$ -Signalkaskade.

Die Smad7-mRNA-Reduktion in Rac1b-depletierten Kontrollzellen ist kohärent zu den Ergebnissen aus einer Publikation unserer Arbeitsgruppe (Witte et al., 2017). Erstaunlicherweise belegen andere Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe aber

auch, dass es in Rac1b KO PANC-1-Zellen im Zusammenhang mit einer TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu einer starken Erhöhung der Smad7-mRNA-Menge kommt, die die der Kontrollzellen übertraf (Ungefroren et al., 2020). Dies ist wahrscheinlich auf höhere ALK5-Konzentrationen und eine entsprechende Aktivitätssteigerung des Signalwegs zurückzuführen. Auch in dieser Arbeit kam es zu einem Anstieg der Smad7-mRNA nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 12). Die oben beschriebene Entkopplung von Transkription und Translation bei der Reaktion von Smad7 auf die TGF- $\beta$ 1-Stimulation in Rac1b KO Zellen lässt vermuten, dass die Kontrolle der Smad7-Expression und -Funktion durch Rac1b hauptsächlich auf der Ebene der Proteinstabilität erfolgt (Ungefroren et al., 2020). Bei dem RNAi-vermittelte Knockdown von Smad7 kommt es zur Hochregulation der ALK5-Proteinexpression. Dies ist ein kongruenter Effekt zu unserer Beobachtung der siRac1b-vermittelten erhöhten ALK5-Expression. Dies suggeriert, dass Smad7 den inhibitorischen Effekt von Rac1b auf die ALK5-Proteinproduktion nachahmt.

Eine ektopische Überexpression von Smad7 führt hingegen zur verminderten ALK5-Proteinexpression in PANC-1-Zellen. Die suppressive Wirkung von Rac1b auf die TGF- $\beta$ /Smad3-abhängige Transkriptionsaktivität, Zielgenexpression und Zellmigration (Otterbein et al., 2019; Ungefroren, Otterbein et al., 2019) wird darüber hinaus von Smad7 ebenfalls imitiert. Übereinstimmend dazu, zeigten Jin et al., dass ein Smad7-Silencing auch in Mammakarzinom Zellen (MDA-MB-231-Zellen) zu einer Erhöhung der TGF- $\beta$ -induzierten Aktivierung von Smad3 führte (Jin et al., 2015). Damit kann man annehmen, dass Rac1b seine inhibitorischen Effekte auf die TGF- $\beta$ /Smad-vermittelte Genexpression teilweise durch eine Hochregulation von Smad7 vollzieht.

Die Transfektion von Smad7 in PANC-1-Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der siRac1b-vermittelten erhöhten Migrationsfähigkeit in Rac1b KD und Rac1b KO Zellen (Ungefroren et al., 2020). Daraus lässt sich schließen, dass Rac1b Smad7 dazu veranlasst, die Menge von ALK5 und infolgedessen die Sensitivität der Zellen gegenüber TGF- $\beta$ 1-induzierter Zellmigration zu verringern.

In Mammakarzinom- und Glioblastom-Zellen ist das deubiquitylierende Enzym USP26 als Negativregulator des TGF- $\beta$ -Signalweges bekannt, indem es, durch TGF- $\beta$ 1 stimuliert, die Proteinstabilität von Smad7 stärkt. USP26 begrenzt dabei den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Smad7 (Lui et al., 2017).

Unsere Arbeitsgruppe fand zusätzlich heraus, dass in PANC-1-Zellen USP26 durch TGF- $\beta$ 1 im gleichen Zeitrahmen wie Smad7 transkriptionell induziert wird und dass diese Induktion in Rac1b-depletierten Zellen vollständig fehlt. Der siRNA-vermittelte Knockdown von USP26 bewirkt eine Reduktion von Smad7, dies fördert maßgeblich die Annahme, dass Rac1b USP26 zur Stabilisierung des Smad7-Proteins und zum nachfolgenden Smad7-vermittelten Abbau von ALK5 verwendet. Die suppressive Wirkung von Rac1b auf die ALK5-Menge und damit auf die Zellmigration vollzieht sich demnach durch eine Smad7-Induktion und dies wiederum über eine intermittierende transkriptionelle Induktion von USP26 (Ungefroren et al., 2020). Diese dargelegten Daten demonstrieren, dass Rac1b die Induktion von Smad7 bewirkt, indem es dessen Deubiquitylierung über USP26 fördert. Das Smad7-Protein kann daher als ein maßgeblicher nachgeschalteter Effektor, der von Rac1b positiv reguliert wird, bestimmt werden. Darüber hinaus pointieren diese Darlegungen die zentrale Rolle von Smad7 in der Negativregulation der ALK5-Menge und der TGF- $\beta$ 1-induzierten Zellmigration in Karzinomzellen vom mesenchymalen Typ.

#### **4.7. Nachfolgende Untersuchungen, Limitationen und Ausblick**

Die Grundlage der im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Versuche war das siRNA-vermittelte Ausschalten von Rac1b. Durch die suffiziente Depletion von Rac1b konnten Rückschlüsse auf dessen Rolle in der TGF- $\beta$ -abhängigen Signalkaskade gezogen werden. Ziel war es u.a. zu detektieren, ob Rac1b durch seine Vielzahl der inhibitorischen Effekte auf diesen Signalweg bereits an einem proximalen Punkt regulatorisch eingreift. Da in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe bereits einige intrazelluläre Signalmoleküle als Rac1b-abhängige Effektoren der Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalweges herausgearbeitet wurden (MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 bspw.), postulierten wir nun als potenzielles Target von Rac1b den membranassoziierten Rezeptor ALK5.

Es ist weiterhin notwendig, dass der der Interaktion von Rac1b und ALK5 zugrundeliegende Mechanismus genauer charakterisiert wird. Einen wichtigen Hinweis lieferte in dieser Arbeit Western Blots bzw. qPCRs, in denen deutlich wurde, dass die ALK5-Protein- und mRNA-Menge von Rac1b negativ reguliert wird. Somit könnte Rac1b durch Einflussnahme auf die Menge bzw. Expression von ALK5 die TGF- $\beta$ -Sensitivität der Zellen an einem strategisch wichtigen Punkt kontrollieren. Der Frage

nachgehend, inwiefern die hemmende Wirkung von Rac1b auf den TGF- $\beta$ -Signalweg durch eine Verringerung der ALK5-Menge zu Stande kommt und wie konkret dadurch zelluläre Vorgänge der Karzinomzellen wie Migration bzw. Chemokinese inhibitorisch beeinflusst werden, untersuchen wir mittels Zellmigrationsassays. Eine Kodepletion von ALK5 schwächt die Rac1b-induzierte Migrationssteigerung von TGF- $\beta$ 1-stimulierten PANC-1-Zellen deutlich ab. Die RNA-Interferenz basierte Depletion von Rac1b führte zu verstärkter migratorischer Aktivität in der Zelllinie PANC-1, eine gleichzeitige Inhibition von p38, MAPK (Witte et al., 2017) und in dieser Arbeit neu, *ALK5*, konnte diesen Effekt wieder aufheben. Der hemmende Einfluss von Rac1b auf die ALK5-Menge stellt eine zentrale kausale Rolle in der Negativregulation der TGF- $\beta$ 1-abhängigen Zellmigration dar.

Die mechanistische Grundlage des hemmenden Einflusses von Rac1b auf die ALK5-Menge konnte dadurch nicht genau erklärt werden und sollte in Zukunft genauer herausgearbeitet werden. Daten aus dieser Arbeit konnten zeigen, dass eine Rac1b-Depletion vermutlich eine Hochregulation des inhibitorischen Smad-Proteins Smad7 bewirkt. Durch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnte dargelegt werden, dass Rac1b über USP26 Smad7 induziert und somit seine suppressive Wirkung auf die Zellmigration in PDAC-abgeleiteten Zellen vom mesenchymalen Typ vollzieht. Das via Rac1b-induzierte Smad7-Protein degradiert die ALK5-Menge und hemmt dementsprechend nachfolgende zelluläre Vorgänge wie die Migration der Karzinomzellen. Smad7 kann demnach eine zentrale Rolle in der Negativregulation des TGF- $\beta$  Signalweges zugeschrieben werden, indem es diese Signaltransduktionskette mittels verschiedener Mechanismen, wie bspw. durch Abbau von ALK5 über Smurf1 und Smurf2, Hemmung der SMAD2/3-Phosphorylierung, Förderung der Ubiquitin-vermittelten Degradierung bzw. Abbau von ALK5 (Tang et al., 2018) und durch Smad7-Proteinstabilisierung via Rac1b-induzierter USP26-Induktion (Ungefroren et al., 2020) negativ steuert. Mit der Identifikation von USP26 als Zielgen von Rac1b, scheint dessen intermittierende transkriptionelle Aktivität für die Smad7-Induktion bzw. Proteinstabilität entscheidend zu sein. Wenig wahrscheinlich ist, dass Rac1b direkt mit Smad7 interagiert. Da gezeigt wurde, dass USP26 durch Rac1b induziert wird und dass das Rac1b-Silencing die Häufigkeit des Smad7-Proteins verringert, muss noch bestimmt werden, ob USP26 in Pankreaskarzinomzellen tatsächlich an Smad7 bindet und dieses deubiquitiniert.

Neuere Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe belegen, dass Rac1b einerseits die *epitheliale* Genexpression fördert und andererseits ein *mesenchymales* Programm hemmt, indem es die TGF- $\beta$ -abhängige MEK-ERK1/2-Signalübertragung beeinträchtigt. Dadurch schützt es die Zellen vor Durchlaufen des Prozesses der EMT und EMT-assoziierten Reaktionen wie Erwerb von Zellmotilität. Ferner scheint eine Korrelation zwischen der Rac1b-Expression und dem Differenzierungsgrad bzw. dem Tumorsubtyp zu existieren: Diese Korrelation war hoch in gut differenzierten Zelllinien mit epitheliale/klassischem Phänotyp und niedrig in schlecht differenzierten Zelllinien mit (quasi-)mesenchymalem Erscheinungsbild. Dies suggeriert die Annahme, dass Rac1b kausal an der Subtyp-Umwandlung vom epitheliale zu mesenchymalem Phänotyp beteiligt ist. Hohes Rac1b oder ein hohes Verhältnis von Rac1b zu Rac1 stellt eine physiologische Barriere gegen maligne Transformationen pankreatischer Karzinomzellen dar (Zinn et al., 2019).

Mit dieser Arbeit etablierten wir die kleine GTPase Rac1b weiter als kraftvollen Inhibitor des endogenen TGF- $\beta$ -Signalweges in Pankreaskarzinomzellen. Zusammen mit seiner dargelegten Fähigkeit, die ALK5-Protein- und mRNA-Expression zu reduzieren, sowie der starken antimigratorischen Funktion in vitro, qualifiziert sich Rac1b als starkes Tumorsuppressor-Protein. Die dargelegten Daten dieser Arbeit geben darüber hinaus Unterstützung in der Annahme, dass die negative Kontrolle der TGF- $\beta$ -abhängigen Zellmotilität von Rac1b auf der Ebene von ALK5 ausgeübt wird. Die Rac1b-vermittelte Reduktion der ALK5-Expression führt zu einer verminderten ALK5-Kinase-Aktivität, Smad3-Signalgebung und Smad3-abhängiger Reaktionen wie Wachstumshemmung und Zellmigration (Ungefroren, Otterbein et al., 2019).

Aus diesem Grund sind aus therapeutischer Sicht in Zukunft Strategien wünschenswert, die die Expression und/oder Aktivität von Rac1b (oder seine Produktion durch Alternatives Spleißen von Rac1) gegenüber seinem tumorfördernden verwandten Protein Rac1 erhöhen. Diese therapeutische Erhöhung der Rac1b-Expression könnte in schlecht differenzierten Krebszellen von PDAC-abgeleiteten Zellen eine vielversprechende Strategie sein, um die tumorfördernden Funktionen von TGF- $\beta$ 1 zu blockieren und ihre Redifferenzierung in den weniger malignen epithelialen Phänotyp zu verstärken. Die Strategie der Rac1b-Expressionserhöhung könnte auch in anderen neoplastischen Entitäten, bei denen TGF- $\beta$ 1 die Invasion und Metastasie-

rung fördert, testweise durchgeführt werden. Speziell die gering differenzierten Pankreaskarzinome sind gekennzeichnet durch eine besonders schlechte Prognose und hoher Resistenz ggüb. der Standard-Chemotherapeutika (Collisson et al., 2011; Aung et al., 2017). Im Kontext immanent hoher Mortalitätsraten des Pankreaskarzinoms und in Anbetracht von global stetig steigenden Erkrankungs- und Sterberaten (Ilic et al., 2013), gewinnen innovative Therapiekonzepte stetig an Relevanz. Es hat sich herausgestellt, dass Rac1b in PDAC-Zellen schwächer exprimiert ist als im gesunden Pankreasgangepithel und dass stärkere Rac1b-Expression in diesen Karzinomen mit einer längeren Überlebenszeit der Patienten korreliert (Ungefroren et al., 2014). Auch aus diesem Grund könnte ein besseres Verständnis der zellautonomen Mechanismen, die mesenchymale von epithelialen Tumoren unterscheiden, Chancen für neue, personalisierte Therapien eröffnen (Waddell et al., 2015; Bailey et al., 2016).

## 5. Zusammenfassung

Fragestellung: Die GTPase Rac1b ist ein starker Inhibitor der TGF- $\beta$ -abhängigen Signalkaskade in Pankreaskarzinomen. Die Vielzahl der durch Rac1b gehemmten Zellantworten, lässt einen proximalen Angriffspunkt von Rac1b an diesem Signalweg vermuten. Ein potenzielles Ziel wäre dabei der TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I/ „*activin A receptor type I-like kinase 5*“ (ALK5), den Rac1b möglicherweise in seiner Expression und/oder Kinaseaktivität inhibiert. Wir untersuchten daraus resultierende negative Effekte auf die Zellmigration, sowie den genauen molekularen Mechanismus der Negativregulation von Rac1b auf ALK5. Die Zelle könnten dementsprechend über Rac1b die TGF- $\beta$ -Sensitivität der Zelle an einem strategisch wichtigen Punkt kontrollieren.

Material und Methoden: In den Experimenten wurde die humane Pankreaskarzinomzelllinie *PANC-1* verwendet, die in Standardmedien mit Supplementierung von 10% fetalen Kälberserum kultiviert wurde. Die Hemmung der Expression entsprechender Zielgene erfolgte durch Transfektion der Zellen mit *small-interfering RNA*. Im Western Blot wiesen wir Proteine mit spezifischen Antikörpern nach. Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression eines Zielgens erfolgte mit der *quantitativen real time polymerase chain reaction*. Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde durch xCELLigence-Migrationsassays detektiert.

Ergebnisse: In den PANC-1-Zellen kam es durch Rac1b zu einer Negativregulation sowohl der Protein- als auch der mRNA-Menge von ALK5. Eine Depletion von Rac1b führte zur gesteigerten Zellmigration, eine simultane Kodepletion von ALK5 führte zu einer Abschwächung dieses Effektes. Eine Imitierung dieser Effektabschwächung erfolgt nach Transfektion mit einer Kinase-inaktiven Mutante von ALK5. Die Depletion von Rac1b führte zu einer Hemmung der Expression von Smad7, einem inhibitorischen Smad-Protein, das einen Negativregulator des TGF- $\beta$ -Signalweges darstellt.

Diskussion: Rac1b supprimiert über die Inhibition der Expression von ALK5 die Zellmigration in duktalem Pankreaskarzinomzellen. Rac1b induziert Smad7 als Negativregulator des TGF- $\beta$ -Signalweges. Wir haben Rac1b als starken Inhibitor des endogenen TGF- $\beta$ -Signalweges in Pankreaskarzinomzellen identifiziert. Eine therapeutische Rac1b-Expressionserhöhung kann ein potenzielles Therapieregime für TGF- $\beta$ -assoziierte Neoplasien darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

Adamska, A., Domenichini, A., & Falasca, M. (2017). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1338.

Afrakhte, M., Morén, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermark, B., Heldin, C. H., Heldin, N. E., & ten Dijke, P. (1998). Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(2), 505–511.

Ahn, R., Sabourin, V., Ha, J. R., Cory, S., Maric, G., Im, Y. K., Hardy, W. R., Zhao, H., Park, M., Hallett, M., Siegel, P. M., Pawson, T., & Ursini-Siegel, J. (2013). The ShcA PTB domain functions as a biological sensor of phosphotyrosine signaling during breast cancer progression. *Cancer Research*, 73(14), 4521–4532.

Alan, J. K., & Lundquist, E. A. (2013). Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*, 4(3), 159–163.

AWMF (2013) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Langversion 1.0. Registernummer: 032-010OL. Abgerufen 5. August 2020, von <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>

Anzano, M. A., Roberts, A. B., Smith, J. M., Sporn, M. B., & De Larco, J. E. (1983). Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(20), 6264–6268.

Aune, D., Greenwood, D. C., Chan, D. S., Vieira, R., Vieira, A. R., Navarro Rosenblatt, D. A., Cade, J. E., Burley, V. J., & Norat, T. (2012). Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: A systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology*, 23(4), 843–852.

Aung, K. L., Fischer, S. E., Denroche, R. E., Jang, G.-H., Dodd, A., Creighton, S., Southwood, B., Liang, S.-B., Chadwick, D., Zhang, A., O’Kane, G. M., Albaba, H., Moura, S., Grant, R. C., Miller, J. K., Mbabaali, F., Pasternack, D., Lungu, I. M., Bartlett, J. M. S., Knox, J. J. (2018). Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(6), 1344–1354.

Bailey, P., Chang, D. K., Forget, M.-A., Lucas, F. A. S., Alvarez, H. A., Haymaker, C., Chattopadhyay, C., Kim, S.-H., Ekmekcioglu, S., Grimm, E. A., Biankin, A. V., Hwu, P., Maitra, A., & Roszik, J. (2016). Exploiting the neoantigen landscape for immunotherapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 6, 35848.

Bang, U. C., Benfield, T., Hyldstrup, L., Bendtsen, F., & Jensen, J.-E. B. (2014). Mortality, Cancer, and Comorbidities Associated With Chronic Pancreatitis: A Danish Nationwide Matched-Cohort Study. *Gastroenterology*, 146(4), 989-994.e1.

- Batlle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, 50(4), 924–940.
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(32), 11182–11198.
- Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F. M., & Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 108(6), 2435–2447.
- Bhowmick, N. A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., & Moses, H. L. (2001). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46707–46713.
- Bieberich, E. (2018). Sphingolipids and lipid rafts: Novel concepts and methods of analysis. *Chemistry and Physics of Lipids*, 216, 114–131.
- Bokoch, G. M., & Diebold, B. A. (2002). Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*, 100(8), 2692–2695.
- Bosco, E. E., Mulloy, J. C., & Zheng, Y. (2009). Rac1 GTPase: A “Rac” of All Trades. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(3), 370–374.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 15(6), 2403–2413.
- Cell Migration & Cell Invasion Assay Application | ACEA Biosciences. (o. J.). ACEA Biosciences Inc. Abgerufen 5. August 2020, von <https://www.aceabio.com/applications/cell-invasion-and-migration/>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., & Gray, J. W. (2011). Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Differing Responses to Therapy. *Nature medicine*, 17(4), 500–503.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E.,

Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., PRODIGE Intergroup. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–1825.

Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Capelli, P., Blaveri, E., Baron, A., Terris, B., Jones, M., Tyson, K., Bassi, C., Scarpa, A., & Lemoine, N. R. (2001). Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene*, 20(50), 7437–7446.

David, C. J., Huang, Y.-H., Chen, M., Su, J., Zou, Y., Bardeesy, N., Iacobuzio-Donahue, C. A., & Massagué, J. (2016). TGF- $\beta$  Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell*, 164(5), 1015–1030.

DC Protein Assay | Life Science Research | Bio-Rad. (o. J.). Abgerufen 5. August 2020, von <https://www.bio-rad.com/de-de/product/dc-protein-assay?ID=22faf97a-6b8d-4763-8b97-3dc530dcab66>

Deckers, M., Dinther, M. van, Buijs, J., Que, I., Löwik, C., Pluijm, G. van der, & Dijke, P. ten. (2006). The Tumor Suppressor Smad4 Is Required for Transforming Growth Factor  $\beta$ -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition and Bone Metastasis of Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(4), 2202–2209.

Demir, I., Jäger, C., Schlitter, A., Konukiewicz, B., Stecher, L., Schorn, S., Tieftrunk, E., Scheufele, F., Calavrezos, L., Schirren, R., Esposito, I., Weichert, W., Friess, H., & Ceyhan, G. (2018). R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. *Annals of Surgery*, 268(6), 1058–1068.

Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling. *Science Signaling*, 12(570), eaav5183.

Derynck, R., & Feng, X.-H. (1997). TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1333(2), F105–F150.

Doi, R., Kami, K., Ito, D., Fujimoto, K., Kawaguchi, Y., Wada, M., Kogire, M., Hosotani, R., Imamura, M., & Uemoto, S. (2007). Prognostic implication of para-aortic lymph node metastasis in resectable pancreatic cancer. *World Journal of Surgery*, 31(1), 147–154.

Drabsch, Y., & ten Dijke, P. (2011). TGF- $\beta$  Signaling in Breast Cancer Cell Invasion and Bone Metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(2), 97–108.

Du, J., Liu, J., Smith, B. J., Tsao, M.-S., & Cullen, J. J. (2011). Role of Rac-1 dependent NADPH-Oxidase in the growth of pancreatic cancer. *Cancer gene therapy*, 18(2), 135–143.

Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M. J., Soligo, S., Morsut, L., Inui, M., Moro, S., Modena, N., Argenton, F., Newfeld, S. J., & Piccolo, S. (2009). FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGF $\beta$  Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell*, 136(1), 123–135.

Ebner, R., Chen, R. H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T. F., Lee, A., Lopez, A. R., & Derynck, R. (1993). Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science*, 260(5112), 1344–1348.

Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenström, P., Heuchel, R., Heldin, N.-E., ten Dijke, P., Heldin, C.-H., & Landström, M. (2003). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), 529–544.

Ehrlich, M., Gutman, O., Knaus, P., & Henis, Y. I. (2012). Oligomeric interactions of TGF- $\beta$  and BMP receptors. *FEBS Letters*, 586(14), 1885–1896.

Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(38), 13833–13841.

Esufali, S., Charames, G. S., Pethe, V. V., Buongiorno, P., & Bapat, B. (2007). Activation of tumor-specific splice variant Rac1b by dishevelled promotes canonical Wnt signaling and decreased adhesion of colorectal cancer cells. *Cancer Research*, 67(6), 2469–2479.

Fahrmann, J. F., Bantis, L. E., Capello, M., Scelo, G., Dennison, J. B., Patel, N., Murage, E., Vykoukal, J., Kundnani, D. L., Foretova, L., Fabianova, E., Holcatova, I., Janout, V., Feng, Z., Yip-Schneider, M., Zhang, J., Brand, R., Taguchi, A., Maitra, A., Hanash, S. (2018). A Plasma-Derived Protein-Metabolite Multiplexed Panel for Early-Stage Pancreatic Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 111(4), 372–379.

Fan, F., Samuel, S., Evans, K. W., Lu, J., Xia, L., Zhou, Y., Sceusi, E., Tozzi, F., Ye, X.-C., Mani, S. A., & Ellis, L. M. (2012). Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Medicine*, 1(1), 5–16.

Farrow, B., & Evers, B. M. (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surgical Oncology*, 10(4), 153–169.

Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 14(3), 224–232.

Feng, X.-H., & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 659–693.

Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., & Billadeau, D. D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell*, 7(1), 39–49.

Fiegen, D., Haeusler, L.-C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I. R., & Ahmadian, M. R. (2004). Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4743–4749.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
- Fokas, E., O'Neill, E., Gordon-Weeks, A., Mukherjee, S., McKenna, W. G., & Muschel, R. J. (2015). Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1855(1), 61–82.
- Fritz, G., Just, I., & Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *International Journal of Cancer*, 81(5), 682–687.
- Funaba, M., Zimmerman, C. M., & Mathews, L. S. (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41361–41368.
- Galis, Z. S., & Khatri, J. J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circulation Research*, 90(3), 251–262.
- Garrido-Laguna, I., & Hidalgo, M. (2015). Pancreatic cancer: From state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(6), 319–334.
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C. J., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (1998). Genetic Alterations of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Genes in Pancreatic and Biliary Adenocarcinomas. *Cancer Research*, 58(23), 5329–5332.
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(1), 333–339.
- Grote, V. A., Rohrmann, S., Nieters, A., Dossus, L., Tjønneland, A., Halkjær, J., Overvad, K., Fagherazzi, G., Boutron-Ruault, M. C., Morois, S., Teucher, B., Becker, S., Sluik, D., Boeing, H., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Pala, V., Kaaks, R. (2011). Diabetes mellitus, glycated haemoglobin and C-peptide levels in relation to pancreatic cancer risk: A study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Diabetologia*, 54(12), 3037–3046.
- Groth, S., Schulze, M., Kalthoff, H., Fändrich, F., & Ungefroren, H. (2005). Adhesion and Rac1-dependent Regulation of Biglycan Gene Expression by Transforming Growth Factor- $\beta$ : Evidence for oxidative signaling through NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33190–33199.
- Haeusler, L. C., Hemsath, L., Fiegen, D., Blumenstein, L., Herbrand, U., Stege, P., Dvorsky, R., & Ahmadian, M. R. (2006). Purification and biochemical properties of Rac1, 2, 3 and the splice variant Rac1b. *Methods in Enzymology*, 406, 1–11.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T. M. S., Moskaluk, C. A., Costa, L. T. da, Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (1996). DPC4, A Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1. *Science*, 271(5247), 350–353.

- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., & Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 27161–27167.
- Hao, Y., Baker, D., & ten Dijke, P. (2019). TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11).
- Hata, A., & Chen, Y.-G. (2016). TGF- $\beta$  Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9).
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anatomica*, 154(1), 8–20.
- Heid, I., Lubeseder-Martellato, C., Sipos, B., Mazur, P. K., Lesina, M., Schmid, R. M., & Siveke, J. T. (2011). Early requirement of Rac1 in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 141(2), 719–730, 730.e1-7.
- Heinrich, S., & Lang, H. (2017). Neoadjuvant Therapy of Pancreatic Cancer: Definitions and Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8).
- Heldin, C.-H., Lu, B., Evans, R., & Gutkind, J. S. (2016). Signals and Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4).
- Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2016). Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8).
- Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., & Moustakas, A. (2012). Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Letters*, 586(14), 1959–1970.
- Henriques, A. F. A., Barros, P., Moyer, M. P., Matos, P., & Jordan, P. (2015). Expression of tumor-related Rac1b antagonizes B-Raf-induced senescence in colorectal cells. *Cancer Letters*, 369(2), 368–375.
- Herhaus, L., & Sapkota, G. P. (2014). The emerging roles of deubiquitylating enzymes (DUBs) in the TGF $\beta$  and BMP pathways. *Cellular Signalling*, 26(10), 2186–2192.
- Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.-P., Gillet, G., Mikaelian, I., & Rimokh, R. (2011). Antagonistic regulation of EMT by TIF1 $\gamma$  and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO reports*, 12(7), 665–672.
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 20(10), 1218–1249.
- Hiraga, R., Kato, M., Miyagawa, S., & Kamata, T. (2013). Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Research*, 33(10), 4431–4438.

Hoot, K. E., Lighthall, J., Han, G., Lu, S.-L., Li, A., Ju, W., Kulesz-Martin, M., Bottinger, E., & Wang, X.-J. (2008). Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(8), 2722–2732.

Hordijk, P. L. (2006). Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circulation Research*, 98(4), 453–462.

How Cationic Lipid Mediated Transfection Works—DE. (o. J.). Abgerufen 4. August 2020, von [//www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html](http://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html)

Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Longnecker, D. S., Lüttges, J., & Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(5), 579–586.

Hruban, Ralph H, Maitra, A., & Goggins, M. (2008). Update on Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1(4), 306–316.

Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F., & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: A meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer*, 92(11), 2076–2083.

Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9694–9705.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 277–300.

Jiang, Z., Seo, J. Y., Ha, H., Lee, E. A., Kim, Y. S., Han, D. C., Uh, S. T., Park, C. S., & Lee, H. B. (2003). Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), 961–966.

Jin, L., Zhu, C., Wang, X., Li, C., Cao, C., Yuan, J., & Li, S. (2015). Urocortin Attenuates TGFβ1-Induced Snail1 and Slug Expressions: Inhibitory Role of Smad7 in Smad2/3 Signaling in Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(11), 2494–2503.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.-M., Fu, B., Lin, M.-T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Kinzler, K. W. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1801–1806.

Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M. G., Gespach, C., & Chastre, E. (1999a). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, 18(48), 6835–6839.

- Jordan, P., Brazão, R., Boavida, M. G., Gespach, C., & Chastre, E. (1999b). Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, 18(48), 6835–6839.
- Juhasz, A., Ge, Y., Markel, S., Chiu, A., Matsumoto, L., Balgooy, J., Roy, K., & Doroshow, J. H. (2009). Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free radical research*, 43(6), 523–532.
- Jung, S. M., Lee, J.-H., Park, J., Oh, Y. S., Lee, S. K., Park, J. S., Lee, Y. S., Kim, J. H., Lee, J. Y., Bae, Y.-S., Koo, S.-H., Kim, S.-J., & Park, S. H. (2013). Smad6 inhibits non-canonical TGF- $\beta$ 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nature Communications*, 4(1), 2562.
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*, 25(1), 76–84.
- Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J., & Parise, L. V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*, 390(6660), 632–636.
- Kim, J.-E., Lee, K. T., Lee, J. K., Paik, S. W., Rhee, J. C., & Choi, K. W. (2004). Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), 182–186.
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., Sheppard, D., & Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180–13185.
- Kim, S. G., Kim, H.-A., Jong, H.-S., Park, J.-H., Kim, N. K., Hong, S. H., Kim, T.-Y., & Bang, Y.-J. (2005). The Endogenous Ratio of Smad2 and Smad3 Influences the Cytostatic Function of Smad3. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4672–4683.
- Kissil, J. L., Walmsley, M. J., Hanlon, L., Haigis, K. M., Kim, C. F. B., Sweet-Cordero, A., Eckman, M. S., Tuveson, D. A., Capobianco, A. J., Tybulewicz, V. L. J., & Jacks, T. (2007). Requirement for Rac1 in a K-ras-Induced Lung Cancer in the Mouse. *Cancer Research*, 67(17), 8089–8094.
- Knight-Krajewski, S., Welsh, C. F., Liu, Y., Lyons, L. S., Faysal, J. M., Yang, E. S., & Burnstein, K. L. (2004). Deregulation of the Rho GTPase, Rac1, suppresses cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (CIP1) levels in androgen-independent human prostate cancer cells. *Oncogene*, 23(32), 5513–5522.

- Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Li, Y., Wang, Z., Sethi, S., & Sarkar, F. H. (2010). Epithelial to Mesenchymal Transition Is Mechanistically Linked with Stem Cell Signatures in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, 5(8).
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. (2013). The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 64(4), 409–421.
- Korc, M., Jeon, C. Y., Edderkaoui, M., Pandol, S. J., & Petrov, M. S. (2017). Tobacco and Alcohol as risk factors for Pancreatic cancer. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 31(5), 529–536.
- Kretzschmar, M., Doody, J., & Massagué, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, 389(6651), 618–622.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., & Massagué, J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Development*, 13(7), 804–816.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), 178–196.
- Lee, K., Chen, Q. K., Lui, C., Cichon, M. A., Radisky, D. C., & Nelson, C. M. (2012). Matrix compliance regulates Rac1b localization, NADPH oxidase assembly, and epithelial–mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell*, 23(20), 4097–4108.
- Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., & Derynck, R. (2007a). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO Journal*, 26(17), 3957–3967.
- Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., & Derynck, R. (2007b). TGF-β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO Journal*, 26(17), 3957–3967.
- Lei, Y.-Y., Wang, W.-J., Mei, J.-H., & Wang, C.-L. (2014). Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(20), 8539–8548.
- Letterio, J. J., & Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*, 16, 137–161.
- Li, W. Q., Qureshi, H. Y., Liacini, A., Dehnade, F., & Zafarullah, M. (2004). Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(2), 196–207.

- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., & Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer*, 15(5), 741–747.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., & Pauwels, P. (2012). Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *PLoS ONE*, 7(10), e46536.
- Lin, H. Y., & Wang, X. F. (1992). Expression cloning of TGF-beta receptors. *Molecular Reproduction and Development*, 32(2), 105–110.
- Liu, C., Xu, P., Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2009). TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF- $\beta$  receptor downregulates TGF- $\beta$  signaling. *Molecular cell*, 35(1), 26–36.
- Long, H., Xiang, T., Qi, W., Huang, J., Chen, J., He, L., Liang, Z., Guo, B., Li, Y., Xie, R., & Zhu, B. (2015). CD133+ ovarian cancer stem-like cells promote non-stem cancer cell metastasis via CCL5 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(8), 5846–5859.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lui, S. K. L., Iyengar, P. V., Jaynes, P., Isa, Z. F. B. A., Pang, B., Tan, T. Z., & Eichhorn, P. J. A. (2017). USP26 regulates TGF- $\beta$  signaling by deubiquitinating and stabilizing SMAD7. *EMBO Reports*, 18(5), 797–808.
- Mack, N. A., Whalley, H. J., Castillo-Lluva, S., & Malliri, A. (2011). The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle*, 10(10), 1571–1581.
- Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2002). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Digestive Diseases*, 20(1), 32–37.
- Mandel, K., Seidl, D., Rades, D., Lehnert, H., Gieseler, F., Hass, R., & Ungefroren, H. (2013). Characterization of Spontaneous and TGF- $\beta$ -Induced Cell Motility of Primary Human Normal and Neoplastic Mammary Cells In Vitro Using Novel Real-Time Technology. *PLOS ONE*, 8(2), e56591.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715.
- Massagué, J. (1998). TGF- $\beta$  Signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 753–791.
- Massagué, Joan. (2008). TGF $\beta$  in Cancer. *Cell*, 134(2), 215–230.
- Massagué, Joan. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10), 616–630.
- Massagué, Joan, Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGF $\beta$  Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, 103(2), 295–309.

- Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Veríssimo, F., Gespach, C., Boavida, M. G., Scherer, S. W., & Jordan, P. (2000). Small GTPase Rac1: Structure, localization, and expression of the human gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), 741–751.
- Matos, Paulo, Collard, J. G., & Jordan, P. (2003). Tumor-related alternatively spliced Rac1b is not regulated by Rho-GDP dissociation inhibitors and exhibits selective downstream signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50442–50448.
- Maxima SYBR GREEN/Fluorescein qPCR-Mastermix (2X). (o. J.). Abgerufen 5. August 2020, von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0241>
- Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G., & Atfi, A. (2001). Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36797–36803.
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846–4861.
- Melzer, C., Hass, R., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2019). Rac1B: A Rho GTPase with Versatile Functions in Malignant Transformation and Tumor Progression. *Cells*, 8(1), 21.
- Melzer, C., Hass, R., von der Ohe, J., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2017). The role of TGF- $\beta$  and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 15(1), 19.
- Melzer, C., von der Ohe, J., Hass, R., & Ungefroren, H. (2017). TGF- $\beta$ -Dependent Growth Arrest and Cell Migration in Benign and Malignant Breast Epithelial Cells Are Antagonistically Controlled by Rac1 and Rac1b. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1574.
- Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, 381(1), 269–277.
- Mihara, K., Ramachandran, R., Saifeddine, M., Hansen, K. K., Renaux, B., Polley, D., Gibson, S., Vanderboor, C., & Hollenberg, M. D. (2016). Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Molecular Pharmacology*, 89(5), 606–614.
- Miyazawa, K., & Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(3), a022095.
- Mohammed, S., Van Buren II, G., & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(28), 9354–9360.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., & Parulekar, W. (2007). Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*, 25(15), 1960–1966.

- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a021873.
- Morrison, C. D., Parvani, J. G., & Schiemann, W. P. (2013). The Relevance of the TGF- $\beta$  Paradox to EMT-MET Programs. *Cancer letters*, 341(1).
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF- signals. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3573–3584.
- Moustakas, Aristidis, & Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development (Cambridge, England)*, 136(22), 3699–3714.
- Mu, Y., Gudey, S. K., & Landström, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell and Tissue Research*, 347(1), 11–20.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., & Taga, T. (2000). BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *The Journal of biological chemistry*, 275(23), 17647–17652.
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y. T., Kaibuchi, K., & Takahashi, Y. (2004). Mesenchymal-Epithelial Transition during Somitic Segmentation is Regulated by Differential Roles of Cdc42 and Rac1. *Developmental Cell*, 7(3), 425–438.
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., Faluyi, O., O'Reilly, D. A., Cunningham, D., Wadsley, J., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthoney, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J. R., Middleton, G. W., & Büchler, M. W. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, 389(10073), 1011–1024.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45.
- Nimnual, A. S., Taylor, L. J., Nyako, M., Jeng, H.-H., & Bar-Sagi, D. (2010). Perturbation of cytoskeleton dynamics by the opposing effects of Rac1 and Rac1b. *Small GTPases*, 1(2), 89–97.
- Nöthlings, U., Wilkens, L. R., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Henderson, B. E., & Kolonel, L. N. (2005). Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: The multiethnic cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(19), 1458–1465.
- Otterbein, H., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2019). Negative Control of Cell Migration by Rac1b in Highly Metastatic Pancreatic Cancer Cells Is Mediated by Sequential Induction of Nonactivated Smad3 and Biglycan. *Cancers*, 11(12), 1959.
- Owens, P., Pickup, M. W., Novitskiy, S. V., Giltane, J. M., Gorska, A. E., Hopkins, C. R., Hong, C. C., & Moses, H. L. (2015). Inhibition of BMP Signaling Suppresses Metastasis in Mammary Cancer. *Oncogene*, 34(19), 2437–2449.

Paiva, C. E., Serrano, S. V., Paiva, B. S. R., Scapulatempo-Neto, C., Soares, F. A., Rogatto, S. R., & Marques, M. E. A. (2012). Absence of TGF- $\beta$ RII predicts bone and lung metastasis and is associated with poor prognosis in stage III breast tumors. *Cancer Biomarkers*, 11(5), 209–217.

PANC-1 ATCC® CRL-1469™ Homo sapiens pancreas/duct epitheli. (o. J.). Abgerufen 3. August 2020, von [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1469.aspx?geo\\_country=de#specifications](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1469.aspx?geo_country=de#specifications)

Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297(5866), 474–478.

Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8, 23.

Patel, S., Takagi, K., Suzuki, J., Imaizumi, A., Kimura, T., Mason, R. M., Kamimura, T., & Zhang, Z. (2005). RhoGTPase Activation Is a Key Step in Renal Epithelial Mesenchymal Transdifferentiation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 1977–1984.

Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415–428.

Permeth-Wey, J., & Egan, K. M. (2009). Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: Results from a systematic review and meta-analysis. *Familial Cancer*, 8(2), 109–117.

Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sánchez-Pérez, I., Bravo, R., & Lacal, J. C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes & Development*, 11(4), 463–475.

Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., & ten Dijke, P. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 24), 4557–4568.

Pinto, M., Oliveira, C., Cirnes, L., Machado, J. C., Ramires, M., Nogueira, A., Carneiro, F., & Seruca, R. (2003). Promoter methylation of TGF $\beta$  receptor I and mutation of TGF $\beta$  receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas. *The Journal of Pathology*, 200(1), 32–38.

Prime, S. S., Pring, M., Davies, M., & Paterson, I. C. (2004). TGF- $\beta$  Signal Transduction in Oro-facial Health and Non-malignant Disease (Part I). *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(6), 324–336.

Protein Standards & Ladders | Thermo Fisher Scientific—DE. (o. J.). Abgerufen 5. August 2020, von <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-standards-ladders.html>

Radisky, D. C., Levy, D. D., Littlepage, L. E., Liu, H., Nelson, C. M., Fata, J. E., Leake, D., Godden, E. L., Albertson, D. G., Angela Nieto, M., Werb, Z., & Bissell, M.

J. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature*, 436(7047), 123–127.

Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, 74(11), 2913–2921.

Rasheed, Z. A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S.-M., Koorstra, J.-B., Rajeshkumar, N. V., He, X., Goggins, M., Iacobuzio-Donahue, C., Berman, D. M., Laheru, D., Jimeno, A., Hidalgo, M., Maitra, A., & Matsui, W. (2010). Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(5), 340–351.

Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. In S. Meuer, C. Wittwer, & K.-I. Nakagawara (Hrsg.), *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications* (S. 21–34). Springer.

Rhyu, D. Y., Yang, Y., Ha, H., Lee, G. T., Song, J. S., Uh, S., & Lee, H. B. (2005). Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(3), 667–675.

RNAPure™, peqGOLD. (o. J.). VWR. Abgerufen 4. August 2020, von <https://de.vwr.com/store/product/15153281/rnapuretm-peqgold>

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2015) *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausgabe (pdf). Abgerufen 4. August 2020, von [http://www.gekid.de/Doc/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf](http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf)

Roberts, A. B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 24(2–3), 111–119.

Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., & Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), 5339–5343.

Rouanet, M., Lebrin, M., Gross, F., Bournet, B., Cordelier, P., & Buscail, L. (2017). Gene Therapy for Pancreatic Cancer: Specificity, Issues and Hopes. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1231.

Rul, W., Zugasti, O., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T. F., Lenormand, P., Fort, P., & Hibner, U. (2002). Activation of ERK, Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, Is Required for Anoikis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973(1), 145–148.

Runyan, C. E., Hayashida, T., Hubchak, S., Curley, J. F., & Schnaper, H. W. (2009). Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25181–25189.

Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 371(22), 2140–2141.

- Schaefer, L., Gröne, H.-J., Raslik, I., Robenek, H., Ugorcakova, J., Budny, S., Schaefer, R. M., & Kresse, H. (2000). Small proteoglycans of normal adult human kidney: Distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney International*, 58(4), 1557–1568.
- Schmukler, E., Kloog, Y., & Pinkas-Kramarski, R. (2014). Ras and autophagy in cancer development and therapy. *Oncotarget*, 5(3), 577–586.
- Schneider, G., Siveke, J. T., Eckel, F., & Schmid, R. M. (2005). Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology*, 128(6), 1606–1625.
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., & Lengyel, E. (2000). Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel ERac1 in human breast cancer: Overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 19: 3013-3020. *Oncogene*, 19, 3013–3020.
- Schniewind, B., Groth, S., Sebens Mürköster, S., Sipos, B., Schäfer, H., Kalthoff, H., Fändrich, F., & Ungefroren, H. (2007). Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function. *Oncogene*, 26(33), 4850–4862.
- Seoane, J., & Gomis, R. R. (2017). TGF- $\beta$  Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(12), a022277.
- Shapira, K. E., Hirschhorn, T., Barzilay, L., Smorodinsky, N. I., Henis, Y. I., & Ehrlich, M. (2014). Dab2 inhibits the cholesterol-dependent activation of JNK by TGF- $\beta$ . *Molecular Biology of the Cell*, 25(10), 1620–1628.
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700.
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(10), 611–629.
- Shrikhande, S. V., Kleeff, J., Reiser, C., Weitz, J., Hinz, U., Esposito, I., Schmidt, J., Friess, H., & Büchler, M. W. (2007). Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 14(1), 118–127.
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33.
- Singh, A., Karnoub, A. E., Palmby, T. R., Lengyel, E., Sondek, J., & Der, C. J. (2004). Rac1b, a tumor associated, constitutively active Rac1 splice variant, promotes cellular transformation. *Oncogene*, 23(58), 9369–9380.
- Singh, P., Wig, J. D., & Srinivasan, R. (2011). The Smad family and its role in pancreatic cancer. *Indian Journal of Cancer*, 48(3), 351.

- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., & Landström, M. (2008). The type I TGF- $\beta$  receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(10), 1199–1207.
- Stallings-Mann, M. L., Waldmann, J., Zhang, Y., Miller, E., Gauthier, M. L., Visscher, D. W., Downey, G. P., Radisky, E. S., Fields, A. P., & Radisky, D. C. (2012). Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression. *Science Translational Medicine*, 4(142), 142ra95.
- Stallings-Mann, M., & Radisky, D. (2007). Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells. *Cells, Tissues, Organs*, 185(1–3), 104–110.
- Stevens, R. J., Roddam, A. W., & Beral, V. (2007). Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 96(3), 507–509.
- Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Meta-Analyses of Chemotherapy for Locally Advanced and Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18), 2607–2615.
- Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., & Saito, H. (2002). Smad-dependent GADD45 $\beta$  expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF- $\beta$ . *The EMBO Journal*, 21(23), 6473–6482.
- Tang, J., Gifford, C. C., Samarakoon, R., & Higgins, P. J. (2018). Deregulation of Negative Controls on TGF- $\beta$ 1 Signaling in Tumor Progression. *Cancers*, 10(6), 159.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(6), 442–454.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890.
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142.
- Thuault, S., Tan, E.-J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads Co-regulate SNAIL1 Expression during Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33437–33446.
- Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2006). Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology*, 174(2), 175–183.
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- $\beta$  Activation and Function in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 51–82.
- Trypan Blue solution T8154. (o. J.). Sigma-Aldrich. Abgerufen 4. August 2020, von <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154>
- Trypsin, Trypsin EDTA - DE. (o. J.). Abgerufen 4. August 2020, von [//www.thermo-fisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/trypsin/trypsin.html](http://www.thermo-fisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/trypsin/trypsin.html)

Uemura, T., Hibi, K., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Okochi, O., Nagasaka, T., & Nakao, A. (2004). Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *Journal of Gastroenterology*, 39(1), 56–60.

Ungefroren, H., Groth, S., Ruhnke, M., Kalthoff, H., & Fändrich, F. (2005). Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Type I Receptor/ALK5-dependent Activation of the GADD45 $\beta$  Gene Mediates the Induction of Biglycan Expression by TGF- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2644–2652.

Ungefroren, H., Groth, S., Sebens, S., Lehnert, H., Gieseler, F., & Fändrich, F. (2011). Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF- $\beta$ 1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Control by Rac1. *Molecular Cancer*, 10, 67.

Ungefroren, H., Kumarasinghe, A., Musfeldt, M., Fiedler, C., Lehnert, H., & Marquardt, J.-U. (2020). RAC1B Induces SMAD7 via USP26 to Suppress TGF $\beta$ 1-Dependent Cell Migration in Mesenchymal-Subtype Carcinoma Cells. *Cancers*, 12(6) 1545.

Ungefroren, H., Lenschow, W., Chen, W.-B., Faendrich, F., & Kalthoff, H. (2003). Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11041–11049.

Ungefroren, H., Otterbein, H., Fiedler, C., Mihara, K., Hollenberg, M. D., Gieseler, F., Lehnert, H., & Witte, D. (2019). Rac1B Suppresses TGF- $\beta$ 1-Dependent Cell Migration in Pancreatic Carcinoma Cells through Inhibition of the TGF- $\beta$  Type I Receptor ALK5. *Cancers*, 11(5), 691.

Ungefroren, H., Sebens, S., Giehl, K., Helm, O., Groth, S., Fändrich, F., Röcken, C., Sipos, B., Lehnert, H., & Gieseler, F. (2014). Rac1b negatively regulates TGF- $\beta$ 1-induced cell motility in pancreatic ductal epithelial cells by suppressing Smad signalling. *Oncotarget*, 5(1), 277–290.

Ungefroren, H., Witte, D., & Lehnert, H. (2018). The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- $\beta$ -induced EMT and cell motility in cancer: Role of Small GTPases in Cancer. *Developmental Dynamics*, 247(3), 451–461.

Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2005). TGF- $\beta$  and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1987–2002.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791), 607–620.

Visvikis, O., Lorès, P., Boyer, L., Chardin, P., Lemichez, E., & Gacon, G. (2008). Activated Rac1, but not the tumorigenic variant Rac1b, is ubiquitinated on Lys 147 through a JNK-regulated process. *The FEBS Journal*, 275(2), 386–396.

Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-

Paclitaxel plus Gemcitabine. *The New England journal of medicine*, 369(18), 1691–1703.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C. J., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z. H., Bruxner, T. J. C., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., & Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540), 495–501.

Wadhwa, S., Embree, M. C., Bi, Y., & Young, M. F. (2004). Regulation, regulatory activities, and function of biglycan. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 14(4), 301–315.

Weber, C. K., Sommer, G., Michl, P., Fensterer, H., Weimer, M., Gansauge, F., Leder, G., Adler, G., & Gress, T. M. (2001). Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology*, 121(3), 657–667.

Wennerberg, K. (2004). Rho-family GTPases: It is not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science*, 117(8), 1301–1312.

Willis, S. A., Zimmerman, C. M., Li, L. I., & Mathews, L. S. (1996). Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), 10(4), 367–379.

Witte, D., Bartscht, T., Kaufmann, R., Pries, R., Settmacher, U., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2017). TGF- $\beta$ 1-induced cell migration in pancreatic carcinoma cells is RAC1 and NOX4-dependent and requires RAC1 and NOX4-dependent activation of p38 MAPK. *Oncology Reports*, 38(6), 3693–3701.

Witte, D., Otterbein, H., Förster, M., Giehl, K., Zeiser, R., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2017). Negative regulation of TGF- $\beta$ 1-induced MKK6-p38 and MEK-ERK signaling and epithelial-mesenchymal transition by Rac1b. *Scientific Reports*, 7, 17313.

Wong, M. C. S., Jiang, J. Y., Liang, M., Fang, Y., Yeung, M. S., & Sung, J. J. Y. (2017). Global temporal patterns of pancreatic cancer and association with socioeconomic development. *Scientific Reports*, 7(1), 3165.

Woodford-Richens, K. L., Rowan, A. J., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D. C., Wasan, H. S., Roylance, R. R., Bodmer, W. F., & Tomlinson, I. P. M. (2001). SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9719–9723.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., & Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature*, 370(6488), 341–347.

Wrighton, K. H., Lin, X., & Feng, X.-H. (2009). Phospho-control of TGF- $\beta$  superfamily signaling. *Cell research*, 19(1), 8–20.

Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P. G., Qiu, S., Evers, B. M., & Zhou, B. P. (2009). Stabilization of Snail by NF- $\kappa$ B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion. *Cancer cell*, 15(5), 416–428.

- Xie, L., Law, B. K., Chytil, A. M., Brown, K. A., Aakre, M. E., & Moses, H. L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF- $\beta$ 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 6(5), 603–610.
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*, 19(2), 156–172.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., & Zhang, Y. E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$ . *Molecular Cell*, 31(6), 918–924.
- Yan, X., Liu, Z., & Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(4), 263–272.
- Yanagisawa, M., Nakashima, K., Takeda, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Ueno, M., Takizawa, M., Shibuya, H., & Taga, T. (2001). Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(12), 1091–1099.
- Yang, W.-H., Lan, H.-Y., Huang, C.-H., Tai, S.-K., Tzeng, C.-H., Kao, S.-Y., Wu, K.-J., Hung, M.-C., & Yang, M.-H. (2012). Rac1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nature Cell Biology*, 14(4), 366–374.
- Ye, X., & Weinberg, R. A. (2015). Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 675–686.
- Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, 11(1), 28–39.
- Yu, J. H., & Kim, H. (2014). Oxidative stress and cytokines in the pathogenesis of pancreatic cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 19(2), 97–102.
- Yu, L., Hébert, M. C., & Zhang, Y. E. (2002). TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *The EMBO Journal*, 21(14), 3749–3759.
- Zamboni, G., Hirabayashi, K., Castelli, P., & Lennon, A. M. (2013). Precancerous lesions of the pancreas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(2), 299–322.
- Zarzynska, J. M. (2014). Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators of Inflammation*, 2014.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., & Bottinger, E. P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6686–6691.
- Zeeh, F., Witte, D., Gädeken, T., Rauch, B. H., Grage-Griebenow, E., Leinung, N., Fromm, S. J., Stölting, S., Mihara, K., Kaufmann, R., Settmacher, U., Lehnert, H., Hollenberg, M. D., & Ungefroren, H. (2016). Proteinase-activated receptor 2 promotes TGF- $\beta$ -dependent cell motility in pancreatic cancer cells by sustaining expression of the TGF- $\beta$  type I receptor ALK5. *Oncotarget*, 7(27), 41095–41109.

- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W. T., Roberts, A. B., Neilson, E. G., Sayegh, M. H., Izumo, S., & Kalluri, R. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine*, 13(8), 952–961.
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B. E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K.-A., Porter, J. A., Lu, C. X., & ten Dijke, P. (2012). USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- $\beta$  type I receptor. *Nature Cell Biology*, 14(7), 717–726.
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell research*, 19(1), 128–139.
- Zhang, Y. E. (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(2), a022129.
- Zhou, B., Der, C. J., & Cox, A. D. (2016). The role of wild type RAS isoforms in cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 58, 60–69.
- Zhou, C., Licciulli, S., Avila, J. L., Cho, M., Troutman, S., Jiang, P., Kossenkov, A. V., Showe, L. C., Liu, Q., Vachani, A., Albelda, S. M., & Kissil, J. L. (2013). The Rac1 splice form Rac1b promotes K-ras-induced lung tumorigenesis. *Oncogene*, 32(7), 903–909.
- Zhou, Z., Xie, J., Lee, D., Liu, Y., Jung, J., Zhou, L., Xiong, S., Mei, L., & Xiong, W.-C. (2010). Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Developmental Cell*, 19(1), 90–102.
- Zinn, R., Otterbein, H., Lehnert, H., & Ungefroren, H. (2019). RAC1B: A Guardian of the Epithelial Phenotype and Protector against Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells*, 8(12), 1569.
- Zuo, W., & Chen, Y.-G. (2009). Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity. *Molecular Biology of the Cell*, 20(3), 1020–1029.

## 7. Anhang

### 7.1 Publikationen & Stipendium

- 06/2020 Ungefroren, H., Kumarasinghe, A., Musfeldt, M., **Fiedler, C.**, Lehnert, H., & Marquardt, J. U. (2020). RAC1B Induces SMAD7 via USP26 to Suppress TGF $\beta$ 1-Dependent Cell Migration in Mesenchymal-Subtype Carcinoma Cells. *Cancers*, 12(6), 1545. <https://doi.org/10.3390/cancers12061545>
- 05/2019 Ungefroren, H.\* , Otterbein, H.\* , **Fiedler, C.**, Mihara, K., Hollenberg, M. D., Gieseler, F., Lehnert, H., & Witte, D. (2019). RAC1B Suppresses TGF- $\beta$ 1-Dependent Cell Migration in Pancreatic Carcinoma Cells through Inhibition of the TGF- $\beta$  Type I Receptor ALK5. *Cancers*, 11(5), 691 <https://doi.org/10.3390/cancers1105069>  
(\*geteilte Erstautorenschaft).
- 07/2017 Erhalt des Promotionsstipendiums „Lübecker Exzellenzmedizin“ P09-2107 durch die Forschungskommission Medizin der Universität zu Lübeck für die Bearbeitung dieses Promotionsvorhabens

#### **weitere Publikation (nicht Teil dieser Dissertation)**

---

Ungefroren, H., Witte, D., **Fiedler, C.**, Gädeken, T., Kaufmann, R., Lehnert, H., Gieseler, F., & Rauch, B. H. (2017). The Role of PAR2 in TGF- $\beta$ 1-Induced ERK Activation and Cell Motility. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2776. <https://doi.org/10.3390/ijms18122776>

## 8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer **Prof. Dr. Hendrik Ungefroren** für die Identifikation und das Überlassen des Promotionsthemas sowie die Bereitstellung des laborinternen Arbeitsplatzes, der Zelllinien und Materialien. Besonders bedanke ich mich für die intensive Betreuung, die Ratschläge und Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase der Dissertation sowie bei den Publikationen.

Ebenfalls danke ich **Prof. Dr. med. Jens U. Marquardt** für die finale Betreuung der Dissertation sowie **Prof. Dr. Dr. Hendrik Lehnert** für die Bereitsellung des Arbeitsplatzes und das Überlassen des Materials.

Ich bedanke mich bei der **Forschungskommission der Universität zu Lübeck** für die Unterstützung im Rahmen des Stipendiums „Lübecker Exzellenzmedizin“ *P09-2107*.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Onkologie bedanken, besonders **Heike Albrecht** und **Sylvia Grammerstorf-Rosche**, für die überaus freundliche Aufnahme in das Laborteam und die Einführung und Unterstützung bei allen experimentellen Bearbeitungsschritten sowie die vielen lieben und motivierenden Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation. Ebenfalls danke ich **Dr. David Witte** und **Dr. Hannah Otterbein** für die Vorarbeit auf diesem Gebiet und die Bereitstellung der bereits aufgearbeiteten Zellen.

Über die Maße möchte ich mich bei meiner geliebten Partnerin **Donya** für die unzähligen motivierenden Worte und Gesten, die emotionale Unterstützung sowie die immerwährende Liebe und Stärkung an meiner Seite bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Theresia und Andreas**, denen ich diese Arbeit widme sowie meinen geliebten Schwestern **Louisa und Caroline**, für die stete aufmunternde Unterstützung seit Beginn dieser Dissertation und den bedingungslosen, familiären Zusammenhalt.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Christian Fiedler  
Geburtsdatum, -ort: 02. Juli 1993 in Eutin



### Schulische Ausbildung

07/2004 bis 06/2013 Gymnasium Martin-Luther-Schule, Marburg  
07/2000 bis 06/2004 Grundschule Allnatal, Marburg

### Akademische Ausbildung

07/2020 Approbation als Arzt  
05/2019 bis 04/2020 praktisches Jahr (Pädiatrie in der Unikinderklinik Köln, Innere Medizin in der Bad Segeberger Klinik und Chirurgie im Kantonspital Herisau, Schweiz)  
12/2017 Stipendiat „Lübecker Exzellenzmedizin“ P09-2107 (Forschungskommission Medizin der Universität zu Lübeck)  
10/2015 bis 05/2020 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck  
10/2013 bis 10/2015 Studium der Humanmedizin, Georg-August-Universität Göttingen

### Beruflicher Werdegang

ab dem 01.07.2022 Assistenzarzt in Weiterbildung in der Klinik für Pädiatrische und Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
10/2020 -06/2022 Assistenzarzt in Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Köln

*C. Fiedler*

Hamburg, den 20. Dezember 2023