

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Lehnert

**Eine Analyse der Rolle des G-Protein-gekoppelten Rezeptors
Protease-Activated Receptor 2 bei der TGF- β 1-abhängigen Smad
Phosphorylierung, Transkriptionsaktivierung und
Proliferationsinhibition im Zellmodell des duktales
Pankreasadenokarzinoms**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Thomas Gädeken
aus Wilhelmshaven

Lübeck, 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Ungefroren

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Habermann PhD

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.09.2018

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AP	agonistisches Peptid
ALK5	Activin Receptor-Like Kinase 5
BMP	bone morphogenetic protein
CA	Cancer Antigen
cdk	cyclin dependent kinase
CEA	Cancinoembryonales Antigen
CRM	Circumferential Resection Margin
CT	Computertomographie
CTGF	connective tissue growth factor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	epidermal growth factor
EMT	Epithelial Mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FKS	fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluoruracil
GDF	growth differentiation factor
GS-Region	Glycin-Serin-Region
GTP	Guanosintriphosphat
IP	Co-Immunpräzipitation
kDA	kilo Dalton
KLK	Kallekrein abhängige Peptidase
M	Molekulargewichtsmarker
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MH	Mad Homology

MIS	Muellerian inhibiting substance
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaP	Natriumpyruvat
PAI-I	Plasminogen Aktivator Inhibitor I
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma cells
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PSG	Penicillin Streptomycin Gentamycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
RNA	Ribonukleinsäure
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SBE	smad binding element
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
smurf	smad ubiquitylation regulatory factor
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
TLR	Toll-Like Receptor
UICC	Union internationale contre le cancer
vs	versus
WB	Westernblot
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie der Krebserkrankungen.....	1
1.2	Das duktales Pankreaskarzinom.....	3
1.2.1	Histologie.....	3
1.2.2	Epidemiologie.....	3
1.2.3	Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.2.4	Klinik.....	5
1.2.5	Diagnostik.....	6
1.2.6	Tumorbiologie und Staging.....	7
1.2.7	Therapie.....	12
1.3	Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1).....	17
1.3.1	Allgemeine Informationen über TGF- β 1.....	17
1.3.2	Die TGF- β 1 Signaltransduktion.....	19
1.3.3	Smad-Protein unabhängige Signalwege über TGF- β 1.....	21
1.3.4	Die Funktion von TGF- β 1 als Tumorsuppressor und -induktor.....	22
1.3.5	Die TGF- β 1-induzierte epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	24
1.4	Der Protease Activated Receptor 2 (PAR2).....	25
1.5	Fragestellung dieser Arbeit.....	27
2	Materialien.....	29
2.1	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2	Laborgeräte.....	30
2.3	Chemikalien.....	31
2.4	Puffer und Lösungen.....	32
2.5	Zellkulturmedien und Zusätze.....	33
2.6	Zelllinien.....	34
2.7	siRNA.....	35
2.8	Antikörper.....	36
2.8.1	Primärantikörper.....	36
2.8.2	Sekundärantikörper.....	37
2.9	Sequenzen.....	37
2.9.1	Sequenzen der Rezeptorvektoren.....	37
2.9.2	Sequenzen von Expressionsplasmiden für die Zelltransfektion.....	37

3 Methoden und Durchführung	38
3.1 Behandlung der Zellen	38
3.1.1 Zellkultur	38
3.1.2 Kultivierung der Zellen.....	38
3.2 Zelllinien	39
3.2.1 Panc-1-Zelllinie	40
3.2.2 humane Keratinozytenzelllinie HaCaT.....	40
3.2.3 humane Mittelohrepithelzelllinie HMEEC.....	41
3.3 Transfektion der Tumorzellen mit siRNA und bakteriellen Plasmiden	41
3.3.1 Vorgehensweise.....	41
3.3.2 Durchführung/Protokoll.....	42
3.4 Western Blot.....	43
3.4.1 Funktionweise	43
3.4.2 Protokoll/Versuchsdurchführung.....	43
3.4.2.1 Proteinextraktion und Proteinbestimmung	44
3.4.2.2 Probenaufteilung und Proteindenaturierung	45
3.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	
.....	46
3.4.4 Transfer („Blotten“) der Proteine.....	47
3.4.5 Detektion der Proteine über Antikörperbindung	48
3.4.6 „Stripping“.....	49
3.4.7 Auswertung der Western Blots	50
3.5 Zellzählung.....	50
3.6 Assay zur Messung der Transkriptionsaktivität von TGF- β 1-/smadabhängigen	
Reporter genen	51
3.6.1 Funktionsprinzip	51
3.6.2 Protokoll	52
3.7 Co-Immunpräzipitation	53
3.7.1 Funktionsprinzip	53
3.7.2 Protokoll	55
3.8 Statistische Auswertung	57
3.8.1 Arithmetisches Mittel	57
3.8.2 Varianz und Standardabweichung.....	57
3.8.3 Signifikanzberechnung	58
3.8.4 Bioinformatrische Beratung	58

4 Ergebnisse.....	59
4.1 Auswirkung einer Depletion von PAR2 und ALK5 Protein auf die TGF- β 1 induzierte Smad-Phosphorylierung	59
4.2 Auswirkung einer Depletion von PAR2 und ALK5 auf die TGF- β 1 induzierte Transkriptionsaktivität von TGF- β 1-/smadabhängigen Reporter genen.....	62
4.3 Auswirkung einer Depletion von PAR2 und ALK5 Protein auf den TGF- β 1 induzierten Proliferationsarrest.....	65
4.3.1 Proliferationsinhibitionsversuch der Zelllinie Panc-1	66
4.3.2 Proliferationsinhibitionsversuch der Zelllinie HaCaT	67
4.3.3 Proliferationsinhibitionsversuch der Zelllinie HMEEC	69
4.4 Die Untersuchung der Art der Interaktion von PAR2 mit ALK5	70
5 Diskussion	74
6 Zusammenfassung	80
7 Literaturverzeichnis.....	81

Danksagung

Curriculum vitae

Publikationen der Dissertation

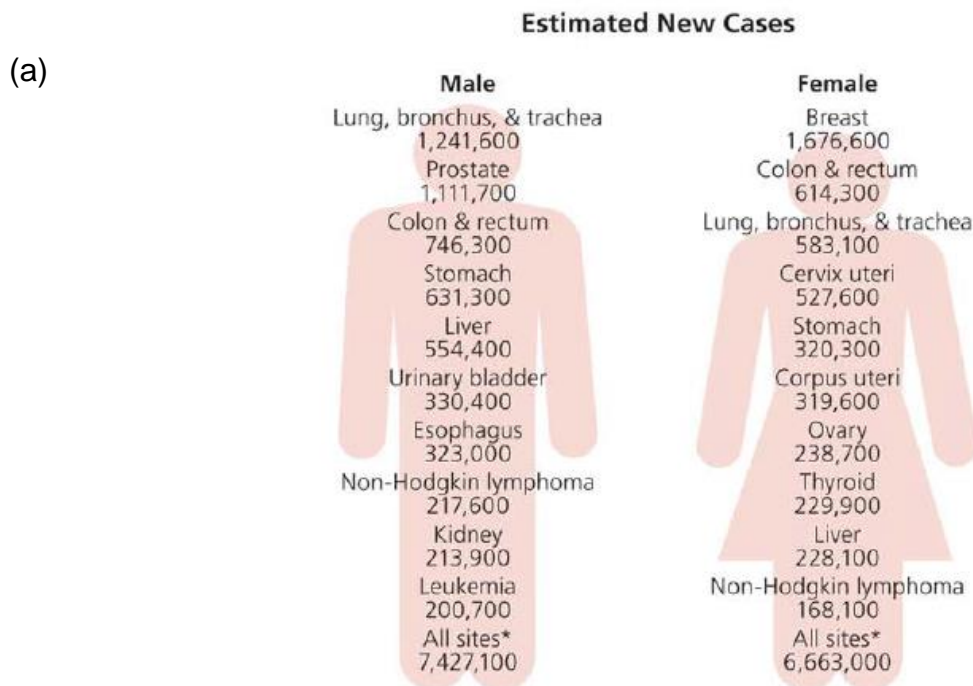
1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Krebserkrankungen

Krebserkrankungen nehmen gegenwärtig in der Todesstatistik einen immer größeren Stellenwert ein. Im Jahr 2012 wurden weltweit 14,1 Millionen neue Krebserkrankungen sowie 8,2 Millionen Todesfälle infolge einer Krebserkrankung registriert.

Weltweit zeigten sich bei Männern am häufigsten das Lungen-, Tracheal- und Bronchialkarzinom, gefolgt von Prostata- sowie Kolon- und Rektumkarzinomen (siehe Abb. 1 (a), links). Die häufigsten Todesfälle infolge einer Krebserkrankung bei Männern traten beim Lungen-, Bronchial- und Trachealkarzinom auf, gefolgt vom kolorektalen und Prostatakarzinom (siehe Abb. 1 (b), links).

Frauen erkrankten am häufigsten am Mamma-Karzinom, gefolgt vom kolorektalen sowie Bronchial-, Lungen- und Trachealkarzinom (Abb. 1 (a), rechts). Bei Frauen zeigten sich die häufigsten Todesfälle infolge einer Krebserkrankung in absteigender Häufigkeit beim Mamma-Karzinom, Lungen-, Bronchial und Trachealkarzinom sowie kolorektalen Karzinom (s. Abb. 1 (b), rechts).



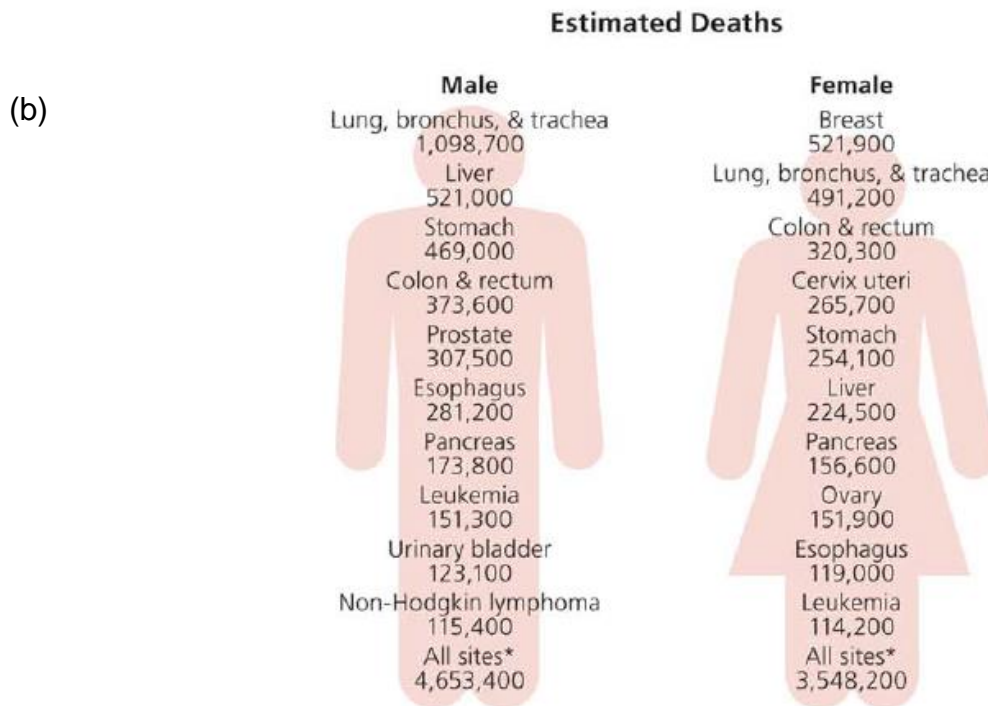


Abb. 1 (a) Darstellung der geschätzten Anzahl an Krebsneuerkrankungen im Jahr 2012 weltweit mit Aufteilung nach Geschlecht und Häufigkeit (exklusive nicht-melanomatöse Hauttumore) (aus Torre et al. 2015, modifiziert)

(b) Darstellung der geschätzten krebbsbedingten Todesfälle im Jahr 2012 weltweit aufgeteilt nach Geschlecht und Häufigkeit, exklusive nicht- melanomatöse Hauttumore (aus Torre et al. 2015, modifiziert)

Die Ätiologie vieler Krebserkrankungen ist oft nicht bekannt. Prävention und die Vermeidung von Risikofaktoren gelten als die effektivsten Maßnahmen zur Reduktion der Mortalität an Krebserkrankungen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass sich mehr als 30 % aller Krebserkrankungen durch eine flächendeckende Prävention verhindern ließen.

Als größte vermeidbare Risikofaktoren gelten der Tabak- und Alkoholkonsum sowie Bewegungsmangel und das metabolische Syndrom (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., 2015; Torre et al., 2015).

1.2 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)

1.2.1 Histologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) macht mit mehr als 80% aller Pankreasneoplasien aus. Weitere maligne Tumore sind azinäre Zellkarzinome und neuroendokrine Tumore, die jedoch eine deutlich geringere Anzahl darstellen. Mehr als 90% der duktales Pankreaskarzinome treten sporadisch auf und mehr als 75% von ihnen sind im Pankreaskopf, 15-20% im Pankreaskörper und 5-10% im Pankreasschwanz lokalisiert (Seufferlein et al., 2012).

1.2.2 Epidemiologie

Im Jahr 2012 konnten in Deutschland etwa 16.700 Neuerkrankungen an einem Pankreaskarzinom registriert werden (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., 2015). Auch international zeigte sich im Jahr 2012 in den entwickelten Ländern eine Fallrate von 94.700 Neuerkrankungen bei Männern sowie 93.100 Todesfälle infolge eines Pankreaskarzinoms. Bei den Frauen lag die Anzahl der Neuerkrankungen bei 92.800 und die dem Pankreaskarzinom zugrundeliegenden Todesfälle bei 91.300 in den entwickelten Ländern (Torre et al., 2015).

Die Sterberate ist bei Männern seit den 1990er Jahren fast unverändert, während bei den Frauen ein leichter Zuwachs zu registrieren ist.

Aufgrund der zunächst unspezifischen Symptome, wird das PDAC meist erst spät diagnostiziert. Die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland liegt bei Männern bei 8% und bei Frauen bei 9%. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Männern mit 71 Jahre und bei Frauen 75 Jahre (Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., 2015).

1.2.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die detaillierte Ätiologie zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist bis zum aktuellen Zeitpunkt noch weitestgehend ungeklärt.

Als gesicherter und einer der größten Risikofaktoren gilt das Zigarettenrauchen (Boyle et al., 1996). Dabei ist eine Abhängigkeit von der Anzahl der konsumierten Zigaretten pro Jahr („packyears“) mit der Häufigkeit des Auftretens eines Pankreaskarzinoms zu erkennen. 10-15 Jahre nach Beendigung des Rauchens sinkt das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken auf das Niveau eines stetigen Nichtraucher (Howe et al., 1991). Auch die genetische Disposition ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms (Jacobs et al., 2010). Das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, beträgt bei einer Verwandtschaft ersten Grades zu einem Erkrankten 4,7%. Wenn der Verwandte bereits vor dem 60. Lebensjahr erkrankte, so erhöht sich das Risiko auf 7,2%. Sind mehrere Verwandte betroffen, so steigt das Risiko sogar auf 12,3%. (Ghadirian et al., 2002).

Auch der Diabetes mellitus Typ II gilt als ein gesicherter Risikofaktor für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms (Huxley et al., 2005). Dabei korreliert die Gefahr der Entstehung umgekehrt proportional zur Dauer des Diabetes mellitus Typ II. Die höchste Gefahr der Entstehung besteht innerhalb des ersten Jahres nach Erstmanifestation des Diabetes mellitus Typ II (Ben et al., 2011). Als weitere Risikofaktoren gelten chronische Pankreatiden, erhöhter Konsum von Fett und Fleisch, afroamerikanische Abstammung, Adipositas, männliches Geschlecht, hohes Alter, sämtliche Blutgruppen außer Blutgruppe 0 (Vincent et al., 2011). Auch eine *Helicobacter pylorii* induzierte Gastritis wird als möglicher Risikofaktor diskutiert (Stolzenberg-Salomon et al., 2001).

Das familiäre Pankreaskarzinom kommt mit einer Häufigkeit von 4-10% aller Pankreaskarzinome vor. Es ist definiert als zwei Erkrankte mit einem Pankreaskarzinom in einer erstgradigen Verwandtschaftsbeziehung. Dabei nimmt die Inzidenz mit der Anzahl der an einem Pankreaskarzinom Erkrankten innerhalb einer erstgradigen Verwandtschaftsbeziehung zu. Wenn 2 Erkrankte in einer Familie vorkommen, so beträgt das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, das 6,4-fache. Wenn 3 oder mehrere in einer erstgradigen Verwandtschaftsbeziehung betroffen sind, so besteht sogar ein 32-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko weiterer erstgradiger Familienmitglieder (Klein et al., 2004; Matsubayashi et al., 2017).

Auch einige hereditäre Syndrome gehen mit einer erhöhten Ausbildung eines Pankreaskarzinoms einher, welche nicht der näheren Definition des familiären Pankreaskarzinoms entsprechen. Diese sind das Peutz-Jeghers-Syndrom (Giardiello et al., 2000), hereditäre Pankreatitis (Whitcomb et al., 1999), familiär atypisch multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom (Vasen et al., 2000; Lynch et al., 2008), hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom (Brose et al., 2002; Murphy et al., 2002), Lynch Syndrom (Kostrinos et al., 2009) und die familiäre adenomatöse Polyposis (Giardiello et al., 1993) (siehe Tabelle 1).

Hereditäre Syndrome	Kumulatives Risiko eines Pankreaskarzinoms
Peutz-Jeghers Syndrom	11%-36%
Hereditäre Pankreatitis	40%-55%
familiär atypisch multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom	17%
hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom	2%-7%
Lynch Syndrom	4%

Tab. 1: Hereditäre Syndrome und ihr kumulatives Risiko der Ausbildung eines Pankreaskarzinoms (aus Matsubayashi et al., 2017, modifiziert)

1.2.4 Klinik

Die Symptome beim Pankreaskarzinom sind sowohl in frühen als auch in späteren Stadien sehr unspezifisch. Viele Betroffene zeigen erst dann Symptome, wenn die Erkrankung bereits sehr fortgeschritten ist. Die Patienten verspüren Schmerzen im Rücken oder Abdomen und auch das Auftreten eines malignen Symptomkomplexes (B-Symptomatik) mit ungewolltem Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichts in den letzten 6 Monaten, Nachtschweißigkeit und unklare Fieberzustände sind bei ihnen häufig zu erkennen. Oftmals tritt im Verlauf eine Kachexie sowie bei Tumorwachstum eine Obstruktion der gallenableitenden Wege mit schmerzlosem Ikterus auf.

Auch eine Pankreatitis und Magenausgangsstenose durch Tumorkompression kann zu Übelkeit mit Erbrechen und Dyspepsie führen (Vincent et al., 2011). Das Auftreten einer Thrombose kann sowohl einer Diagnose eines Pankreaskarzinoms vorausgehen als auch im Krankheitsverlauf auftreten. Bei 17,4% aller Patienten mit einem Pankreaskarzinom konnte im Verlauf der Erkrankung eine Thrombose diagnostiziert werden (Rickles und Edwards, 1983).

Bei etwa 40% der Patienten kann bei Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms eine Glukosetoleranzstörung sowie bei 25% sogar ein Diabetes mellitus festgestellt werden (Pannala et. al., 2008; Chiari et al., 2008).

1.2.5 Diagnostik

In einer Anamneseerhebung können die oben genannten Symptome zumindest Anlass auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung geben. In einer nachfolgenden körperlichen Untersuchung zeigt der Patient häufig bei bereits fortgeschrittener Erkrankung einen kachektischen Habitus sowie gegebenenfalls einen schmerzlosen Ikterus auf.

Häufig fällt dann eher zufällig in einer Sonographie des Abdomens eine echoarme Raumforderung im Pankreas auf, welche Anlass zu einer weiteren Diagnostik gibt. Dabei können Raumforderungen unter einem Zentimeter oft übersehen werden. Auch die Beurteilung anderer Organe zum Nachweis einer Metastasensuche kann durch die Sonographie genutzt werden. Es schließt sich eine Computertomographie des Abdomens (CT-Abdomen) an zur detaillierten Tumorsuche und ggf. Absiedelung von Tochtergeschwülsten.

Hierbei kann auch durch Verabreichung eines Kontrastmittels und dreidimensionaler Darstellung eine verbesserte Visualisierung vorhandener Raumforderungen erfolgen. Auch eine CT-gesteuerte Punktion ist möglich, wobei eine Tumorzellverschleppung unbedingt vermieden werden muss.

Auch eine Koloskopie, Endosonographie, Ösophagogastroduodenoskopie sowie eine endoskopisch-retrograde-Cholangiopancreatikographie (ERCP) zur Darstellung der gallenableitenden Wege und des Pankreasganges mit Kontrastmittel sind wichtige Bestandteile in der Diagnostik eines Pankreaskarzinoms und dem Aufsuchen von Metastasen.

Eine MRT-Untersuchung kann zusätzlich zur Computertomographie eingesetzt werden, um Tumormetastasen aufzusuchen oder Gewebe besser voneinander zu differenzieren (z.B. maligner Tumor *versus* entzündetes Gewebe). Hierbei kann auch eine detaillierte Darstellung des Gallen- sowie des Pankreasgangs über eine Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) dargestellt werden. Zur weiteren Metastasensuche und Gewebedifferenzierung zwischen malignen Raumforderungen und gesundem Gewebe kann die Positronenemissionstomographie (PET) beitragen, in der maligne Zellen durch einen erhöhten Metabolismus der radioaktivmarkierten und am meisten verwendeten ¹⁸F-Fluor-desoxyglukose dargestellt werden können. Oft wird diese mit einer Computertomographie als PET-CT kombiniert, um tumorsuspekte Raumforderungen lokal besser zuordnen zu können.

Die eigentliche Diagnosestellung liefert der histologische Nachweis der Tumorzellen. Im Rahmen einer Laparoskopie oder offenen Operation können nach Entfernung des Tumors Zellen histologisch aufbereitet und anschließend begutachtet werden.

Vor Entfernung oder sonstiger Therapie des Tumors sollten in einer Blutentnahme die Tumormarker bestimmt werden. Hierbei sind bei Tumoren, deren Ursprung aus dem Pankreasgang hervorgehen, die Tumormarker CA 19-9 (CA = Cancer antigen) sowie das carcinoembryonale Antigen (CEA) erhöht. Die Tumormarker dienen vorwiegend zur Beurteilung während der Behandlung sowie in der Verlaufskontrolle und weniger als Suchmarker, da sie unter anderem auch bei Entzündungen des Pankreas` erhöht sein können.

Zur weiteren Metastasensuche sollte auch ein Röntgen des Thorax sowie eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden, um potenzielle Metastasen frühzeitig zu erkennen (Vincent et al., 2011; Schmoll et al., 2006; <https://www.krebsgesellschaft.de/>).

1.2.6 Tumorbiologie und Staging

Mehr als 80 % der duktaalen Pankreaskarzinome haben Mutationen im KRAS-Gen (überwiegend G12V- und G12D- Mutationen). In einem Mausmodell konnte dargestellt werden, dass die Mutation im Gen BRCA2 die Karzinonogenese über

die KRAS- Mutation fördert. Dies zeigte sich auch gehäuft beim familiären Pankreaskarzinom (Skoulidis et al., 2010; Matsubayashi et al., 2017).

Mehr als 90 % der duktaalen Pankreaskarzinome haben Deletionen, Mutationen oder epigenetische Alterationen im CDKN2 Gen.

Jeweils ca. 50% der Fälle weisen Mutationen im Tumorsuppressor-Gen p53 und eine homozygote Deletion oder Mutation im DPC4/Smad4 Gen auf (Seufferlein et al., 2012). Das Pankreaskarzinom hat seinen häufigsten Ursprung in der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN). Die PanIN haben eine Größe von max. 5 mm und sind in der Pankreasbildung nicht direkt sichtbar.

Molekulare Marker für PanINs sind Gegenstand aktueller Forschung und können zukünftig das Auftreten und den Grad der PanINs im Rahmen der Diagnostik bestimmen (Kelly et al., 2008; Matsubayashi et al., 2006). Man unterscheidet low-grade PanINs, welche häufig in höherem Alter auftreten, und high-grade PanINs, die häufig in invasiven Pankreaskarzinomen vorkommen. PanINs entstehen durch genetische Alterationen und die Prävalenz steigt mit der Anzahl der zytologischen und morphologischen Atypien in den PanINs (Vincent et al. 2011; Hruban et al., 2008; Hruban et al., 2000).

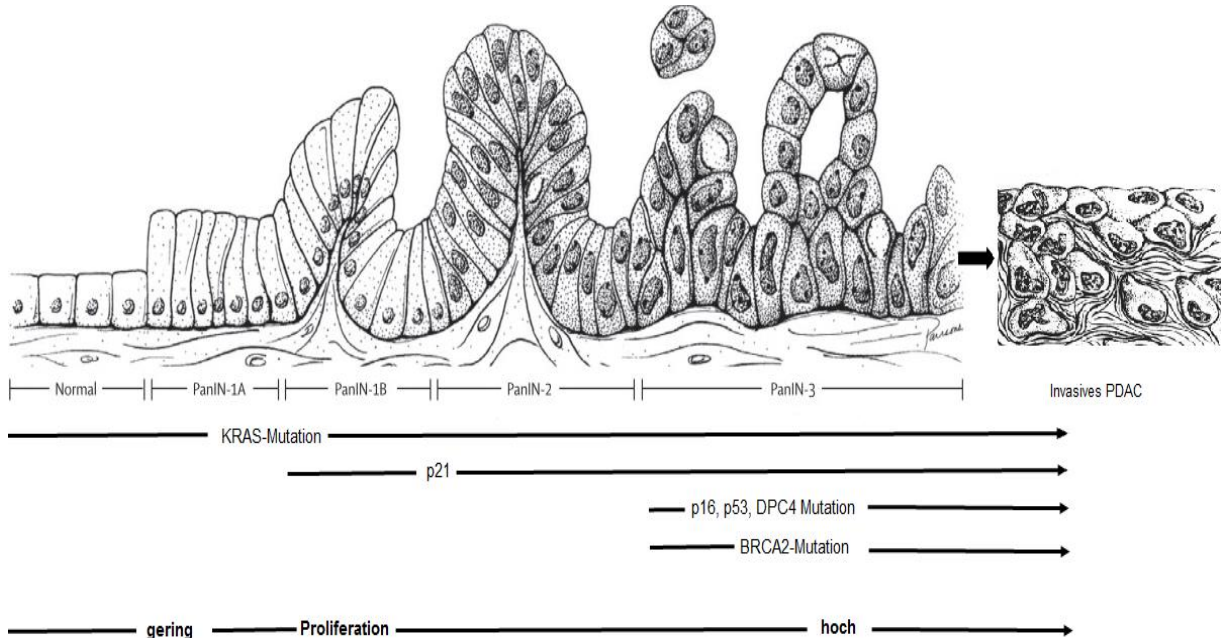


Abb. 2: Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) und genetische Veränderungen: Darstellung eines Tumorprogressionsmodells mit Genmutationen, histopathologische Skizzierung und Proliferationsgrad (<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0140673610623070-gr2.jpg>, letzter Zugriff: 18.03.2018, modifiziert)

Es gibt weiterhin papillär-muzinöse Neoplasien, die seltener Vorläufer eines invasiven Pankreaskarzinoms sind. Sie sind lange zystische Neoplasien (ca. 5mm), die aufgrund verbesserter Bildgebung zunehmend diagnostiziert werden (de Jong et al., 2010; Laffan et al., 2008; Hruban et al., 2004). Sie werden als low, intermediate und high grade Dysplasie (Carcinoma in situ) eingeteilt (Vincent et al., 2011).

Die muzinös zystische Neoplasie kommt eher bei Frauen vor und besteht aus muzinproduzierenden Epithelzellen, welche mit den ovarientypischen Stromazellen assoziiert sind. Ca. ein Drittel von neoplastischen Vorläuferzellen haben eine Assoziation zu einem invasiven Pankreaskarzinom (Vincent et al., 2011; Hruban et al., 2006).

Im Folgenden wird die histopathologische Tumoreinteilung des duktales Pankreaskarzinoms zum Staging vorgestellt.

Tumorstadium des Primärtumors nach TNM-Klassifikation (T-Stadien) (Vincent et al., 2011):

Tumorstadium (T-Stadium)	Definition
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Tumorfrei
Tcis	Carcinoma in situ
T1	Tumorgröße ≤ 2 cm
T2	Tumorgröße ≥ 2cm
T3	Wachstum über das Pankreas hinaus
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus bzw. die Arteria mesenterica superior (nicht resektabel)
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0-N1	Regionale Lymphknoten: N0 = Nein, N1 = Ja
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0-M1	Fernmetastasen: M0 = Nein, M1 = Ja

Tab. 2: Tabelle mit Stadien der TNM Klassifikation nach WHO-Klassifikation 2010 (Vincent et al., 2011, <http://www.uniklinik-uhl.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/pankreaskarzinom.html>, letzter Aufruf: 10.10.2016, modifiziert)

Laut S3-Linie des Pankreaskarzinoms soll zusätzlich eine Einteilung nach der international gültigen R (R= Residualtumor)- Klassifikation erfolgen. Hierbei wird in Analogie zur Klassifikation des Rektumkarzinoms die Integration des Konzeptes des zirkumferentiellen Resektionsrandes (Circumferential Resection Margin = CRM) empfohlen. Hierbei wird das resezierte Pankreaskarzinom im R0-Resektionsstadium als CRM positiv klassifiziert, wenn der Abstand der Tumorzellen zum Resektionsrand unter 1mm beträgt, jedoch nicht bis zum Resektionsrand reicht. In diesem Fall lautet die Befundung: R0, CRM positiv (auch als narrow bezeichnet) oder R0, narrow (siehe auch Tab. 2). Beträgt der Abstand der Tumorzellen mehr als 1mm vom Resektionsrand, so wird die Klassifikation als CRM negativ bezeichnet. Die Befundung lautet demnach: R0, CRM negativ (siehe auch Tab 2) (S3-Leitlinienprogramm Onkologie, 2013).

R-Klassifikation mit CRM-Klassifikation	Definition
RX	Residualtumor ist nicht bestimmbar
R0, CRM positiv (+) oder R0, narrow	Tumorfreier Rand, Tumorzellen am CRM < 1mm
R0, CRM negativ	Tumorfreier Rand, Tumorzellen am CRM > 1mm
R1	Tumor überschreitet Resektionsrand

Tab. 3: Internationale R-Klassifikation kombiniert mit dem Konzept des zirkumferentiellen Resektionsrandes (CRM)

Die Tumorstadieneinteilung nach der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC = Union internationale contre le cancer) stellt den wichtigsten Prognoseparameter des Pankreaskarzinoms nach Resektion dar (S3-Leitlinienprogramm Onkologie, 2013; Vincent et al., 2011).

Stadium UICC 2010	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1-T3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 4: Tumorstadieneinteilung der UICC 2010 unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation (<http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/pankreaskarzinom.html>, letzter Aufruf: 10.10.2016, modifiziert)

Patienten, die bei Diagnosestellung in den Stadien 0 bis IIB erkrankt werden, betragen lediglich ca. 10% aller Fälle. Das mittlere Überleben in diesen Stadien beträgt etwa 17-23 Monate.

Bei Patienten im Stadium III gibt es zwei Kategorien. Ca. 10 % aller Patienten, die an einem Pankreaskarzinom leiden, erreichen das Stadium III, wobei der Tumor den Truncus coeliacus bzw. die Arteria mesenterica superior nicht mehr als 180° umschließen und auch keine sonstige Infiltration in venöse oder arterielle Systeme vorliegen darf. In diesem Fall beträgt das mittlere Überleben etwa 20 Monate.

Bei Patienten im Stadium III mit Tumorausdehnung von mehr als 180° um den Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior (ca. 30% aller Erkrankungsfälle bei Diagnosestellung) beträgt das mittlere Überleben ca. 8-14 Monate.

Im Stadium IV befinden sich bis zu 60% aller Patienten bei Diagnosestellung und haben eine mittlere Überlebenszeit von etwa 4-6 Monate (Vincent et al., 2011).

Im histologischen Befund der Pathologie werden zusätzlich Angaben zu Tumorgrading, Lymphgefäßinvasion, Perineuralscheideninfiltration und Blutgefäßinvasion gemacht (Seufferlein et al., 2014; S3-Leitlinie Onkologie, 2010; Massucco et al., 2009; Riediger et al., 2009; Verbeke, 2008; Slidell et al., 2008).

1.2.7 Therapie

Das PDAC wird meistens aufgrund initial unspezifischer Symptome und früher Metastasierung erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert, daher ist eine kurative Therapie häufig nicht mehr möglich. Jeder Patient sollte zu Beginn in einem interdisziplinären Tumorboard zur Festlegung der weiteren Therapie diskutiert werden (Vincent et al., 2011).

Die Chirurgie ist bei resektablen Tumoren die einzig kurative Therapie. Eine vorherige Laparoskopie kann für das Staging von großer Bedeutung sein, wenn bildgebende Verfahren keine eindeutigen Befunde liefern oder der Verdacht einer Peritonealkarzinose vorliegt.

Das anstrebende Ziel einer Operation ist immer die Resektion des Tumors mit ausreichendem und tumorzellfreiem Sicherheitsabstand (R0-Resektion nach den Kriterien der UICC).

Wenn der Tumor den Truncus coeliacus oder die Arteria mesenterica superior infiltriert, sollte der Tumor nicht mehr rezidiert werden. Eine Resektion ginge dann mit einer erhöhten perioperativen Morbidität und Mortalität einher, ohne das Überleben zu verbessern (Seufferlein et al., 2012; Ouaiissi et al., 2010). Wenn es zu einer Infiltration der Vena portae und Vena mesenterica superior kommt, zeigt sich die Mortalität und Morbidität bei Resektion des Tumors mit Segmenten der Venen nicht höher im Vergleich zu einer bloßen Resektion des Tumors (Wagner et al., 2004; Bachellier et al., 2001).

Eine operative Therapie ist vor allem bei Patienten im Stadium I und II vorteilhaft. Bei älteren Patienten oder Patienten mit erhöhter Komorbidität ist gegebenenfalls eine alternative Therapie zu wählen. Ist der Tumor im Pankreaskopf gelegen, so kann eine partielle (Whipple-Operation) oder eine pyloruserhaltene Pankreatikoduodektomie erfolgen (Seufferlein et al., 2012). Dabei zeigt eine pyloruserhaltene Therapie keinen Überlebensvorteil (Diener et al., 2011). Bei einer kompletten Resektion des Pankreas` kommt es zu einem pankreopriven Diabetes mellitus, so dass eine dauerhafte postoperative Insulintherapie sowie eine orale Substitution der Verdauungsenzyme notwendig werden. Bei Pankreasteilresektionen muss eine Substitutionstherapie nicht obligat sein. Wenn sich der Tumor im Pankreaskörper oder Pankreasschwanz befindet, so ist eine distale Pankreatektomie mit Splenektomie notwendig.

Eine Lymphadenektomie beim Pankreaskarzinom zeigt keinen Hinweis auf einen Überlebensvorteil. Die übliche Lymphadenektomie umfasst die Regionen des hepatoduodenales Ligamentes, der Arteria hepatica communis, der Portalvene, der rechtsseitige Abschnitt des Truncus coeliacus sowie der Arteria mesenterica superior (Seufferlein et al., 2012).

Bei einer R0-Resektion eines Pankreaskarzinoms im Stadium I, II oder III sollte eine adjuvante Chemotherapie erfolgen. Dies verbessert die 5-Jahres-Überlebensrate um 20,7% vs. 10,4% im Vergleich zu einer alleinigen chirurgischen Therapie ohne Chemotherapie (Oettle et al., 2013). Als adjuvante Chemotherapeutika gelten entweder Gemcitabin oder 5-Fluorouracil (5-FU). Das Gemcitabin zeigt hierbei eine verbesserte Verträglichkeit mit geringerer mukosaler Toxizität, jedoch mit vermehrter Thrombozytopenie als 5-FU (Oettle et al., 2007). Eine adjuvante Chemotherapie wird analog zum kolorektalen Karzinom ca. 6 Wochen postoperativ begonnen und sollte für 6 Monate durchgeführt werden (Seufferlein et al., 2014).

Ein Beginn der adjuvanten Chemotherapie erst 12 Wochen postoperativ zeigte jedoch keine verringerte Überlebensrate im Vergleich zum sechswöchigen Beginn postoperativ (Valle et al., 2014).

Nach einer R1-Resektion eines duktales Pankreaskarzinoms mit Gemcitabin oder 5-FU über 6 Monate kam es zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebensrate (median overall survival 22,1 versus 14,1 Monate) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne adjuvante Chemotherapie nach Resektion (Oettle et al., 2007).

Eine adjuvante Radiochemotherapie sowohl bei R0- als auch R1-Resektion sollte außerhalb von randomisiert kontrollierten Studien nicht durchgeführt werden, da sie bisher keinen Überlebensvorteil nachweisen konnten (Seufferlein et al., 2014; Neoptolemos et al., 2004; Kalser, 1985).

Bei lokal fortgeschrittenen und inoperablen duktales Pankreaskarzinomen kann eine Kombination aus initialer Chemotherapie mit anschließender Strahlentherapie erfolgen, da der Tumor durch die erste Behandlungskomponente für die Strahlentherapie sensibilisiert wird. In der LAP07-Studie konnte jedoch zu diesem Tumorausmaß kein Überlebensvorteil in einer Radiochemotherapie im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin erbracht werden (Seufferlein et al., 2014;

Hammel et al., 2013). In dieser Hinsicht werden weitere Ergebnisse von Studien in naher Zukunft erwartet.

Bei einem bereits metastasierten oder lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom sollte eine palliative Chemotherapie erfolgen, da es das Langzeitüberleben verlängert und zugleich die Lebensqualität verbessern kann (Seufferlein et al., 2014; Sultana et al., 2007). Hierbei sollte jedoch bei der Therapieentscheidung natürlich auch der Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt werden (Karnofsky Index <70%, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Status >2) und gegebenenfalls eine Chemotherapie ausbleiben (Seufferlein et al., 2014).

Karnofsky-Index

100	Normalzustand, keine Beschwerden keine Manifeste Erkrankung
90	Normale Leistungsfähigkeit, minimale Krankheitssymptome
80	Normale Leistungsfähigkeit mit Anstrengung, geringe Krankheitssymptome
70	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, arbeitsunfähig, kann sich selbst versorgen
60	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, benötigt gelegentlich fremde Hilfe
50	Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, braucht krankenschwermäßige und ärztliche Betreuung, nicht dauernd bettlägerig
40	Bettlägerig, spezielle Pflege erforderlich
30	Schwer krank, Krankenhauspflege notwendig
20	Schwer krank, Krankenhauspflege und supportive Maßnahmen erforderlich
10	Moribund, Krankheit schreitet schnell fort
0	Tod

Abb. 3: Karnofsky-Index (http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/scores/performance_status/, letzter Zugriff 15.12.2016, modifiziert)

ECOG Status

Grad	Aktivitätsstatus
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung.
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit bzw. Arbeit im Sitzen (z.B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich.
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen.
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden.
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden.
5	Tod

Abb. 4: Eastern Co-operative Oncology Group (ECOG)-Status (http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/scores/performance_status/, letzter Zugriff 15.12.2016, modifiziert)

Eine Mono-Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom mit Gemcitabin in diesem Stadium weist eine 1-Jahresüberlebensrate von 18-20% aus (Sultana et al., 2007) und erfüllt damit dem Empfehlungsgrad B.

Eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und dem *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib erhöhte das Gesamtüberleben auf 6,24 vs. 5,91 Monate bei einer Monotherapie mit Gemcitabin (siehe auch Abb. 4). Die Erlotinibapplikation kann etwa 8 Wochen nach Therapiebeginn eingestellt werden, da eine weitere Gabe keinen weiteren Überlebensvorteil für den Patienten aufweist (Moore et al., 2007).

Eine Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom kann nach dem Folforinox-Protokoll (5-FU, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) bei Patienten mit geringem Risikoprofil und gutem Allgemeinzustand (Alter < 75 Jahre, ECOG 0-1, Bilirubin <1,5-fach des oberen Normwertes) eingesetzt werden. Hierbei kommt es zu einem deutlichen Überlebensvorteil gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin (medianes Überleben 11,1 vs. 6,8 Monate) (siehe auch Abb. 4) (Seufferlein et al., 2014; Conroy et al., 2011).

Eine weitere Kombinationstherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom ist Gemcitabin mit nab-Paclitaxel, welche das progressionsfreie Überleben (=PFS, 5,5 vs. 3,7 Monate) und Gesamtüberleben (8,5 Monate vs. 6,7 Monate) deutlich verbessert (siehe auch Abb. 4).

In dieser Kombination gab es jedoch vermehrte Hämatoxizität, Neuropathie und Diarrhoe (Seufferlein et al., 2014).

TABELLE						
Neue randomisiert-kontrollierte Studien zu Kombinationschemotherapien mit einem Überlebensvorteil in der Palliativsituation im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie						
Referenz	N	Therapie-Regime	progressionsfreies Überleben	Gesamtüberleben	1-Jahres-Überlebensrate	EBM-Grad
Moore 2007 (35)	569	Gemcitabin + Erlotinib versus Gemcitabin	3,75 versus 3,55 Monate (HR 0,77, p = 0,004)	6,24 versus 5,91 Monate (HR 0,82, p = 0,038)*	23 versus 17 % (p = 0,023)*	1b
Conroy 2011 (36)	342	Folfinirox versus Gemcitabin	6,4 versus 3,3 Monate (HR 0,47, p < 0,001)	11,1 versus 6,8 Monate (HR 0,57, p < 0,001)	48 versus 21 % (p < 0,001)	1b
Von Hoff 2013 (37)	861	Gemcitabin + nab-Paclitaxel versus Gemcitabin	5,5 versus 3,7 Monate (HR 0,69, p < 0,001)	8,5 versus 6,7 Monate (HR 0,72, p < 0,001)	35 versus 22 % (p < 0,001)	1b

* in der Subgruppenanalyse Gesamtüberleben für Patienten mit Rash \geq Grad 2 10,5 Monate (HR 0,74, p = 0,037) und 1-Jahresüberlebensrate 43 % (p < 0,001). HR, Hazard Ratio

Abb. 5: Studienvergleiche der Kombinationschemotherapie in der Palliativsituation im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie (aus Seufferlein et al., 2014)

In einer neuen Studie zeigte sich eine neoadjuvante Chemotherapie und anschließender Resektion im klinischen Stadium I und II des duktales Pankreaskarzinoms im Pankreaskopf mit einem erhöhten medianen Langzeitüberleben (26 Monate vs. 21 Monate) gegenüber einer Tumorresektion mit adjuvanter Chemotherapie. Es zeigte sich auch ein verminderter Tumorzellnachweis in den Lymphknoten sowie im Sicherheitsabstand des Gewebes bei Resektion (Mokdad et al., 2016). Die neoadjuvante Chemotherapie ist derzeit Gegenstand weiterer klinischer Studien, so dass eine Veränderung der aktuellen Leitlinientherapie eines Pankreaskarzinoms in Zukunft zu erwarten ist.

Kommt es bei Patienten im Verlauf zu einem Ikterus durch Gallenabflussbehinderungen bei mechanischer Kompression durch den Tumor auf die Gallenwege, so gibt es die endoskopische Einlage eines Stents zur Aufrechterhaltung des Gallenabflusses. Dies geht mit einer geringeren Komplikationsrate als die perkutane Stenteinlage mit externer Drainage einher und ist ähnlich erfolgreich wie eine biliodigestive Anastomose (Seufferlein et al., 2012; Moss et al., 2006).

Bei Patienten mit gutem Habitus wird eine parenterale Ernährung nicht grundsätzlich laut Leitlinien der *European Society of Clinical Nutrition and Metabolism* empfohlen, da es keinen Überlebensvorteil bietet und zu einer

erhöhten Morbidität führt (Bozzetti et al., 2009). Bei einer Progression einer Tumorkachexie zeigt sich jedoch eine zusätzliche parenterale Ernährung als vorteilhaft und ist daher zu empfehlen (Pelzer et al., 2010).

Ca. 5 % der Patienten weisen eine duodenale Obstruktion mit Magenentleerungsstörung auf. Hierbei können prokinetische Medikamente (z.B. Metoclopramid) oder auch die endoskopische Einlage von expandierenden Metallstents weiterhelfen. Bei größerer Obstruktion kann auch eine Gastroenterostomie oder bei Beteiligung distaler Darmabschnitte auch die Anlage eines Anus praeter notwendig sein. Auch die Einstellung einer adäquaten Analgesie sollte im Vordergrund stehen.

Zusätzlich können bei ausgewählten Patienten mit medikamentös schwer einstellbaren Schmerzen eine hypofraktionierte Radiotherapie des Tumors oder eine Blockade des Plexus coeliacus durchgeführt werden (Seufferlein et al., 2012).

Zur Verlaufskontrolle und Rezidivbestimmung sollte präoperativ der Tumormarker CA 19-9 bestimmt werden. Anschließend sollte der Tumormarker alle 3 Monate für 2 Jahre bestimmt sowie ein CT-Abdomen alle 6 Monate durchgeführt werden. Dieses Vorgehen lässt eine frühzeitige Bewertung des Therapieerfolges zu sowie die Entstehung eines Rezidivs erkennen (Seufferlein et al., 2012).

Die Prognose eines Pankreaskarzinoms ist im Vergleich zu anderen Tumoren eher schlecht. Trotz einer frühen Diagnosestellung mit anschließender R0-Resektion und Chemotherapie beträgt die 5-Jahresüberlebensrate unter 20%. Das Pankreaskarzinom zeichnet sich leider auch durch eine erhöhte Chemoresistenz aus, worauf die oft infauste Prognose zusätzlich zurückzuführen ist (Vincent et al., 2011).

1.3 Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)

1.3.1 Allgemeine Informationen über TGF- β 1

Die Superfamilie des *transforming growth factor β* (TGF- β) wurde bei der Suche nach autokrinen Signalmolekülen von Tumorzellen zur Förderung der Transformation entdeckt (Roberts et al., 1981).

Bereits frühzeitig zeigte sich die bedeutende Funktion von TGF- β 1 und die ihnen verwandten *bone morphogenetic proteins* (BMP) in entscheidenden Entwicklungsprozessen einer Zelle und verursachten im mutierten Zustand eine große Zahl von Krankheiten. So sind sie an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellentwicklung sowohl in embryonalem als auch in reifem Gewebe von besonderer Bedeutung (ten Dijke et al., 2002; Patterson und Padgett, 2000; Massagué et al., 2000). Die TGF- β -Superfamilie kommt in sämtlichen Tieren vor und stellt eine der größten sezernierten Proteinfamilien dar (Wrana, 2013). Beim Menschen sind über 30 der Proteine der TGF- β -Superfamilie bekannt. Sie zeichnen sich durch sechs konservierte Cystein-Reste aus, die wiederum durch 42 offene Leseraster in der menschlichen Desoxyribonukleinsäure (DNS) codiert sind. Es gibt zwei Subfamilien: die TGF- β /Activin-Subfamilie sowie die BMP (*bone morphogenetic protein*), GDF (*growth and differentiation factor*) und MIS (*Muellerian inhibiting substance*) Subfamilie, welche durch eine ähnliche Sequenz und durch den Weg der Signalkaskade determiniert sind. Dabei zeigt sich die aktive Form als ein durch hydrophobe Interaktionen stabilisiertes Dimer, welches noch zusätzlich durch eine Disulfidbrücke als Untereinheit stabilisiert wird (Shi und Massagué, 2003). TGF- β 1 ist ein pleiotroper Wachstumsfaktor, da er viele Funktionen hat und in unterschiedlichem Ausmaß Proliferation, Lokomotion und Differenzierung von Zellen beeinflusst. TGF- β 1 hat eine antimitogene sowie proapoptotische Wirkung und ist an der Regulation der Bildung extrazellulärer Matrix beteiligt (Shi und Massagué, 2003; ten Dijke et al., 2002; Roberts und Sporn, 1990). Eine Überexpression von TGF- β 1 in einem Pankreaskarzinom kann die Aggressivität der Erkrankung erhöhen und das Überleben verkürzen (Wagner et al., 1999). Dies geschieht durch die Förderung von Angiogenese, Migration der Tumorzellen, Invasion und Metastasierung (Miyazono et al., 2012; Ikushima und Miyazono, 2010; Padua und Massagué, 2009; Schniewind et al., 2007). Die wichtige Bedeutung von TGF- β im duktalem Pankreaskarzinom ist auch daran erkennbar, dass sein Signaltransduktionsweg in 100% der Fälle mit mindestens einer Mutation genetisch verändert ist (Jones et al., 2008).

1.3.2 Die TGF- β 1-Signaltransduktion

TGF- β 1 leitet seine Signale über transmembranöse Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren in die Zelle. Intrazellulär gibt es dann unterschiedliche Signalkaskaden, die auch mit Signalkaskaden anderer Rezeptoren interagieren. Bei der Bindung von TGF- β 1 gibt es zwei Rezeptoren, den Typ I- und den Typ II-Rezeptor (Massaguè et al., 1998). Die Bindung von TGF- β 1 induziert eine Formation eines Heterotetramers, welches aus zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren besteht. Anschließend kommt es durch den aktivierten Typ II-Rezeptor zu einer Phosphorylierung an einem regulatorischen Segment mit Glycin-Serin-reicher Region (GS-Region) am Typ I-Rezeptor (Huse et al., 1999). Hierdurch kommt es durch die phosphorylierte Region am Typ I-Rezeptor zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der Rezeptor-aktivierten Smad-Proteine (R-Smad) (Attisano and Wrana, 2002). Die acht bekannten Smad-Proteine bestehen aus den Untereinheiten MH (Mad Homology)-1 und MH-2 (Shi et al., 1998). Sie bilden den wichtigsten Hauptweg der TGF- β -induzierten intrazellulären Signalkaskade. Sie unterteilen sich in drei Smad-Gruppen: R-Smads (regulated Smads, bei Aktivierung erfolgt eine C-terminale Phosphorylierung, Smad 1-3, 5, 8), Co-Smads (common-mediator-Smad, Interaktion mit anderen Smad-Proteinen, Smad4) und I-Smads (inhibitory Smads, inhibitorischer Rückkopplungsmechanismus, Smad6 und -7). Hierbei gibt es zwei Wege über den Typ I-Rezeptor: Der TGF- β -Smad Weg über R-Smad2 und -3 sowie der BMP-Smad Weg über Smad1/5/8 (siehe auch Abb. 5) (Wrana, 2013; Massague et al., 2005; Shi und Massague, 2003).

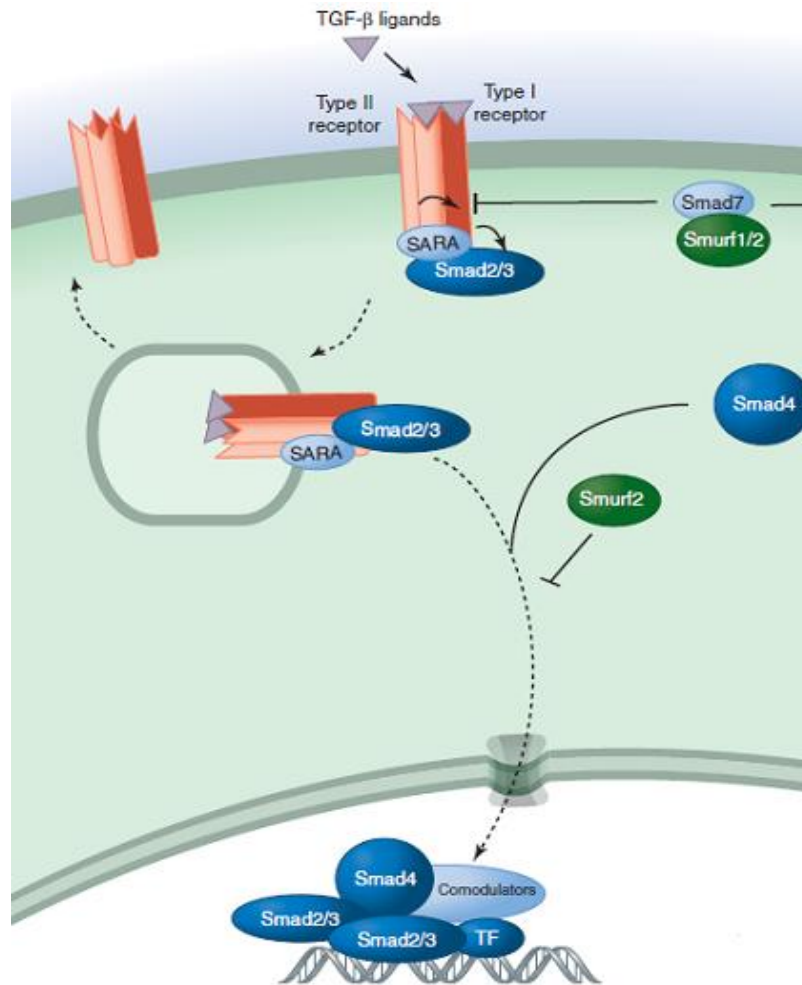


Abb. 6: Signalweg des TGF- β -Rezeptors über Smad-Proteine (aus Wrana, 2013, modifiziert)

Smad2 und -3 sind im unphosphorylierten Zustand inhibiert. Wenn die R-Smad-Proteine über ein SARA-Protein (*Smad anchor for receptor activation*) am Typ-I-Rezeptor für TGF- β (ALK5, *activin receptor-like kinase 5*) binden, kommt es zu einer Phosphorylierung der letzten zwei Serine am Carboxyl-Terminus durch die Kinasefunktion von ALK5, wodurch eine Abspaltung vom Rezeptor resultiert. Die SARA-Proteine bewirken über phospholipidbindende Doppel-Zink-Finger-Regionen eine Heranführung der R-Smad-Proteine an den Typ-I-Rezeptor (Tsukazaki et al., 1998). Zusätzlich kommt es zur Bindung mit Co-Smad4 zu einem Smad-Komplex und dessen Translokation in den Nucleus. Im Nucleus wirken die Smad-Proteine als Transkriptionsfaktoren durch direkte Bindung ihrer MH1 Domäne über eine β -Haarnadelschleife an die Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Kombination mit diversen anderen DNS-bindenden Proteinen (Wrana 2013; Shi und Massaguè, 2003).

Smad-Proteine interagieren auch über ihre MH-2-Untereinheit mit transkriptionalen Coaktivatoren (p300 und CBP) und Corepressoren (TGIF, Ski und SnoN), welche die Proteinsynthese beeinflussen.

Nach Aktivierung von ALK5 und anschließender Phosphorylierung der Smad-Proteine kommt es nach ca. 15 bis 30 Minuten zu einer gleichbleibenden Konzentration an phosphorylierten Smad-Proteinen in der Zelle, welche viele Stunden aufgrund weiterhin aktivierter ALK5-Moleküle anhalten kann. Im Nukleus erfolgt eine Dephosphorylierung der Smad-Proteine, wobei eine erneute Phosphorylierung durch ALK5 erfolgen kann (Smad-Shuttling). Lediglich durch eine Inaktivierung von ALK5 kann eine erneute Phosphorylierung der Smad-Proteine verhindert werden (Massaguè et al., 2005; Shi und Massaguè, 2003). Die I-Smad6 und I-Smad7 sind transkriptionale Ziele der R-Smads und bilden einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Sie interagieren mit ALK5, inhibieren diese und führen über eine Rekrutierung der Proteine Smurf (*smad ubiquitylation regulatory factor*) und ubiquitinabhängige Ligasen der Nedd4-Familie zu einer Degradation von ALK5. SnoN und Ski sind wichtige negativ und positiv wirkende Regulatoren für Smad2 und Smad3 vermittelte Transkription (Wrana, 2013; Massague et al., 2005; Niederlande et al., 2001; Massague et al., 2000; Massague und Wotton, 2000; Stroschein et al., 1999; Shi et al., 1998).

1.3.3 Smad-Protein unabhängige Signalwege über TGF- β 1

Neben dem ausführlich beschriebenen Smad-Signalweg gibt es weitere Smad-unabhängige Signalwege unter Beteiligung des Typ-II-Rezeptors, welche z.B. über eine Phosphorylierung von PAR6 die Tight Junctions von epithelialen Zellen (Ozdamar et al., 2005) und spezifischen Axonen beeinflussen (Wrana, 2013; Yi et al., 2010).

Weitere Kinasen (ERK, JNK und p38 MAP-Kinase) werden ebenfalls über den TGF- β 1-Signalweg reguliert (siehe Abb. 6) (Mu et al., 2012). Auf diese alternativen Signalwege soll in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Nur der kanonische Smad-Signalweg soll hier im Fokus der Untersuchungen stehen.

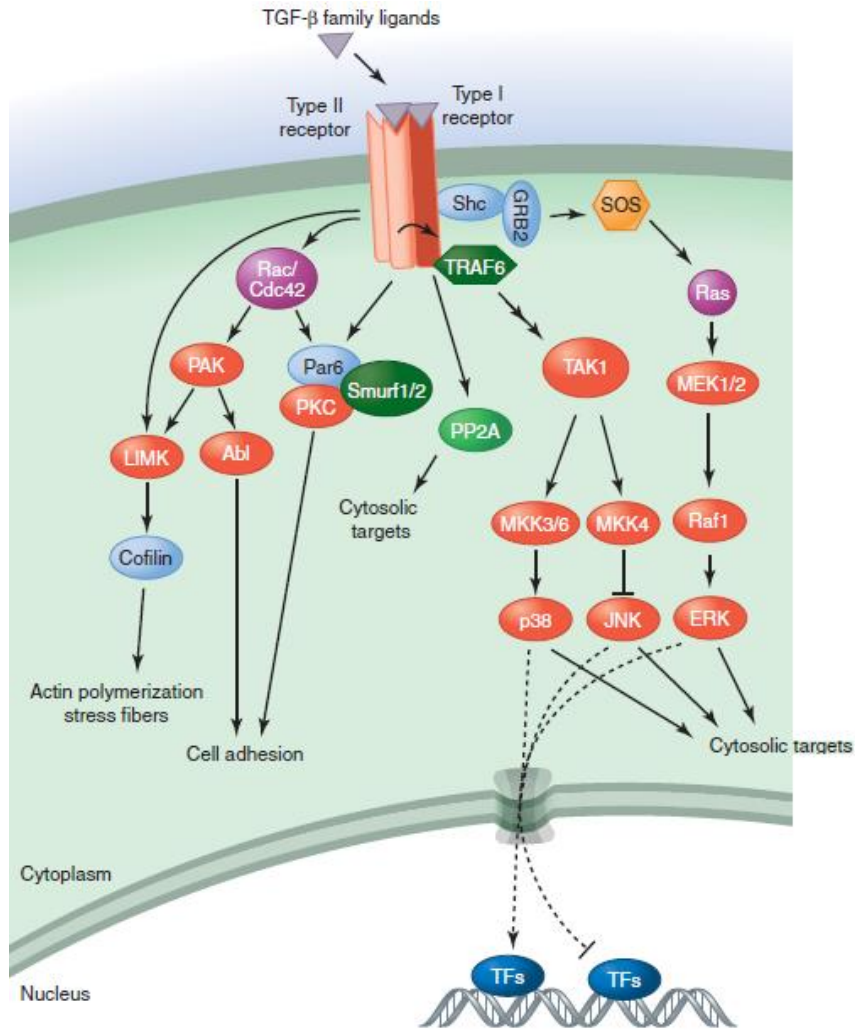


Abb. 7: Der alternative (nicht Smad-abhängige) Signalweg über den TGF- β -Rezeptor (aus Wrana, 2013, modifiziert)

1.3.4 Die Funktion von TGF- β 1 als Tumorsuppressor und -induktor

Die Inhibition der Proliferation in epithelialen, hämatopoetischen, neuronalen und bestimmten mesenchymalen Zellen ist eine bedeutende Rolle von TGF- β 1. Dieser Wachstumsfaktor kann zu jedem Zeitpunkt in jeder Phase des Zellzyklus antiproliferative Gene induzieren, wobei die daraus resultierenden Proteine in der G1-Phase eine Proliferationsinhibition bewirken, so dass die Zellen nach Erreichen dieser Zellzyklusphase im Teilungsprozess blockiert sind.

Diese Proliferationsinhibition ist in den meisten Fällen reversibel, wobei es auch in manchen Zellen mit der terminalen Differenzierung der Zelle oder der Apoptose assoziiert ist.

In der TGF- β -abhängigen Proliferationsinhibition sind zwei Klassen von antiproliferativen Genen beteiligt.

Ein Gen inhibiert die cyclin-abhängige Kinase (cdks) und ein weiteres bewirkt eine Herunterregulation von c-myc (Pollard et al., 2008; Massaguè et al., 2000; Sherr und Roberts, 1999). C-myc ist ein Mitglied der Familie der Helix-Loop-Helix Leucinezipper, der als Transkriptionsfaktor und Promotor für Zellwachstum und Proliferation fungiert (Facchini und Penn, 1998).

In der Ätiologie maligner Erkrankungen ist TGF- β sowohl ein Suppressor und Promotor. Es hat eine Tumorsuppressorfunktion, die in vielen Tumorzellen inaktiviert ist (Reiss, 1997). Fast in allen Pankreas- (Goggins et al., 1998; Villanueva et al., 1998) und Kolonkarzinomen (Grady et al., 1999) kommen Mutationen vor, die den TGF- β 1 Signalweg blockieren.

In TGF- β 1 knock-out-Mäusen zeigte sich ein Anstieg der hepatozytären Proliferation und ein Absinken der Apoptose in Lungen- und Leberzellen (Tang et al., 1998). Nach einer Inkubation dieser Mäuse mit Karzinogenen zeigten sich deutlich größere, malignere sowie zahlreichere Leber- und Lungentumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf die tumorsuppressive Wirkung im Initialstadium der Tumorentwicklung hinweist (Massaguè et al., 2000; Tang et al., 1998).

Viele gastrointestinale Tumoren weisen eine Mutation im TGF- β -Typ-II-Rezeptor als eine Mikrosatelliteninstabilität (Massaguè et al., 2000; Markowitz et al., 1995) auf. Auch Mutationen im TGF- β I-Rezeptor in Pankreaskarzinomen sind bekannt (Goggins et al., 1998).

Zusätzlich sind Mutationen beziehungsweise Deletionen im Gen von Smad4 bis zu 50% beim Pankreaskarzinom und auch beim kolorektalen Karzinom nachweisbar (Shi und Massaguè, 2003; ten Dijke et al., 2002; Massaguè et al., 2000). In einem Mausmodell zeigte sich nach inaktivierenden Mutationen von Smad4 und dem Typ-II TGF- β -Rezeptor in duktalem Pankreaszellen eine maligne Entartung (PDAC) (Bardeesy et al., 2006; Ijichi et al., 2006).

Mutationen sowie Deletionen im Gen von Smad2 ließen sich in kolorektalen Karzinomen und Lungentumoren nachweisen, wobei diese im Vergleich zu *DPC4* deutlich seltener sind (Takagi et al., 1998; Eppert et al., 1996; Uchida et al., 1996). TGF- β 1 selbst kann auch die Tumorbildung fördern. So korrelieren hohe Konzentrationen an TGF- β 1 mit der malignen Progression des Tumors und einer verringerten Überlebensrate der Patienten (Nagaraj und Datta, 2010; Gold, 1999). TGF- β 1 kann das Tumorstadium auch indirekt fördern und zwar durch Suppression der Immunüberwachung des Körpers oder durch Stimulation der Blutgefäßneubildung über die Sekretion von Angiogenesefaktoren (Nagaraj und Datta, 2010; Akhurst und Derynck, 2001; Massaguè et al., 2000). Tumorzellen, die sich einer Wachstumshemmung durch TGF- β 1 entzogen haben, können durch TGF- β 1 trotzdem zur Invasion, Migration und epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) angeregt werden (Nagaraj und Datta, 2010; Akhurst und Derynck, 2001; Massaguè et al., 2000; Yin et al., 1999; Oft et al., 1998; Cui et al. 1996). Die Tumorzellen können sich auch durch autokrines und parakrines TGF- β 1 selbst stimulieren (Derynck et al.; 2001, De Caestecker et al., 2000; Gold, 1999). Auch durch direkte Aktivatoren (z.B. Matrixmetalloproteasen = MMP) von TGF- β 1 ist die Konzentration dieses Proteins in Tumorgewebe erhöht (Kang, 2006). Im fortgeschrittenen Stadium der Tumorgenese bewirkt TGF- β 1 eine Chemoresistenz, Migration, Angiogenese, Tumorzellinvasion und Metastasierung (Schniewind et al., 2007; Bierie et al., 2006; Galliher et al., 2006; Yezhelyev et al., 2004; Ito et al., 2003). Auch die kleine GTPase Rac1 weist in dukalen Pankreastumorzellen einen proonkogenen Effekt auf. Dies erfolgt über eine Antagonisierung der proliferationsinhibierenden Wirkung von TGF- β 1 und Förderung der Zellmigration durch Aktivierung von Smad2 und Smad3 (Ungefroren et al., 2011).

1.3.5 Die TGF- β 1-induzierte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Die EMT ist in der embryonalen Entwicklung von großer Bedeutung. Dabei kommt es bei epithelialen Zellschichten zur Reorganisation des aktinhaltigen Zytoskeletts, Demontage der Zell-Zell-Kontakte und Zellseparation in fibroblastenähnliche Zellen mit mesenchymaler Markerexpression und Migrationseigenschaften (Hay, 1995).

Die Zelle wird hierdurch in der Matrix mobil, worin sich jedoch die maligne Formation einer Tumorzelle unterscheidet (Zavadil und Bottinger, 2005). Viele Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren sind bekannt, die EMT in vitro und in vivo zu induzieren vermögen (Zavadil et al., 2004; Thiery, 2002). Die Mitglieder der TGF- β -Familie sind wichtige Induktoren von EMT in kardialen Zellen, Entwicklung des Haarfollikels und in der kutanen Wundheilung (Zavadil et al., 2004; Camenisch et al., 2002; Romano und Runyan, 2000; Sun et al., 1998; Sanford et al., 1997). Von großer Bedeutung ist EMT auch in der fortgeschrittenen Karzinogenese sowie Metastasierung in Kooperation mit dem Gen KRAS und autokriner TGF- β 1-Produktion, welche eine irreversible EMT induzieren kann (Janda et al., 2002).

Die komplexe Wirkung von TGF- β 1 auf EMT ist noch nicht vollständig geklärt. Wichtige Mediatoren der TGF- β 1 induzierten EMT sind unter anderem die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), RhoA und Rac1 als kleine GTPasen sowie die Smad-Proteine (Zavadil et al., 2004 und 2001; Bhowmick et al., 2001; Bakin et al., 2000; Piek et al., 1999; Miettinen et al., 1994). Die Proteine Snail und Slug induzieren die TGF- β 1 induzierte EMT als Repressoren für die Transkription des E-Cadherin Gens, dessen Proteinprodukt in den *Adherens Junctions* die Zelle in der Umgebung fixiert (Zavadil et al., 2004 und 2001; Bolos et al., 2003; Batlle et al., 2000). Tumorzellen, die unter dem Einfluß von TGF- β 1 stehen, sind unter anderem auch durch Metalloproteinasen (MMP) und durch Veränderungen im Zellskelett mit erhöhter Zellmotilität dazu in der Lage, Basalmembranen zu überwinden (Kong et al., 2011; Christiansen und Rajasekaran, 2006).

1.4 Der Protease-Activated Receptor 2 (PAR2)

Der Protease-Activated Receptor 2 (PAR2) gehört zu einer Familie mit vier Mitgliedern (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4) und ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Ramachandran et al., 2012; Adams et al., 2011). PAR1, PAR3 und PAR4 sind wichtige Rezeptoren für das Enzym Thrombin im Rahmen der Koagulation. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit ist vornehmlich der Rezeptor PAR2 von besonderer Bedeutung und wird im Folgenden näher beschrieben.

PAR2 kann durch die Serinproteasen Trypsin, neutrophile Elastase, neutrophile Proteinase 3, Mastzelltryptase, aktivierter Faktor VII (FVIIa) und X (FXa), humane kallekreinabhängige Peptidase (KLKs), membrangebundene Serinproteinasen 1/ Matriptase I und die parasitäre Cystein- Proteinase mit Ausnahme von Thrombin (Adams et al., 2011) aktiviert werden.

PAR2 wird vom Gen *F2RL1* kodiert (Bohm et al., 1996) und besteht aus einer zentralen Domäne mit sieben Transmembran-Helices, die mit drei intrazellulären und drei extrazellulären Haarnadeln verbunden sind (Bockaert und Pin, 1999). Alle Mitglieder der PAR-Familie haben einen einzigartigen Mechanismus der proteolytischen Aktivierung. Serinproteasen sind in der Lage, PAR2 an einer spezifischen Stelle am extrazellulären Amino-Terminus zu spalten. Der anschließend demaskierte Amino-Terminus wirkt als gebundener Ligand („tethered ligand“), bindet an der extrazellulären Rezeptordomäne und bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins sowie eine Signalbildung über Aktivierung des heterotrimeren Guanyl-Nucleotid-bindenden Proteins (G-Protein), β -Arrestin Signalwegs sowie Transaktivierung einer Vielzahl an Rezeptoren und Signalmolekülen. Diese Art der PAR2-Aktivierung wird als „canonical“ bezeichnet (Gieseler et al., 2013; Ramachandran et al., 2012). Eine alternative Möglichkeit der PAR2 Aktivierung kann durch neutrophile Granulozyten mit der neutrophilen Elastase erfolgen. Hierbei kommt es zur Freisetzung eines „non-canonical“ gebundenen PAR2-Liganden, welcher den MAP-Kinase Signalweg stimuliert ohne die intrazelluläre Calciumfreisetzung zu erhöhen, wie es über den Signalweg des G-Proteins der Fall ist (Ramachandran et al., 2011).

PAR2 wird stark im Pankreas exprimiert, in dem es als wichtiges Schlüsselmolekül bei der exokrinen Sekretion fungiert (Kawabata et al., 2008). PAR2 fördert auch das Wachstum des Mamma-Adenokarzinoms (Versteeg et al., 2008) und des Pankreaskarzinoms. Bei einer Inhibition von *F2RL1* durch RNA Interferenz oder genomische Deletion zeigte sich in den PDAC-Zelllinien in einem Mausmodell eine deutliche Suppression des subkutanen Xenograft-Tumorwachstums oder eines Primärtumors (Shi et al., 2014; Iwaki et al., 2008).

Auch in PDAC sind der T β RII, ALK5 und PAR2 exprimiert (Saito et al., 2011) und produzieren erhebliche Mengen an TGF- β 1 und PAR2-Liganden. PAR2 und TGF- β 1 können ihre Expression gegenseitig regulieren sowie andere profibrinogene Gene induzieren (Knight et al., 2012; Saito et al., 2011) und somit die

desmoplastische Reaktion im Pankreaskarzinom verstärken (Ikeda et al., 2003). Aufgrund der profibrinogenen Wirkung spielt PAR2 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Pankreas- und Leberfibrose (Knight et al., 2012; Wygrecka et al., 2011; Ikeda et al., 2003). PAR2 hat auch ein erhöhtes Vorkommen in proximalen Nierentubulizellen. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass sich in Kontrollzellen durch PAR2-Agonisten eine vermehrte Expression des profibrinogenen Zytokins *connective tissue growth factor (CTGF)* zeigte, wodurch eine vermehrte Nierenfibrose hervorgerufen werden konnte.

In renalen Tubuluszellen mit PAR2-Mangel in *knockout*-Mäusen zeigten sich hingegen nach Inkubation mit PAR2-Agonisten eine verminderte Bildung von CTGF und folglich einer verminderten Nierenfibrose (Chung et al., 2013).

Auch für PAR2 ist die Förderung von Zellmotilität, Invasion und Metastasenbildung bei einer Vielzahl von Tumoren (inklusive PDAC) bekannt (Morris et al., 2006; Shi et al., 2004; Ikeda et al., 2003).

Durch Gewebekallikrein oder kallikreinabhängige Peptidasen zeigte sich in Studien eine Beteiligung von PAR2 zusammen mit PAR1 und PAR4 bei der Regulation von peripherer Gewebeinflammation, Gewebereparatur und Schmerzbildung (Oikonomopoulou et al., 2006). Auch im Rahmen der Gewebeinflammation und Schmerzbildung bei der Arthritis oder Pankreatitis spielt PAR2 eine bedeutende Rolle (Russel et al., 2012; Zhang et al., 2011; Nishimura et al., 2010; Russel et al., 2009; Kelso et al., 2006). Es ist auch an der Entstehung einer diabetischen und IgA-Nephropathie sowie an einer Glomerulonephritis beteiligt (Sumi et al., 2011; Moussa et al., 2007; Grandaliano et al., 2003). Im respiratorischen System ist PAR2 sehr stark exprimiert und an vielen Lungenerkrankungen, wie z.B. Entzündungen, Lungenfibrose und vermutlich Allergien beteiligt (Nichols et al., 2012; Arizmendi et al., 2011; Yagi et al., 2006; Howel et al., 2005; Macfarlane et al., 2001).

1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

Erste Hinweise für eine funktionelle Kooperation zwischen den PAR-Proteinen und dem TGF- β -Signalweg kamen von Burch und Mitarbeitern, die nach einer *ex vivo* Behandlung von glatten Gefäßmuskelzellen mit Thrombin eine Transaktivierung

von ALK5 durch PAR1 mit anschließender Phosphorylierung der Smad-Proteine sowie eine erhöhte Proteoglykansynthese beobachteten (Burch et al., 2010). Vor dem Hintergrund der überlappenden biologischen Aktivitäten und gegenseitigen Regulation von ALK5 und PAR2 sowie der Befunde zur Interaktion von ALK5 mit PAR1 respektive PAR2 (bei der PAR2-Agonist-induzierten CTGF Expression in Nierenepithelzellen) (s. Einleitung), formulierten wir die Arbeitshypothese, dass eine ALK5-PAR2 Interaktion auch für TGF- β -induzierte Zellantworten erforderlich ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden folgende TGF- β -abhängige und onkologisch relevante Prozesse näher untersucht:

- 1.) Die Smad-abhängige Signaltransduktion
- 2.) Die allgemeine Smad-abhängige Aktivierung der Gentranskription
- 3.) Die proliferationshemmende Wirkung
- 4.) eine mögliche physische Interaktion zwischen ALK5 und PAR2

Für die geplanten Experimente wurden hauptsächlich PDAC-abgeleitete Zelllinien verwendet, bei denen eine TGF- β 1 Sensitivität sowie eine Expression und/oder Funktion von PAR2 nachgewiesen ist (Iwaki et al., 2008; Ikeda et al., 2006; Shimamoto et al., 2004). Sollte sich herausstellen, dass PAR2 die Förderung der TGF- β 1 Wirkung auf Tumorzellen beeinflusst, so könnte man eine Blockierung der tumorprogressiven Effekte dieses Wachstumsfaktors auch über eine Hemmung von PAR2 erreichen. Das ist insofern eine vielversprechende Option, da für PAR-Proteine bereits verschiedene pharmakologische Inhibitoren in der präklinischen und klinischen Erprobung sind.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Cedex Smart Slides	Roche, Hamburg
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Glaspipettenspitzen	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön
Kryokonservierungsröhrchen	Nalge Nunc Internationa, Wiesbaden
Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatten	Sarstedt Nürnberg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran Immobilon	Merck, Darmstadt
Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
SDS-Page-Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, München
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten	Nalge Nunc International, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugierröhrchen	Greiner, Frickenhausen

2.2 Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Autoklav A21 ES	Webeco, Selmsdorf
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<i>Dynex Revelation 4.22</i>	Bio-Rad, München
Eisbereiter Scotsman AF80	Scotsman, Suffolk (GB)
Feinwaage	Scaltec, Heiligenstadt
Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi (Japan)
Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
ChemiDoc XRS	
iCycler CFX96	Bio-Rad, München
MACS Säulenhalterung	Malenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Säulenmagnet	Malenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop IDO3	Zeiss, Oberkochen
Multipipette	Brand, Wertheim
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Ph-Meter 764 Multi Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Power Supply Western Blot Power PAC 300	Bio-Rad, München
Rollmischer Assistant RM5	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön
Rührmischer IKAMAG	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Sterilbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Stickstofftank	Cryoson, Kleinkahl

Laborgerät	Hersteller
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex Vibrofix VF1	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Wärmeschrank Kelvitron	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Westernblot-Kammer	Bio-Rad, München
Wipptisch Rocky	Fröbel, Lindau
Zellzählgerät Cedex XS	Roche, Indianapolis, Indiana (USA)
Zentrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dual Luciferase Assay System	Promega, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	New England BioLabs, Frankfurt
ECL Prime Western Blotting Detection Kit	Amersham GE Healthcare, Chalfont (GB)
Ethanol	Apotheke UKSH, Lübeck
Lipofectamin 2000	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Lipofectamine RNAiMAX	Life Technologies, Carlsbad (USA)
MACS Myc-MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS DKK-MicroBeads Kit	Malenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, USA
Peq-Gold RNA Pure	Peqlab, Erlangen

Chemikalie	Hersteller
Posphated buffered saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Precision Protein Plus Größenstandard	Bio-Rad, München
Precision Protein Streptactin HRP	Bio-Rad, München
Roti-Free Stripping Buffer	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS Blue Loading Buffer	New England BioLabs, Frakfurt
TGF- β 1	ReliaTech, Wolfenbüttel
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl-Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA	Biowest, Nuaille (Frankreich)
Tween	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blotpuffer	5% Magermilchpulver in TBS-T
Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS, 192mM Glycin und 3,5mM SDS
TBS	20 mM TRIS, 137 mM NaCl und pH 7,6 (mit HCl eintitriert)
TBS-T	TBS 0,1 % Tween 20

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM TRIS-HCl, 192 mM Glycin, 20% MeOH und pH 6,8 (mit HCl eintitriert)

2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedien und Zusätze	Hersteller
BEGM Single Quots (Zusatz)	Lonza, Basel (Schweiz)
Cryo-safe I Einfriermedium	c.c. pro GmbH, Oberdorla
DMEM	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Keratinocyte Basal Medium 2	PromoCell, Heidelberg
Natriumpyruvat (NAP)	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Gentamycin (PSG)	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
RPMI 1640	Lonza, Basel (Schweiz)

2.6 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium (vgl. 2.5)	Bezug
Human adult low calcium high temperature keratinocytes (HaCaT)	Humane Keratinozyten-Zelllinie	Keratinocyte Basal Medium 2	UKSH Lübeck, Klinik für Dermatologie
Panc-1	Humane duktales Pankreasadenokarzinom-Zellen (PDAC)	RPMI 1640 + 10% FKS + 1% PSG + 1% NaP	American Type Culture Collection, USA
Humane middle ear epithelial cells (HMEEC)	Humane Mittelohrepithel-Zelllinie	BEGM mit Single Quots-Zusätzen + DMEM 1:1	UKSH Lübeck, Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde

2.7 siRNA

siRNA	Sequenz	Bezug	Cat. #
Stealth™ RNAi Negativ- Kontrolle		Invitrogen	12935-200
ALK5	GCAUCUCACUCAUGUUGAUGGUCUA GCCAAAUGAAGAGGACCCUUCAUUA GGAGAAGAAGUUGCUGUUAAGAUAU	Invitrogen	HSS110695 HSS110696 HSS110697
PAR2	UCAACCACUGUUAAGACCUCUUAU GGGAAGCUCUUGUAAUGUGCUUAU GCAACAUGUACUGUUCUUAUCUCUU	Invitrogen	HSS103471 HSS103472 HSS103473

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Primärantikörper	Wirt	Konzentration	Hersteller
ALK5 (V-22)	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Dallas, Texas (USA)
β -Actin	Maus	1:50000	Sigma, Deisenhofen
HA-Antikörper (12CA5)	Maus	1:20	Roche Diagnostics, Mannheim
Myc-Antikörper (9B11)	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology, Heidelberg
Phospho-Smad2 (Ser465/467) (138D4)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling (über New England Biolabs, Frankfurt)
Phospho-Smad3 (Ser423/425)	Kaninchen	1:500	R&D Systems, Wiesbaden
Smad2 (EP784Y)	Kaninchen	1:1000	Epitomics, Burlingame (USA)
Smad3 (EP568Y)	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK

2.8.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, HRP-markierter Antikörper	Cell Signaling (über New England Biolabs, Frankfurt)
Anti-Maus IgG, HRP-markierter Antikörper	Cell Signaling (über New England Biolabs, Frankfurt)

2.9 Sequenzen

2.9.1 Sequenzen der Reportervektoren

Reportervektor	Vektor (Hersteller)	Hersteller	Referenz
p(CAGA) ₁₂ MLP-Luc	pGL2-Promoter (Promega)	S. Dooley, Mannheim	Dennler et al., 1998
p6SBE-Luc	pGL3-Promoter (Promega)	S.E. Kern, Baltimore, MD	Zawel et al., 1998
pRL-TK-Luc	pRL Renilla Luciferase Reporter Vektor	Promega, Heidelberg	

2.9.2 Sequenzen von Expressionsplasmiden für die Zelltransfektion

Reportervektor	Vektor (Hersteller)	Hersteller
PAR2-myc-DKK	pCMV6	Origene, Rockville, MD
ALK5-T204D-HA	pCMV5	J. Massaguè, NY

3 Methoden und Durchführung

3.1 Behandlung der Zellen

3.1.1 Zellkultur

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank, welche regelmäßig gewartet sowie vor und nach der Benutzung mit 80 % Ethanol desinfiziert wurde. Bei jeder Versuchsdurchführung wurden autoklavierte Geräte sowie sterile Lösungen und Einmalartikel verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt bei einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Polystyrolflaschen mit einer Fläche von jeweils 75 cm².

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen, welche als Monolayerkulturen wuchsen, wurden durch zweitägliche mikroskopische Begutachtung in ihrer Vitalität sowie Konfluenz kontrolliert und bei einem Erreichen von ca. 80 % aufgetrennt. In einem Wasserbad wurden sämtlich verwendeten Lösungen auf 37 °C erhitzt. Nach dem Absaugen des Mediums erfolgte eine Spülung der Zellen mit PBS, um serumhaltiges Medium zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Tumorzellen mit Trypsin-EDTA für 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Inhibition der enzymatischen Aktivität des Trypsins mit serumhaltigen Nährmedium. Nach Pipettierung der Zellsuspension in ein Polystyrolröhrchen erfolgt die Zentrifugation bei 1.300 Upm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt sowie 5 ml eines serumhaltigen Mediums auf die Zellen gegeben und durch Vortexen gut resuspendiert. Nachfolgend erfolgte die Aufteilung der Tumorzellen auf mit serumhaltigem Medium gefüllte Zellkulturflaschen. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Kryokonservierung von Tumorzellen in flüssigem Stickstoff mit cryo-safe-I-Lösung (c.c. pro GmbH, Oberdorla) sowie die Revitalisierung.

Hier wurde entsprechend der Herstellerangaben von c.c. pro GmbH vorgegangen. In regelmäßigen Abständen erfolgte auch eine Testung der Zellkulturen auf eine Kontamination mit Mycoplasmen (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit, Lonza, USA). In dieser Arbeit wurden Versuche nur mit Zellkulturen durchgeführt, die ein negatives Testergebnis aufwiesen.

Die Auszählung der Tumorzellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 2 µl der Tumorzellsuspension nach deren Ablösung aus den Zellkulturflaschen mit 20 µl 0,4 %igem Trypanblau in Lösung gebracht und anschließend auf die Neubauerzählkammer aufgetragen. Anschließend erfolgte die Zählung der vitalen Zellen unter einem Lichtmikroskop der 4 großen Quadranten der Zählkammer. Bei einem Verhältnis der Tumorzellsuspension zum Trypanblau von 1:10 muss die gezählte Zellzahl mit 10^5 ($10^4 \cdot 10$ (Verdünnungsfaktor)) multipliziert werden, um die Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension zu erhalten. Anschließend erfolgte die gewünschte Zellaufteilung nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\left(\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 10^5}{1\text{ml Zellsuspension}}\right) \times 1000} = x \text{ µl zu entnehmende Zellsuspension}$$

3.2 Zelllinien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien vorgestellt. Bei Panc-1 handelt es sich um eine gut etablierte und permanente Pankreasadenokarzinomzelllinie, die deshalb gewählt wurde, weil bei ihr die TGF-β Sensitivität erhalten geblieben ist (die meisten anderen permanenten Pankreasadenokarzinomzelllinien haben diese aufgrund von Mutationen im Smad-Signalweg verloren).

Die Verwendung der immortalisierten Zelllinien HaCaT und HMEEC dient dazu, festzustellen, ob die Effekte von PAR2 auch in nicht-transformierten bzw. nicht-tumorigenen Zelllinien und in Zelllinien, die aus anderen Geweben abgeleitet wurden, zu beobachten sind.

Da alle drei Zelllinien potentiell unsterblich sind, ist nicht davon auszugehen, dass geringe Unterschiede in der Passagenzahl einen messbaren Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben. Dennoch wurden die Zellen für die Versuche innerhalb von 10-20 Passagen verwendet.

3.2.1 humane Pankreasadenokarzinomzelllinie Panc-1

Die humane Zelllinie Panc-1 wurde aus dem Pankreaskopf eines 56 Jahre alten Kaukasiers nach einer Pankreatikoduodektomie gewonnen. Histologisch handelt es sich um duktales Pankreaskarzinomzellen mit einer Verdopplungszeit von 52 Stunden mit Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität (Lieber et al., 1975). Die Panc-1 Zelllinie wurde in 75 cm² Zellflaschen mit RPMI 1640 Medium (Lonza, Basel) kultiviert. Zu dem Medium wurden als weitere Bestandteile 10% fetales Kälberserum (FKS), 1% Penicillin-Streptomycin-Gentamycin (PSG) und 1% Natriumpyruvat (Na-P) gegeben. Die Panc-1-Zelllinie zeichnete sich bereits in der Vergangenheit in vielen Versuchen durch einen funktionsfähigen TGF- β 1 Signalweg aus, der sowohl laborintern als auch in vielen anderen Studien dargestellt werden konnte (Iwaki et al., 2008; Ikeda et al., 2006; Shimamoto et al., 2004).

3.2.2 humane Keratinozytenzelllinie HaCaT

Die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (human adult low calcium high temperature keratinocytes) ist eine epitheliale Zelllinie von der Peripherie eines primär malignen Melanoms der Rückenhaut eines 62-jährigen Menschen. Die Zellen zeigen in vitro einen spontan immortalisierten Phänotyp, der allerdings nicht als tumorigen eingestuft wird. Die Zellen besitzen eine volle terminale Differenzierungsfähigkeit in Keratinozyten, welche vom Calciumgehalt abhängig sind. Bei Calcium-Konzentrationen im physiologischen Bereich (>1 mMol) kommt es zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen und bei niedrigen Konzentrationen (<1 mMol) treten sie als Monolayer-Kultur mit Einzelzellen in einem eher heterogenen Muster mit lose angeordneten Zellen auf (Boukamp et

al., 1988). Die Zellen wurden in 75 cm² große Zellkulturflaschen mit dem „*Keratinocyte Basal Medium 2*“ (PromoCell, Heidelberg) kultiviert.

3.2.3 humane Mittelohrepithelzelllinie HMEEC

Die humane Mittelohrepithelzelllinie HMEEC (human middle ear epithelial cells) wurden aus dem Mittelohr entnommen und in vitro immortalisiert. Die Zellen wurden in 75 cm² großen Zellkulturflaschen mit dem Medium BEGM mit Single-Quots-Zusätzen (Lonza, Basel) und DMEM (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA) in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert.

3.3 Transfektion der Tumorzellen mit siRNA und bakteriellen Plasmiden

3.3.1 Vorgehensweise

Als Transfektion (lat. trans – hinüber, lat. facere – machen) wird die Infektion von Organismen durch DNS und RNA von Bakteriophagen und Viren bezeichnet (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Im Rahmen von experimentellen Versuchen erfolgt das gezielte Einbringen von RNA beziehungsweise DNS in die Wirtszelle, ohne dass eine Integration in das zelluläre Genom erfolgt. Anschließend kommt es bei der Transfektion von DNA durch Transkription und anschließender Translation zu einer vermehrten Proteinsynthese dieser eingeschleusten Erbinformation. Bei der Transfektion von „*small-interfering RNA*“ (siRNA) werden Moleküle bis zu einer Größe von 25 Basenpaaren als Einzel- oder Doppelstrang verwendet. Hierbei kommt es zur Verbindung komplementärer Einzelstrang-RNA mit der mRNA und einem nachfolgenden Abbau der Duplex-RNA, so dass die Genexpression inhibiert ist und als Folge davon keine Proteine gebildet werden können. Dieser Vorgang wird auch als RNA-Interferenz bezeichnet (Siomi, 2009). Das Einbringen dieser siRNA bzw. von DNS erfolgt durch Lipofektion, wodurch ein kationisches Lipid die Erbinformation wie ein Liposom umschließt und durch die Zellmembran in das Zellinnere per Endozytose transportiert (Kim und Eberwine, 2010). Als Transfektionsagenzien wurden Lipofectamin RNAiMAX bei der Transfektion von siRNA sowie Lipofectamin 2000 bei der Transfektion von Plasmid-DNS verwendet.

Beide Transfektionsagenzien wurden von der Firma Life Technologies bezogen. Die erfolgreiche Wirkung der siRNA wurde im Rahmen einer quantitativen PCR in der Arbeitsgruppe Ungefroren nachgewiesen und ist in dieser Arbeit nicht dargestellt.

3.3.2 Durchführung / Protokoll

Am ersten Tag wurden Zellen der Zelllinie Panc1 mit $4 \cdot 10^5$ Zellen pro Loch auf zwei 6-Lochplatten gleichmäßig verteilt. Hierbei wurde auf die Verwendung eines antibiotikumfreien Mediums geachtet, da diese die Wirkung des Lipofectamins RNAiMax laut Herstellerangabe beeinträchtigen kann. Am zweiten Tag erfolgte die Transfektion der Tumorzellen bei einer Konfluenz von 80 %. Hierzu wurden fünf Polystyrolröhrchen sowie fünf Eppendorfgefäße mit jeweils 200 µl serumfreien Medium gefüllt. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 10µl Lipofectamin RNAiMax und 100 µM siRNA in jedes Eppendorfgefäß nach folgendem Schema gegeben:

Zelllinie	-	LFA RNAimax	Negative Kontroll siRNA	ALK5- siRNA	PAR2- siRNA
PANC-1	2 (+/- TGF-β1)		2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)
HaCaT	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)

Tab. 5: Transfektionsschema der siRNA: Es wurden jeweils 2 Lochkammern der Zelllinien HaCaT- und Panc1-Zellen nach obigem Transfektionsschema behandelt und mit oder ohne TGF-β1 für eine Stunde behandelt: „-“ \triangleq keine Transfektion; LFA RNAimax \triangleq nur Lipofectamin RNAimax ohne siRNA; sonstige Transfektion der Zellen nach Überschrift

Im nächsten Schritt wurde der Inhalt des Eppendorfgefäßes in die jeweils zugehörigen Polystyrolröhrchen gegeben und für 20 Minuten inkubiert, so dass das Lipofectamin RNAiMax mit der siRNA einen Komplex bilden konnte. Die Röhrchen wurden anschließend auf 2 ml mit serumfreien Medium aufgefüllt.

Nach Absaugen des serumhaltigen Mediums aus den einzelnen Löchern der 6-Lochplatte und zweimaliger Spülung der Zellen mit jeweils 2 ml PBS pro Loch erfolgte die Inkubation der Zellen mit der Transfektionsmischung. Hierbei wurden jeweils 2 Löcher mit 1 ml derselben siRNA-Suspension nach obigem Schema befüllt. Die 6-Lochplatten wurden für 4 Stunden in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde das Medium durch Absaugen entfernt, die einzelnen Kammern mit 2 ml serumhaltigen Medium gefüllt und für 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Am dritten Tag erfolgte eine erneute Transfektion nach obigem Schema. Am vierten Tag wurde jeweils eines der beiden Vertiefungen mit gleicher Transfektion nach einer Zugabe von 5ng/ml TGF- β 1 für 60 Minuten in den Brutschrank gestellt.

3.4 Western Blot

3.4.1 Funktionsweise

Die Methode des Western Blots (Synonym: Immunoblot) beinhaltet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran mittels Gelelektrophorese sowie die Detektion von Proteinstrukturen mittels Antikörper und anschließender Chemilumineszenzdetektion.

Nach Übertragung der Proteine auf die Membran wird zunächst ein Primärantikörper zur Detektion des gesuchten Epitops aufgebracht. Die anschließende Inkubation mit einem Sekundärantikörper dient zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers durch eine Chemilumineszenzdetektion mittels Meerrettichperoxidase. Durch eine nachfolgende densitometrische Messung kann die Intensität der Proteinbanden quantifiziert und grafisch dargestellt werden. Mit diesem Verfahren aus elektrophoretischer Proteinauftrennung und Immundetektion können bestimmte Proteinstrukturen aus der quantitativen Vielfalt der Proteine im Lysat detektiert werden (Ghosh et al., 2014; Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

3.4.2 Protokoll/Versuchsdurchführung

Die Tumorzellreihen Panc1 und HaCaT wurden so behandelt wie es im Punkt 3.2.2 beschrieben wurde. Im Folgenden werden die weiteren Behandlungsschritte detailliert dargestellt.

3.4.2.1 Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Am vierten Tag nach Aussaat der Zellen folgte nach der 60-minütigen Inkubation mit TGF- β 1 eine erneute Spülung der Zellen mit PBS sowie eine Applikation von 100 μ l PhosphoSafe-Puffer (Merck) mit Phosphataseinhibitoren, um eine Lyse der Zellen zu erwirken und um die Phosphatreste an den Proteinen gegen Abspaltung zu schützen. Nachfolgend erfolgte eine Inkubation der 6-Loch-Platten auf Eis nach Verschluss mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) für 20 Minuten und für weitere 10 Minuten in einem -80°C Kühlschrank zur sofortigen Terminierung des Zellstoffwechsels sowie zum Aufbrechen der Zellmembran durch Eisbildung. Während des weiteren Arbeitens mit den Lysaten wurde auf eine kontinuierliche Kühlung durch Lagerung auf Eis geachtet. Die Suspensionen jeder Kammer der 6-Loch-Platten wurden in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 10.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 15 Minuten (Eppendorf). Nach Zentrifugation der Zelltrümmer erfolgte die Übertragung des Überstandes in neue Eppendorfgefäße und die Lagerung der Lysate bei -20 °C. Um in folgenden Versuchen eine gleichmäßige Proteinaufteilung der Lysate zu gewährleisten, erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem DC Protein-Assay-Kit der Firma Bio-Rad. Dieses Verfahren beruht auf dem von Lowry basierenden Protokoll (Lowry et al., 1951) zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Im Folgenden erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des *Dynex Revelation 4.22* der Firma Bio-Rad. Hierzu wurde eine 96-Loch-Platte nach folgendem Schema behandelt:

3 Methoden und Durchführung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	0,1mg/ ml Alb.	0,2mg/ ml Alb.	0,3mg/ ml Alb.	0,4mg/ ml Alb.	0,5mg/ ml Alb.	0,6mg/ ml Alb.	0,7mg/ ml Alb.	0,8mg/ ml Alb.	0,9mg/ ml Alb.	10,0mg/ ml Alb.
B	H ₂ O	H ₂ O	0,1mg/ ml Alb.	0,2mg/ ml Alb.	0,3mg/ ml Alb.	0,4mg/ ml Alb.	0,5mg/ ml Alb.	0,6mg/ ml Alb.	0,7mg/ ml Alb.	0,8mg/ ml Alb.	0,9mg/ ml Alb.	10,0mg/ ml Alb.
C	P ₁	P ₁	P ₂	P ₂	P ₃	P ₃	P ₄	P ₄	P ₅	P ₅	P ₆	P ₆
D	P ₇	P ₇	P ₈	P ₈	P ₉	P ₉	P ₁₀	P ₁₀	P ₁₁	P ₁₁	P ₁₂	P ₁₂
E	P ₁₃	P ₁₃	P ₁₄	P ₁₄	P ₁₅	P ₁₅	P ₁₆	P ₁₆	P ₁₇	P ₁₇	P ₁₈	P ₁₈
F	P ₁₉	P ₁₉	P ₂₀	P ₂₀	P ₂₁	P ₂₁	P ₂₂	P ₂₂	P ₂₃	P ₂₃	P ₂₄	P ₂₄
G	P ₂₅	P ₂₅	P ₂₆	P ₂₆	P ₂₇	P ₂₇	P ₂₈	P ₂₈	P ₂₉	P ₂₉	P ₃₀	P ₃₀
H	P ₃₁	P ₃₁	P ₃₂	P ₃₂	P ₃₃	P ₃₃	P ₃₄	P ₃₄	P ₃₅	P ₃₅	P ₃₆	P ₃₆

Abb. 8: Aufbau 96-Loch-Platte zur Proteinbestimmung, Alb.: Albumin, P₁₋₃₆: Probe 1-36, In die Lochkammern A1 bis B12 wurden die Albuminstandardreihe in angegebener Konzentration pipettiert. In die Kammern C1 bis H12 wurde jeweils in zwei Lochkammern die gleiche Probe gegeben, die zuvor in einem Verhältnis von 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Nach Hinzugabe der Reagenzien erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mit dem ELISA-Reader.

In die Kammern A1, A2, B1 und B2 wurde jeweils 5 µl destilliertes Wasser gegeben. In die Kammern A3 bis A12 und B3 bis B12 wurde die Standardreihe mit Albumin nach obigem Schema verteilt. Die Proben wurden mit 5 µl zur Proteinbestimmung in zwei Kammern ab C1 bis H12 verteilt, nachdem sie in einem Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurden. Anschließend wurde in alle Kammern 25 µl vom Reagenz A und S in einem Verhältnis von 1:50 sowie 200 µl der Lösung B pipettiert. Daraufhin erfolgt eine Inkubation unter Lichtabschluss für 15 Minuten sowie die anschließende Messung mit dem ELISA-Reader. Die Angabe der gemessenen Proteinmenge erfolgt in mg/ml.

3.4.2.2 Probenaufteilung und Proteindenaturierung

Nach Abschluss der Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Lysate erfolgte die gleichmäßige Proteinverteilung von 20 µg Protein pro 10 µl Gesamtvolumen. Hierzu wurde das entsprechende Volumen der einzelnen Lysate gemäß ihrer Proteingehalte entnommen und mit dem PhosphoSafe-Lysispuffer auf das Envolumen von 10 µl aufgefüllt.

Anschließend wurden 100 µl vom Blue Loading Buffer B7703S (New England BioLabs, Frankfurt) mit 10 µl Dithiothreitol (DTT) versetzt und in einer Menge von 5 µl auf die einzelnen Proben verteilt. Jede Probe wurde für 5 Minuten zur weiteren Denaturierung der Proteine auf 95°C mit dem Thermomixer (Eppendorf) erhitzt und geschüttelt. Darauf erfolgte eine kurze Zentrifugation für 30 Sekunden auf 1000 Umdrehungen pro Minute, so dass das Kondensat wieder in die Probe übergehen konnte.

3.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Vorbereitung der Proben erfolgt im folgenden Versuchsabschnitt die Proteinauftrennung nach ihrer Molekülgröße im Rahmen der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei wurden *Mini-Protean TGX any kD* - Fertiggele von der Firma Bio-Rad (München) verwendet, die für Proteine mit einer Molekülgröße von 10 – 200 Kilodalton (kDa) verwendet werden können. Die Proben wurden in die jeweiligen Kammern nach folgendem Schema eingefügt:

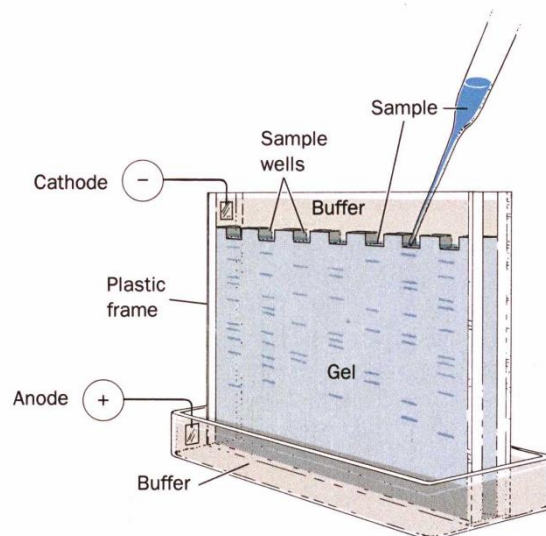


Abb. 9: Beladung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Proteinproben (<http://www.austincc.edu/mlt/mdfund/pictures/GelElectrophoresis.jpg>, modifiziert)

Probenkammer	Zelllinie Panc1	Zelllinie HaCat
1	Precision Protein Plus Marker	Precision Protein Plus Marker
2	Unbehandelte Probe ohne TGF- β 1	Unbehandelte Probe ohne TGF- β 1
3	Unbehandelte Probe mit TGF- β 1	Unbehandelte Probe mit TGF- β 1
4	Kontroll-siRNA ohne TGF- β 1	Kontroll-siRNA ohne TGF- β 1
5	Kontroll-siRNA mit TGF- β 1	Kontroll-siRNA mit TGF- β 1
6	ALK5-siRNA ohne TGF- β 1	ALK5-siRNA ohne TGF- β 1
7	ALK5-siRNA mit TGF- β 1	ALK5-siRNA mit TGF- β 1
8	PAR2-siRNA ohne TGF- β 1	PAR2-siRNA ohne TGF- β 1
9	PAR2-siRNA ohne TGF- β 1	PAR2-siRNA ohne TGF- β 1
10	Precision Protein Plus Marker	Precision Protein Plus Marker

Tab. 6: Probenanordnung der einzelnen Kammern im Elektrophoresegel

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine unter Verwendung eines Elektrophoresepuffers (siehe Punkt 2.4) bei einer angelegten Spannung von 120 Volt für eine Stunde.

Die Plastikabdeckungen der verwendeten Mini-Protean TGX any kD-Fertiggele (Bio-Rad) wurden durch ein hierfür vorgesehenes Werkzeug geöffnet.

Anschließend wurden die Gele in den Blotpuffer (siehe Punkt 2.4) eingelegt.

3.4.4 Transfer („Blotten“) der Proteine

Durch das „Blotting“ erfolgt ein Proteintransfer aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membran unter Anlage eines elektrischen Feldes.

Anschließend können die Proteine durch eine Immundetektion durch

Antikörperbindung in Form von Banden dargestellt werden. Die verwendeten

Membranen wurden zuvor in einer Petri-Schale mit 70% Methanol (Firma Carl Roth, Karlsruhe) auf einem Schüttler (Firma Heidolph, Schwabach) für 5 Minuten gelegt, um ihre lipophile Eigenschaft für den Proteintransfer zu reduzieren.

Anschließend wurden die Membranen in Blotpuffer für weitere 5 Minuten inkubiert.

Nachfolgend wurden der Schwamm, das Whatman-Filterpapier (Firma Schleicher & Schuell, München), die PVDF-Membran sowie das SDS-PAGE-Gel in folgender Reihenfolge von Anode zu Kathode angeordnet:

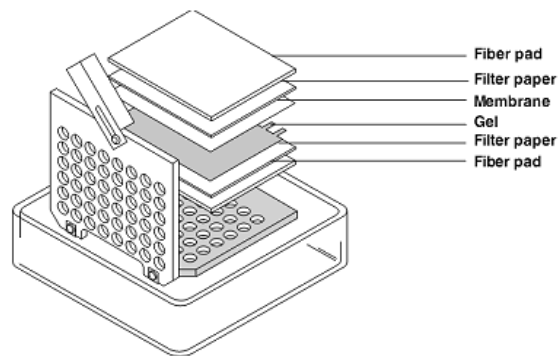


Abb. 10: Versuchsanordnung der Bestandteile beim Westernblotting: Anode → Schwamm → Whatman-Filterpapier → PVDF-Membran → SDS-Page-Gel → Whatman-Filterpapier → Schwamm → Kathode, (entnommen aus <http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Forschung/GelSandwich.gif>, modifiziert)

Das Papier, die Schwämme sowie die Vorrichtung wurden ebenfalls zuvor in Blotpuffer für 5 Minuten inkubiert.

Die Plastikvorrichtung wird mit seinem Inhalt in die Blotkammer eingespannt und mit Blotpuffer aufgefüllt. Zusätzlich wurde noch eine Kühlvorrichtung in dem Becken platziert und die Versuchsdurchführung in einem Kühlraum bei 8°C für eine Stunde mit Anlage einer Stromstärke von 400 mA durchgeführt. Bei dem gesamten Versuchsablauf wurde besonders darauf geachtet, dass das Gel zu jedem Zeitpunkt mit Blotpuffer umgeben war, um eine Austrocknung und eine Degradierung der Proteine zu vermeiden.

Die proteinbehafteten Membranen wurden anschließend für eine Stunde in TBST mit 5 % Magermilch (Carl Roth, Karlsruhe) gegeben, um unspezifische Bindungsquellen zu minimieren. Nachfolgend erfolgte eine dreimalige Spülung für jeweils 10 Minuten der Membranen mit TBST.

3.4.5 Detektion der Proteine über Antikörperbindung

Zum Nachweis eines spezifischen Proteins erfolgt eine Detektion mit dem Fab-Anteil des primären Antikörpers an sein Antigen. Hierzu wurden die Primärantikörper (siehe Punkt 2.8.1) in einem Verhältnis von 1:1000 mit TBST und 5 % Magermilch in Suspension gebracht und über Nacht (> 12 Stunden) in einem

Kühlraum bei 8 °C auf einem Rüttler verwahrt, so dass eine permanente Benetzung der Membran mit der Antikörpersuspension gewährleistet werden konnte. Daraufhin folgte eine dreimalige Spülung mit TBST für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurde ein Sekundärantikörper in einem Verhältnis von 1: 1000 zur Detektion des Primärantikörpers (siehe Punkt 2.8.2) mit TBST und 5 % Magermilch inkubiert und anschließend auf die PVDF-Membran gegeben. Der Sekundärantikörper bindet nun den Primärantikörper. Zusätzlich wurde der Suspension das Precision Streptactin HRP (Bio-Rad, München) in einem Verhältnis von 1:10.000 zugegeben, das zur Bandendarstellung des Precision Markers dient. Anschließend erfolgte eine erneute Episode einer dreimaligen Spülung mit TBST. Zum Nachweis von Abweichungen der Proteinbeladungen der einzelnen Kammern des SDS-Gels, erfolgte als Vergleich der Antikörpernachweis des β -Actins (Sigma, Deisenhofen) als Zytoskelettprotein und „housekeeping gene“, welches durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beeinflusst wurde. Die Chemilumineszenzdetektion der einzelnen Banden erfolgte nach Herstellerangabe des Prime Western Blotting Detection Kit (Amersham, Chalfont) mit einer Enhanced chemiluminescence (ECL) Lösung. Die visuelle Darstellung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München).

3.4.6 „Stripping“

Als Stripping wird die Entfernung des Primärantikörpers sowie des Sekundärantikörpers von den Proteinen der PVDF-Membran bezeichnet, um einen Nachweis anderer Proteine in benachbarter Region durch spezifische Primärantikörperbindung ohne Überlagerung zu ermöglichen. Die PVDF-Membranen wurden hierzu für 30 Minuten bei 56°C in einer Schale mit Roti-Free Stripping Buffer (Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert. Dies erfolgte in einem beheizten Wasserbad mit Rüttlerfunktion (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel). Daraufhin erfolgte eine dreimalige Spülung mit TBST für jeweils 10 Minuten sowie eine Inkubation in TBST mit 5% Magermilch für eine Stunde, um erneut unspezifische Proteinbindungsstellen zu minimieren. Bevor eine erneute Inkubation mit einem Primärantikörper nach dem Stripping-Verfahren durchgeführt wurde, erfolgte eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde

sowie die Behandlung mit der ECL-Lösung, um mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München) verbliebene Antikörperrückstände auszuschließen.

3.4.7 Auswertung der Western Blots

Um einen präzisen Vergleich der Banden des Western Blot zu gewährleisten, erfolgte eine densitometrische Auswertung mit dem frei verfügbarem Programm *ImageJ* (National Institute of Health), welches die Anzahl der Pixel aller Banden bestimmte und diese im Verhältnis zu den Pixeln der Banden des Referenzproteins β -Actin darstellte.

3.5 Zellzählung

In Punkt 3.1.2 wurde die Vorgehensweise der Zellzählung in einer Neubauer-Zellkammer dargestellt. Durch eine Messung der Zellzahl mit dem Zellzählgerät Cedex XS (Roche, Indiana, USA) kann innerhalb von einigen Sekunden bestimmt werden, wie hoch die Proliferationsrate der Tumorzellen nach zweitägiger Behandlung mit TGF- β 1 ist. Es wird sowohl die Anzahl der vitalen als auch die der toten Zellen bestimmt, die anschließend grafisch dargestellt werden können. Zu Beginn des Versuches wurden Zellen in 6-Lochplatten ausgesät, so dass 200.000 Zellen pro Lochkammer verteilt wurden (vgl. 3.1.2). Als Zelllinien wurden Panc1, HaCaT sowie HMEEC verwendet.

Im Anschluss wurde jeweils eine 6-Lochplatte nach folgendem Schema insgesamt zweimal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen transfiziert (vgl. Punkt 3.3):

Zelllinie	Lipofectamin	ALK5-siRNA	PAR2-siRNA	Kontroll-siRNA
Panc-1	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern
HaCaT	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern
HMEEC	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammer

Tab. 7: Transfektionsschema der Zellreihen Panc-1, HaCaT und HMEEC: Es wurde je Zellreihe eine komplette 6-Lochplatte mit derselben siRNA bzw. ohne siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte in drei Lochkammern jeweils einer 6-Lochplatte eine Behandlung mit TGF- β 1.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml eines neuen Mediums mit einer Zugabe von 5ng/ml TGF- β 1 für jeweils drei Lochkammern einer 6-Lochplatte ersetzt. In den übrigen drei Kammern erfolgte lediglich ein Wechsel des Mediums ohne weitere Zusätze (vgl. Punkt 2.5). Dieser Vorgang wurde am darauffolgenden Tag wiederholt. Am dritten Tag nach erster Behandlung mit TGF- β 1 wurde das Medium abgesaugt und mit 2 ml PBS gespült. Nach Absaugen des PBS erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 0,5 ml Trypsin-EDTA für 5-10 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurde die enzymatische Wirkung des Trypsin-EDTA durch Zugabe von 0,5 ml eines serumhaltigen Mediums inaktiviert und die Zellsuspension aus drei Lochkammern der gleichen Behandlung in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

Es wurden 12,5 μ l der Zellsuspension sowie 12,5 μ l 0,4%igem Trypanblau in ein 5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Nach ausreichendem Vortexen wurden 10 μ l der gefärbten Zellsuspension auf die Messkammer (Cedex smart slides, Roche, Indiana, USA) appliziert und anschließend in das Zellzählgerät (Cedex, XS, Roche, Indiana, USA) eingefügt.

Innerhalb von einer Sekunde konnte die Zellzahl der vitalen und toten Zellen bestimmt werden. Die Werte wurden tabellarisch aufgelistet und anschließend in einem Diagramm ausgewertet.

3.6 Assay zur Messung der Transkriptionsaktivität von TGF- β 1/ Smadabhängigen Reporter genen

3.6.1 Funktionsprinzip

In dieser Versuchsdurchführung werden die Reportervektoren p(CAGA)₁₂-luc (S. Dooley, Mannheim) bzw. p6SBE-luc (S. E. Kern, Baltimore, MD), die beide für die Glühwürmchen-Luciferase kodieren, mit dem Kontrollvektor pRL-TK-luc (Promega, Heidelberg), der für die *Renilla*-Luciferase kodiert, ko-transfiziert. Die Reporter gene p(CAGA)₁₂-luc bzw. p6SBE-luc werden nach Bindung von aktivierten Smad-Proteinen verstärkt exprimiert. Als Folge weisen diese Zellen eine hohe Luciferaseaktivität auf, die anschließend mit Hilfe des Dual Luciferase Assay System (Promega, Heidelberg) detektiert werden kann. Dies kann allerdings nur erfolgen, wenn die Smad-Proteine zuvor phosphoryliert wurden.

Wenn in Zellen Proteine beispielsweise durch siRNA vermindert gebildet werden, die in den Phosphorylierungsprozess der Smad-Proteine eingreifen, so kann die Auswirkung der Hemmung direkt über die Aktivität der gebildeten Luziferase bestimmt werden (Dennler et al., 1998; Zawel et al., 1998).

3.6.2 Protokoll

Panc-1-Zellen wurden in einer Anzahl von 20.000 pro Lochkammer je Zellreihe auf eine 96-Lochplatte gleichmäßig verteilt. Am zweiten Tag erfolgte eine Transfektion der Zellen mit serumfreiem Medium und Lipofectamin RNAiMAX nach folgendem Schema (vgl. Punkt 3.3).

Zelllinie	Lipofectamin RNAiMAX und 2000	PAR2-siRNA	ALK5-siRNA
Panc-1	6 Lochkammern	6 Lochkammern	6 Lochkammern

Tab. 8: Transfektionsschema der siRNA: Die Zelllinien Panc-1 wurde auf jeweils 18 Lochkammern der 96-Lochplatte gleichmäßig mit 20.000 Zellen pro Kammer verteilt. Anschließend wurden jeweils 6 Lochkammern mit derselben siRNA transfiziert nach obigem Schema. Zusätzlich wird p6SBE-luc oder p(CAGA)₁₂-MLP-luc zusammen mit pRL-TK-luc transfiziert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit TGF- β 1.

Am dritten Tag erfolgte eine erneute Transfektion der siRNA (50 μ M) sowie der Vektoren p6SBE-luc oder p(CAGA)₁₂-MLP-luc in Kombination mit pRL-TK-luc und Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Carlsbad, USA). Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Behandlung aller Lochkammern mit 5 ng/ml TGF- β 1 für 24 Stunden.

3.7 Co-Immunpräzipitation

3.7.1 Funktionsprinzip

Die Co-Immunpräzipitation ist ein molekularbiologisches Verfahren und dient zur Selektion eines spezifischen Proteins oder Peptids, welches lediglich in geringer Menge in einer Zellproteinsuspension vorkommt.

Durch eine bloße Verwendung der Suspension zur Darstellung des Proteins ohne vorherige Co-Immunpräzipitation würde man nur ein schwaches oder gar kein Signal im Western Blot erhalten.

Somit kann mit diesem Verfahren auch eine sehr geringe Menge eines spezifischen Proteins detektiert werden (Phizicky und Fields, 1995). Zunächst erfolgt die Transfektion von Plasmid-DNS in die Tumorzellen, welche in den Zellen zu einer Überexpression dieses Proteins führt. In dem hier durchgeführten Versuch sind es PAR2-myc-DKK und ALK5-HA. Anschließend erfolgt die Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 sowie die Lyse. Im weiteren Vorgehen wird entsprechend den Herstellerangaben von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) im Rahmen des *MACS MicroBeads Kit* vorgegangen. Dem Zellysate werden sogenannte MicroBeads hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um 50 nm große magnetische Partikel, die an Antikörper gebunden sind.

Diese Antikörper binden mit dem magnetischen Partikel hochspezifisch an einem Peptid. In dieser Arbeit wurden Antikörper verwendet, die hochspezifisch am Tag-Peptid Myc binden. Dieses Protein war direkt physisch an PAR2 gebunden. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension über eine Säule gegeben, welche trichterartig die Suspension durch eine Engstelle leitet. Diese Engstelle der Säule ist in einem starken Magneten positioniert. Die durch antikörpergebundenen Proteine werden in der Säule durch das starke Magnetfeld gebunden und dort nach Durchlaufen der Suspension angereichert.

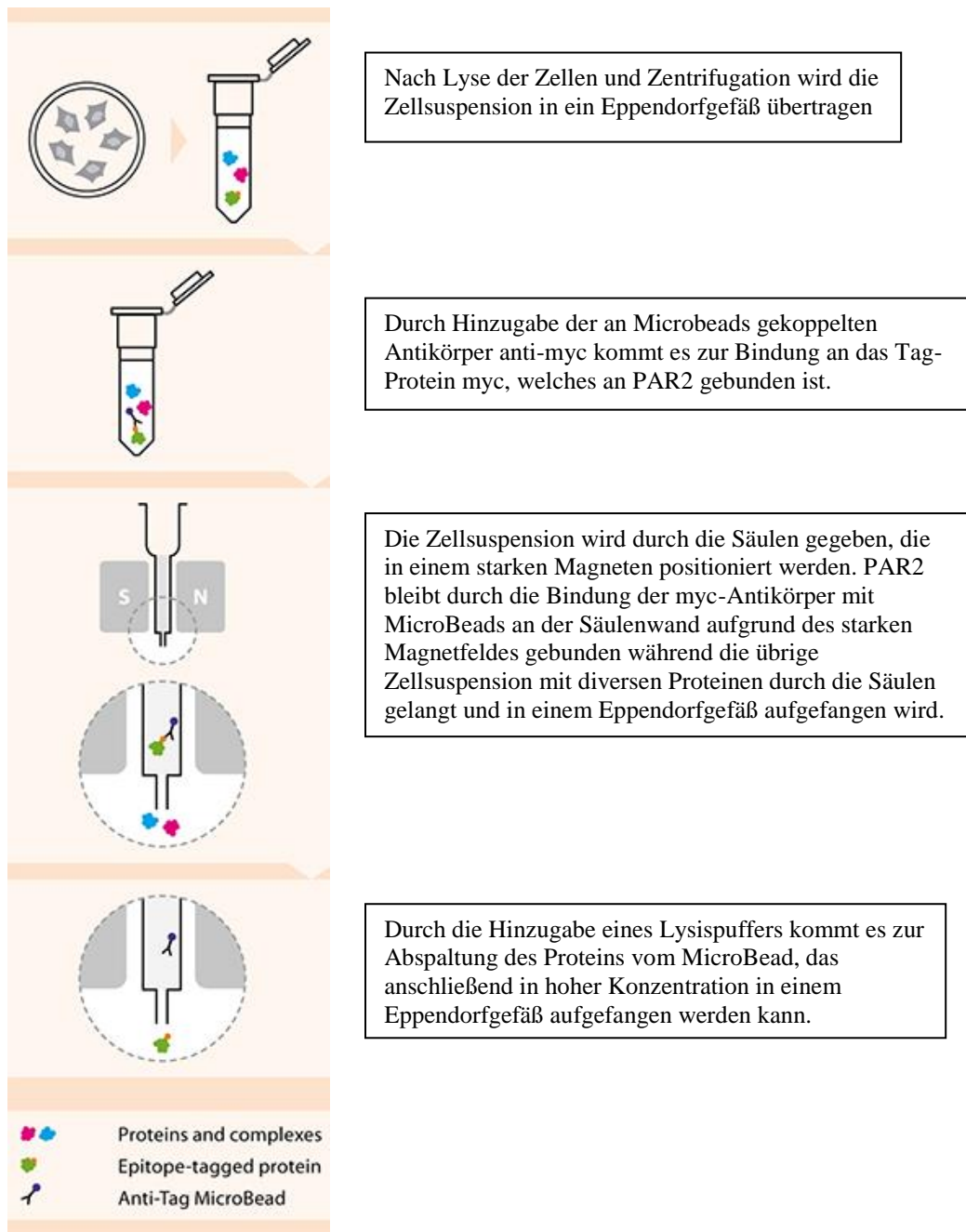


Abb 11: Mechanismus der Co-Immunpräzipitation durch Antikörper mit Microbeads von MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, (Modifizierte Abbildung von <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0002500/IM0002517.ashx>)

Daraufhin werden in die Säulen Enzyme gegeben, die eine Spaltung der antikörpergebundenen Proteine von den magnetischen Partikeln bewirken. So können die Proteine in einem Eppendorfgefäß in hoher Konzentration aufgefangen und anschließend nach Elektrophorese auf eine Membran transferiert werden.

Durch eine Antikörperbehandlung kann nun das gesuchte Protein durch Chemilumineszenzdetektion nachgewiesen werden (Masters, 2004; <http://www.miltenyibiotec.com>). Die Besonderheit in diesem Verfahren liegt darin, dass sich lediglich das gesuchte Protein (hier: PAR2) auf der Membran befindet, welches zuvor durch Co-Immünpräzipitation isoliert wurde. Dies schließt jedoch auch Proteine mit ein, die zum Zeitpunkt der Zelllyse eine direkt physische Interaktion mit dem gesuchten Protein eingegangen sein könnten (hier: ALK5). So kann durch eine Antikörperbehandlung der Membran mit einem anti-ALK5-Antikörper herausgefunden werden, ob zum Zeitpunkt der Zelllyse eine physische Interaktion zwischen PAR2 und ALK5 bestand.

3.7.2 Protokoll

Es wurden 8 Polystyrolflaschen (75cm²) mit jeweils 2 · 10⁶ Panc-1-Zellen pro Flasche gefüllt. Am darauffolgenden Tag wurde das serumhaltige Medium nach Spülen mit PBS durch serumfreies Medium ersetzt. Es folgte die Transfektion der Zellen mit Lipofectamin 2000 und mit den Plasmiden PAR2-Myc-DKK, ALK5-HA sowie pcDNA3 (Leervektor) nach folgendem Schema:

Panc-1-Zellen	Lipofectamin 2000	PAR2-Myc- DKK+pcDNA3	ALK5- HA+pcDNA3	PAR2-Myc-DKK + ALK5-HA
TGF-β1 für 30 Minuten	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen
TGF-β1 für 60 Minuten	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen	2 · 10 ⁶ Zellen

Tab. 9: Die Panc-1-Zellen wurden mit in der Tabelle angegebener Anzahl entweder lediglich mit Lipofectamin (Kontrolle), mit PAR2-my-DKK+pcDNA3, ALK5-HA+pcDNA3 oder in Kombination mit PAR2-Myc-DKK und ALK5-HA transfiziert. Anschließend erfolgte für die Hälfte der Zellen eine Behandlung mit TGF-β1 für entweder 30 oder 60 Minuten

Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben des Lipofectamins 2000 (Life Technologies) und nach dem Vorgehen laut Punkt 3.3. Es wurden 30 µg Plasmid-DNS verwendet pro 75 cm² Polystyrolflasche. Die Panc1-Zellen jeweils einer Flasche mit gleicher Transfektion wurden entweder für 30 oder 60 Minuten mit 5 ng/ml TGF-β1 behandelt.

Anschließend wurden nach Absaugen des Mediums und Spülung mit gekühltem PBS 2 ml vom Lysepuffer aus dem MicroBead Kit (MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in jede Polystyrolflasche gegeben, die daraufhin in einem Eisbecken gekühlt wurden. Nach Platzierung der Flaschen in einen Kühlschrank bei -80°C für 15 Minuten sowie anschließender Zentrifugation und Pipettierung des Überstandes in ein anderes Eppendorfgefäß, erfolgte die Hinzugabe der Antikörper mit MicroBeads gegen das Myc-Peptid von PAR2-Myc-DKK laut Herstellerangaben von MACS Miltenyi Biotec in 1 ml der Zellsuspension. Die weiteren Schritte wurden entsprechend der Herstellerangaben befolgt und die Zellsuspension über die Säulen gegeben, die wiederum in einer Halterung mit einem starken Magnetfeld platziert wurden. Anschließend wurde der Lysepuffer, der eine Abspaltung der Antikörper von den MicroBeads bewirkt und je nach vorherigem Transfektionsschema der einzelnen Panc1-Zellen auch PAR2-Myc-DKK enthalten kann, in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Dieser Vorgang erfolgte mit den Zellsuspensionen jeder Polystyrolflasche. Daraufhin erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung laut Punkt 3.4.2.1 und im Anschluss die Durchführung der Elektrophorese laut Punkt 3.4.3. Nach dem Transferieren der Proteine auf eine PVDF-Membran und anschließendem Blocken mit TBST und 5 %-Magermilch (siehe Punkt 3.4.4), erfolgte nach dreimaliger Spülung mit TBST die Inkubation der Blots mit dem Primär-Antikörper anti-ALK5 (V22, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). Nach erneut dreimaliger Spülung mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und Streptactin. Anschließend erfolgte die Auswertung der Western Blots.

Nach Lysierung der Zellen in den Polystyrolflaschen und anschließender Zentrifugation wurde ein Teil der Zellsuspension nach Proteinbestimmung ohne Co-Immünpräzipitation durch Elektrophorese aufgetrennt. Nach Transferieren der Proteine in gleicher Probenanordnung auf zwei SDS-Membranen und anschließend PVDF-Membranen, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-Myc auf einer PVDF-Membran sowie die Inkubation mit ALK5-Antikörper auf der anderen PVDF-Membran. Die Behandlung mit dem Antikörper anti-Myc dient zum direkten Nachweis einer erfolgreichen Überexpression vom Tag-Protein Myc im Lysat und gleichzeitig dem indirekten Nachweis von PAR2. Die Behandlung des anderen Blots mit dem ALK5-Antikörper dient dem Nachweis einer erfolgreichen Überexpression von ALK5-HA im Lysat.

3.8 Statistische Auswertung

3.8.1 Arithmetisches Mittel

Bei der Auswertung der Studienergebnisse fand als basale statistische Zusammenfassung der Mittelwert (\bar{x}) Anwendung. Dieser ergibt sich als Summe aller Einzelergebnisse (x_n) einer gleichen Behandlungsart und dividiert durch die Anzahl der Einzelergebnisse (n).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_n}{n}$$

Da es bei den Einzelergebnissen teilweise zu großen Abweichungen kommt, wird zusätzlich die Standardabweichung angegeben (Schöwe und Knapp, 2010)

3.8.2 Varianz und Standardabweichung

Zur Berechnung der Standardabweichung (s^2) muss zunächst die Varianz berechnet werden. Die Varianz stellt dar, wie weit die Zahlenwerte (x_n) vom Mittelwert (\bar{x}) abweichen. Als Maß der Abweichung wird das Quadrat des Abstands zum Mittelwert angenommen.

$$s^2 = \sum_{i=1}^n (x_n - \bar{x})^2$$

Die Standardabweichung (s) stellt die positive Wurzel aus der Varianz dar. Der Vorteil in der Betrachtung der Standardabweichung liegt im Vergleich zur Varianz darin, dass sie die gleiche Einheit wie die in der Studie bestimmten Zahlenwerte aufweist. Hiermit wird die Homogenität bzw. Heterogenität der erhobenen Daten dargestellt (Weiß, 2013; Harms, 2012; Schöwe und Knapp, 2010).

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_n - \bar{x})^2}$$

3.8.3 Signifikanzberechnung

Mit Hilfe des T-tests wird überprüft, ob die erhobenen Ergebnisse einer Studie als statistisch signifikant gelten oder eher auf Zufall beruhen. Der Test gibt an, ob die definierte Nullhypothese oder die Alternativhypothese angenommen wird. Hierbei gibt er keine Auskünfte über die Ursache oder Konsequenz, sondern lediglich über die statistische Signifikanz. Vor einem Signifikanztest wird das Signifikanzniveau (α -Wert) festgelegt, welches die Wahrscheinlichkeit wiedergibt, einen α -Fehler zu begehen. Das Signifikanzniveau gibt damit die maximale Wahrscheinlichkeit an, eine richtige Nullhypothese fälschlicherweise abzulehnen. Für die Berechnung der Signifikanz wird ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Mit Hilfe des T-Tests konnte mit Microsoft Excel und der erhobenen Daten der p-Wert berechnet werden. Dieser Wert quantifiziert die Wahrscheinlichkeit, dass das erhobene Messergebnis oder ein noch extremerer Wert bestimmt wird, wenn die Nullhypothese zutrifft (Weiß, 2013; Schöwe und Knapp, 2010). Als signifikant gelten P-Werte $< 0,05$. Es wurde generell ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. In den Diagrammen im Ergebnisteil 4.2.1 bis 4.2.3 werden Signifikanzen folgendermaßen dargestellt:

* $\triangleq 0,05 \geq p \geq 0,01$

** $\triangleq 0,01 > p \geq 0,001$

*** $\triangleq p > 0,001$

3.8.4 Bioinformatrische Beratung

Im Rahmen der Durchführung der Versuche in unserer Arbeitsgruppe erfolgte die Inanspruchnahme einer bioinformatrischen Beratung im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkung einer Depletion von PAR2- und ALK5-Protein auf die TGF- β 1-induzierte Smad-Phosphorylierung

Der Versuch ist, wie in den Punkten 3.3 bis 3.4.7 beschrieben, durchgeführt worden.

Die zwei Zelllinien Panc-1 und HaCaT wurden zu je 4×10^5 Zellen in 6-Loch Platten eingesät und nach folgendem Schema transfiziert:

Zelllinie	-	LFA RNAimax	Negative Kontroll siRNA	ALK5- siRNA	PAR2- siRNA
Panc-1	2 (+/- TGF-β1)		2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)
HaCaT	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)

Tab. 10: Transfektionsschema der siRNA: Es wurden jeweils 2 Lochkammern der Zelllinien HaCaT- und Panc-1-Zellen nach obigem Transfektionsschema behandelt und mit oder ohne TGF- β 1 für eine Stunde behandelt: „-“ $\hat{=}$ keine Transfektion; LFA RNAimax $\hat{=}$ nur Lipofectamin RNAimax ohne siRNA; sonstige Transfektion der Zellen nach Überschrift

Transfiziert wurden die Zelllinien Panc-1 und HaCaT mit den oben angegebenen siRNAs. Anschließend wurde durch die Bestimmung der phosphorylierten Smad2- und Smad3-Proteine relativ zur Menge an Gesamt-Smad2/3-Proteine mittels Westernblot der Effekt einer PAR2- bzw. ALK5-Depletion untersucht.

4 Ergebnisse

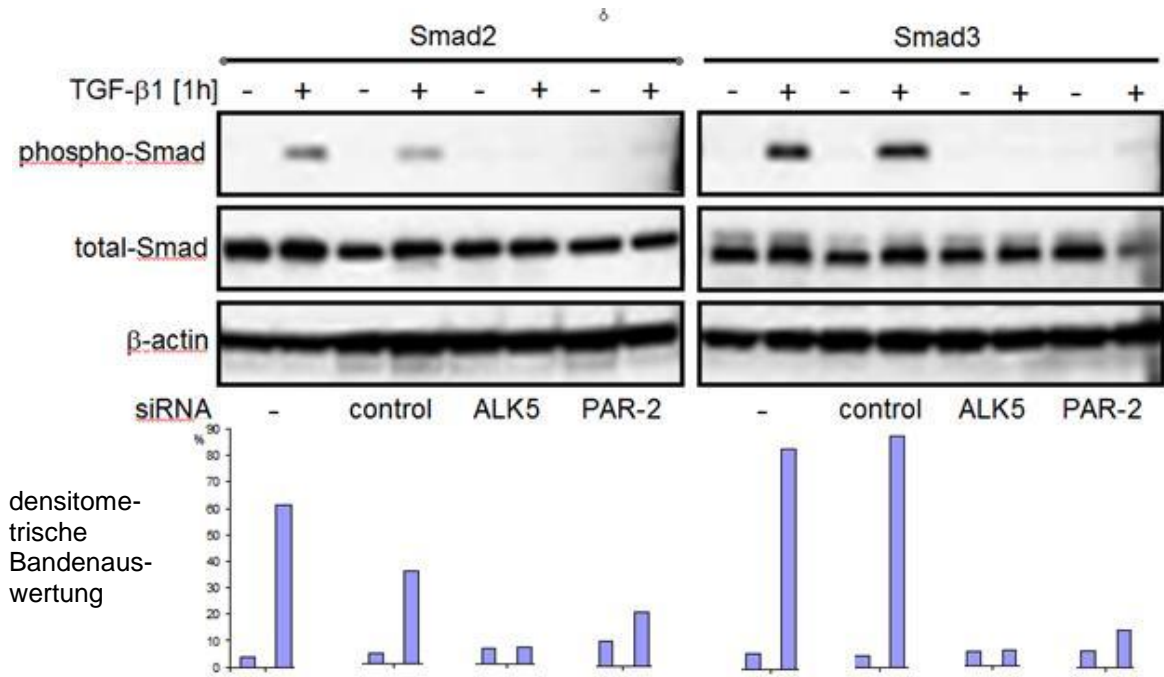


Abb. 12: Panc-1-Zelllinie: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF-β1 für 1 Stunde erfolgte die Bestimmung der C-terminalen Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 im Western Blot. Der Nachweis des entsprechenden Gesamt-Smad Proteins (total-Smad) und von β-Actin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung aller Taschen. Die Grafik unter den Western Blots zeigt die Ergebnisse einer densitometrischen Auswertung der einzelnen Banden im Vergleich zum β-Actin (phospho-Smad2/ β-Actin bzw. phospho-Smad3/ β-Actin). Die Abbildung zeigt einen Versuch, der repräsentativ für vier unabhängige Experimente ist.

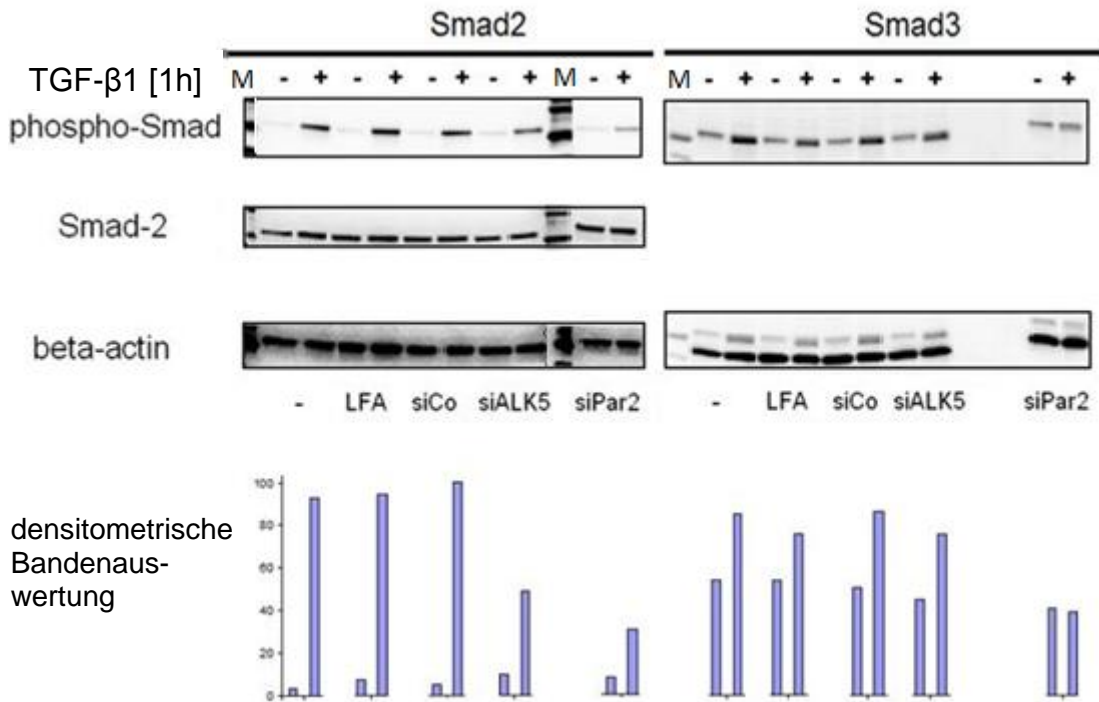


Abb. 13: HaCaT-Zelllinie: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF- β 1 für 1 Stunde erfolgte die Bestimmung der C-terminalen Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 im Western Blot. Der Nachweis des entsprechenden Gesamt-Smad2 Proteins (Smad2) und von β -Actin (beta-actin) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung aller Spuren. Die Grafik unter den Western Blots zeigt die Ergebnisse einer densitometrischen Auswertung der einzelnen Banden im Vergleich zum β -Actin (phospho-Smad2/ β -Actin bzw. phospho-Smad3/ β -Actin). Die Abbildung zeigt einen Versuch, der repräsentativ für vier unabhängige Experimente ist.

M = Molekulargewichtsmarker

Es wurde zum Vergleich β -Actin im Westernblot bestimmt, das als Zytoskelettprotein nicht an diesem intrazellulären Signalweg beteiligt ist, in der Zelle ubiquitär vorkommt und nicht durch TGF- β 1 reguliert wird. Es diente als Beladungskontrolle.

Sowohl bei den Panc-1-Tumorzellen als auch bei den HaCaT-Zellen wurde eine Fraktion der Zellen ohne Transfektionsagens und ohne siRNA („-“) bzw. nur mit Transfektionsagens aber ohne siRNA („LFA“) behandelt (siehe Abb. 11 und 12). Nach einer einstündigen Inkubation mit TGF- β 1 war anhand der Bandenintensität erkennbar, dass es zu einer C-terminalen Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 gekommen war.

Eine weitere Fraktion der Panc-1-Zelllinie wurde mit einer negativen Kontroll-siRNA (s. Abb. 3.1) transfiziert, die zu keiner bekannten mRNA komplementär ist.

Auch in dieser Gruppe erkennt man bei den mit TGF- β 1 behandelten Zellen eine Zunahme der Phosphorylierung beider Smad-Proteine.

Bei den mit ALK5-siRNA transfizierten Panc-1 Zellen ist nach Inkubation mit TGF- β 1 eine erhebliche Reduktion des Signals für phosphoryliertes Smad2 und 3 erkennbar, was auf eine verminderte Phosphorylierung hindeutet, da die Menge von unphosphorylierten (\cong Gesamt-) Smad2 und 3 unverändert war. Bei den mit PAR2-siRNA transfizierten Panc-1 Zellen kam es ebenfalls nach TGF- β 1 Inkubation zu einer deutlich niedrigeren Signalstärke der Banden.

Die Zelllinie HaCaT wies ebenfalls eine deutliche Steigerung der Signalstärke der Banden nach TGF- β 1 Behandlung der untransfizierten Zellen sowie der Transfektionskontrollen auf (siehe Abb. 12, „-“, „LFA“ und „siCo“). Die Bande der mit ALK5-siRNA transfizierten Zellen wies ein schwächeres Phosphorylierungssignal auf als die Kontrollen und zwar sowohl bei Smad2 als auch bei Smad3.

Bei der Beurteilung der Bande von HaCaT-Zellen mit transfizierter PAR2-siRNA zeigte sich eine deutlich verminderte Signalstärke von phosphorylierten Smad2 und Smad3. Die Abhängigkeit der Smad-Phosphorylierung in beiden Zelllinien von der Expression von PAR2 ist somit deutlich erkennbar und könnte somit eine erhebliche Bedeutung in der TGF- β 1 Signaltransduktion besitzen.

4.2 Auswirkung einer Depletion von PAR2 und ALK5 auf die TGF- β 1-induzierte Transkriptionsaktivität von TGF- β 1/Smad-abhängigen Reporter genen

Nachdem unter 4.1 gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von Smad2 und Smad3 durch TGF- β 1 als Folge der PAR2 Depletion reduziert oder ganz verlorengegangen war, wurde im folgenden Versuch überprüft, ob sich die gestörte Smad-Aktivierung funktionell in einer Störung der TGF- β 1/Smad-abhängigen Aktivierung der Transkription niederschlägt. Dazu wurden Panc-1-Zellen mit den TGF- β 1/Smad-empfindlichen Reporterplasmiden p6SBE-luc bzw. p(CAGA)₁₂-MLP-luc transfiziert und zusammen mit dem nicht-regulierten pRL-TK-luc Plasmid als Transfektionskontrolle.

Zusätzlich wurden die Zellfraktionen noch mit den folgenden siRNAs transfiziert (der Versuch wurde, wie unter Punkt 3.3 beschrieben, durchgeführt):

p6SBE-luc	p(CAGA) ₁₂ -MLP-luc
Nur Medium „-“	Nur Medium „-“
Negative Kontroll siRNA	Negative Kontroll siRNA
PAR2 siRNA	PAR2 siRNA
ALK5 siRNA	ALK5 siRNA

Tab. 11: Transfektionsschema der Panc-1-Zelllinie

Anschließend erfolgte eine TGF- β 1 Inkubation der Zellen mit TGF- β 1 (5 ng/ml) für 24 Stunden. Wenn die TGF- β 1-induzierte intrazelluläre Signalkaskade keine Störung erfährt, so kommt es über eine Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 und nachfolgender Bindung an Smad4 zu einem Transkriptionsfaktorkomplex, der nach Bindung an ein *Smad-binding element* (SBE) in der DNS der beiden Reporter gene zu deren transkriptioneller Aktivierung führt. Als Reporter gene enthalten beide Plasmide das Gen für das Enzym Luziferase des Glühwürmchens, dessen Aktivität mit Hilfe des Dual Luciferase Assay Systems (Promega, Heidelberg) luminometrisch detektiert werden kann.

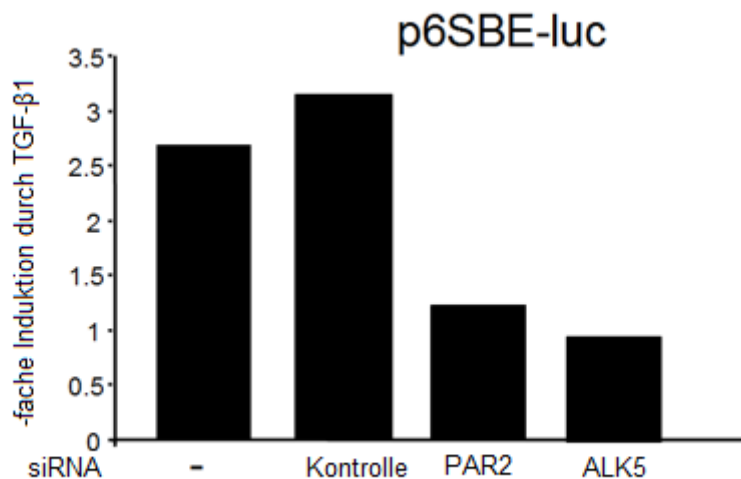


Abb. 14: Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Panc-1 Zellen mit p6SBE-luc/pRL-TK-luc und den aufgeführten siRNAs mit nachfolgender TGF- β 1-Inkubation für 24 Stunden. Dargestellt ist die x-fache Induktion der Luziferaseaktivität durch TGF- β 1 über die zugehörige unstimulierte Kontrolle. Die Abbildung zeigt einen Versuch, der repräsentativ für fünf unabhängige Experimente ist.

Die erste Säule stellte als Kontrolle eine Transfektion lediglich mit dem p6SBE-luc/pRL-TK-luc dar (ohne siRNA). Man konnte eine hohe Aktivität der Luziferase erkennen. Eine ebenfalls hohe Aktivität zeigte sich bei der transfizierten negativen Kontroll-siRNA. Bei einer Transfektion von PAR2-siRNA zeigte sich eine deutliche Aktivitätsabnahme der TGF- β 1-induzierten Luziferaseaktivität. Bei einer ALK5 Hemmung über ALK5-siRNA konnte ähnlich wie bei PAR2 Inhibition über siRNA eine deutliche Reduktion der durch TGF- β 1 induzierten Luziferase-Aktivität nachgewiesen werden.

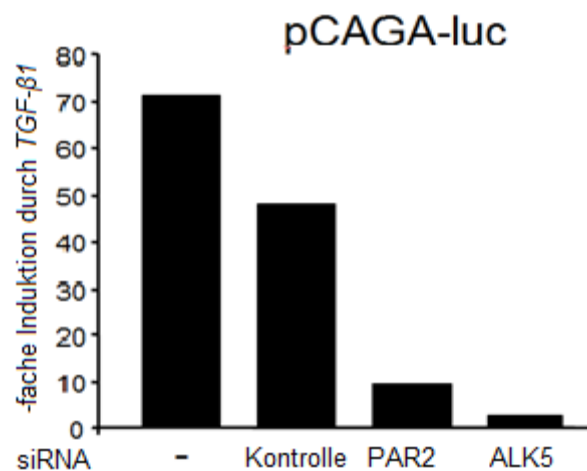


Abb. 15: Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Panc-1 Zellen mit p(CAGA)₁₂-MLP-luc (pCAGA-luc) sowie pRL-TK-luc und den aufgeführten siRNAs mit nachfolgender TGF- β 1-Inkubation für 24 Stunden. Dargestellt sind die x-fache Induktion der Luziferaseaktivität durch TGF- β 1 über die zugehörige unstimulierte Kontrolle. Die Abbildung zeigt einen Versuch, der repräsentativ für fünf unabhängige Experimente ist.

Bei der Transfektion des Plasmids p(CAGA)₁₂-MLP-luc und der entsprechenden siRNAs kam es ebenfalls zu charakteristischen Regulationseffekten. In den Zellfraktionen ohne siRNA und mit negativer Kontroll-siRNA zeigte sich erneut eine deutliche Aktivitätszunahme der Luziferaseaktivität durch TGF- β 1. Im Gegensatz dazu war bei der Transfektion von PAR2-siRNA sowie ALK5-siRNA die Luziferaseaktivität deutlich reduziert.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass PAR2 und ALK5 in Panc-1 Zellen eine erhebliche Bedeutung bei der TGF- β 1-vermittelten Transkriptionsaktivität haben.

4.3 Auswirkung einer Depletion von PAR2 und ALK5 Protein auf den TGF- β 1-induzierten Proliferationsarrest

Nachdem in den vorherigen Versuchen die zellulären Effekte einer Inhibition der PAR2- und ALK5-Expression untersucht wurde, werden in dieser Versuchsreihe die quantitativen Auswirkungen auf eine onkologisch sehr relevante Zellantwort auf TGF- β 1 untersucht, nämlich der Suppression der Proliferation von Tumorzellen. Dieser Versuch wurde mit den Zelllinien Panc-1, HaCaT und HMEEC durchgeführt (siehe Punkt 3.5), nach folgendem Schema transfiziert sowie für 24 Stunden mit TGF- β 1 (5 ng/ml) behandelt:

Zelllinie	Negative Kontroll-siRNA	PAR2-siRNA	ALK5-siRNA
Panc-1	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)
HaCaT	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)
HMEEC	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)	2 (+/- TGF-β1)

Tab. 12: Transfektionsschema der Zelllinien Panc-1, HaCaT und HMEEC mit Anzahl der Lochkammern einer identisch transfizierten Zellfraktion (jeweils eine mit und ohne TGF- β 1 Inkubation für 24 Stunden)

4.3.1 Proliferationsinhibitionsversuch der Zelllinie Panc-1

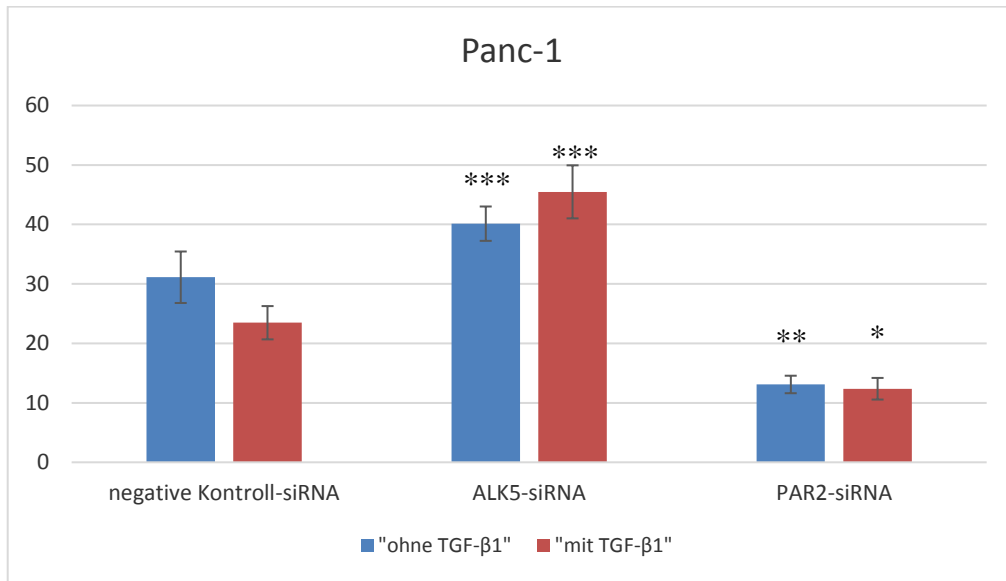


Abb. 16: Zelllinie Panc-1: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF-β1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedes XS (Roche). Im Durchschnitt erfolgten sechs Zählungen pro behandelte Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung s. Tabelle). Signifikanz (bezogen auf die negative Kontroll-siRNA): * $\triangleq 0,05 \geq p \geq 0,01$; ** $\triangleq 0,01 > p \geq 0,001$; *** $\triangleq p > 0,001$

	Mittelwert ± SA Zellzahl · 10 ⁵ ohne TGF-β1	Mittelwert ± SA Zellzahl · 10 ⁵ mit TGF-β1	Zellzunahme(+) bzw. -abnahme (-) in %
Negative Kontroll-siRNA	31,12 ± 4,33	23,47 ± 2,80	-24,58
ALK5-siRNA	40,13 ± 2,89	45,48 ± 4,46	+13,33
PAR2-siRNA	13,09 ± 1,47	12,37 ± 1,82	-5,50

Tab. 13: Zellzählung von Panc-1 nach Transfektion und Inkubation mit TGF-β1 für 24 Stunden, hier sind die Mittelwerte aus 6 Zählungen pro Transfektion mit Standardabweichung (SA) dargestellt.

Man erkennt eine deutliche Proliferationshemmung der Panc-1-Tumorzellen bei der Begutachtung der negativen Kontroll-siRNA (24,58%) bei der Behandlung mit TGF-β1 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei diesen Kontroll-Zellen wurden keine siRNAs transfiziert, die in die intrazelluläre Signalkaskade von PAR2 und ALK5 eingreifen. Wie im Punkt 1.3.4 beschrieben, bewirkt TGF-β1 hier eine Proliferationsinhibition. Bei der Transfektion mit ALK5-siRNA gab es keinen inhibitorischen Effekt mehr.

Im Gegenteil kam es paradoxerweise zu einer Zunahme der Zellzahl um 13,33% gegenüber den nicht TGFβ1-inkubierten Zellen (berechnete Signifikanz: ALK5-siRNA ohne TGF-β1: $7,43846 \cdot 10^{-8}$, ALK5-siRNA mit TGF-β1: $9,4032 \cdot 10^{-13}$). Bei PAR2-Inhibition der Panc-1-Zellen mit PAR2-siRNA kam es zu einer Reduktion der Zellzahl um lediglich 5,50%. Hierbei zeigt sich, dass TGF-β1 ohne PAR2 Expression offenbar keine Proliferationshemmung ausüben kann (berechnete Signifikanz PAR2-siRNA ohne TGF-β1: $3,3740 \cdot 10^{-3}$, PAR2-siRNA mit TGF-β1: $3,2891 \cdot 10^{-2}$).

4.3.2 Proliferationinhibitionsversuch der Zelllinie HaCaT

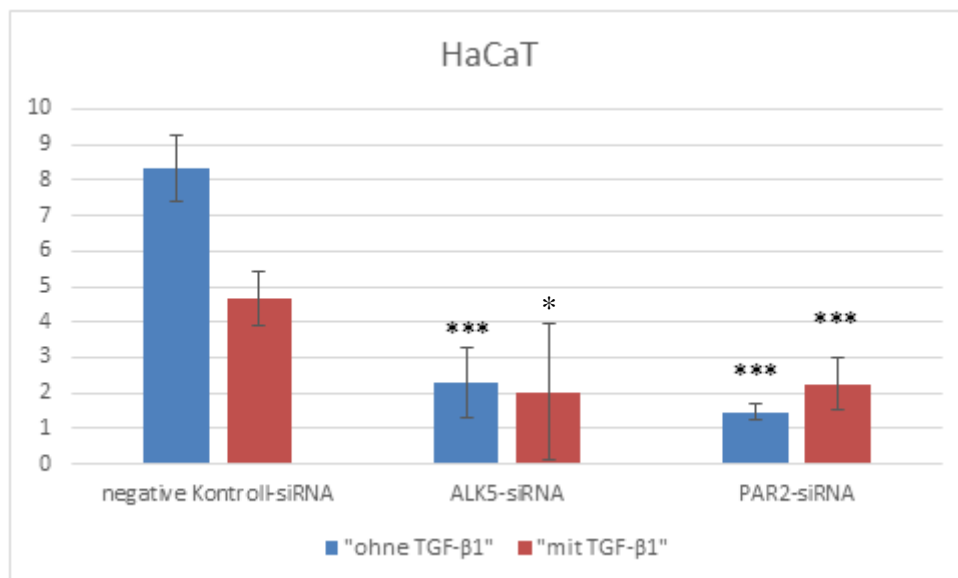


Abb. 17: Zelllinie HaCaT: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF-β1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedes XS (Roche). Im Durchschnitt erfolgten sechs Zählungen pro behandelte Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung s. Tabelle). Signifikanz (bezogen auf die negative Kontroll-siRNA): * $\triangleq 0,05 \geq p \geq 0,01$; ** $\triangleq 0,01 > p \geq 0,001$; *** $\triangleq p > 0,001$

4 Ergebnisse

	Mittelwert \pm SA Zellzahl $\cdot 10^5$ ohne TGF- β 1	Mittelwert \pm SA Zellzahl $\cdot 10^5$ mit TGF- β 1	Zellzunahme(+) bzw. -abnahme (-) in %
Negative Kontroll- siRNA	8,33 \pm 0,95	4,67 \pm 0,78	-43,94
ALK5-siRNA	2,27 \pm 0,99	2,07 \pm 1,91	-11,01
PAR-2-siRNA	1,45 \pm 0,23	2,25 \pm 0,74	+55,17

Tab. 14: Zelllinie HaCaT: nach Transfektion und Inkubation mit TGF- β 1, hier sind die Mittelwerte aus 6 Zählungen pro Transfektion mit Standardabweichung (SA) dargestellt

Bei der Analyse der Zelllinie HaCaT erkennt man wie in Panc-1 Zellen bei den negativen Kontroll-Zellen mit TGF- β 1 Inkubation eine Abnahme der Proliferation von 43,94%. Bei einer Blockierung von ALK5 durch ALK5-siRNA erkennt man, dass TGF- β 1 keine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl bewirkt (berechnete Signifikanz ALK5-siRNA ohne TGF- β 1: $3,39399 \cdot 10^{-6}$, ALK5-siRNA mit TGF- β 1: $1,1542 \cdot 10^{-2}$). Beim „Silencing“ von PAR2 durch PAR2-siRNA war zwar eine starke Reduktion der Zellzahl in TGF- β 1-behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen, jedoch war der hemmende Effekt von TGF- β 1 nicht mehr vorhanden (berechnete Signifikanz: PAR2-siRNA ohne TGF- β 1: $2,80012 \cdot 10^{-7}$, PAR2-siRNA mit TGF- β 1 $6,54047 \cdot 10^{-5}$). Zusammenfassend weist dieses Resultat darauf hin, dass PAR2 auch für die TGF- β 1 vermittelte Zellproliferationshemmung bei der Zelllinie HaCaT von Bedeutung ist.

4.3.3 Proliferationsinhibitionsversuch der Zelllinie HMEEC

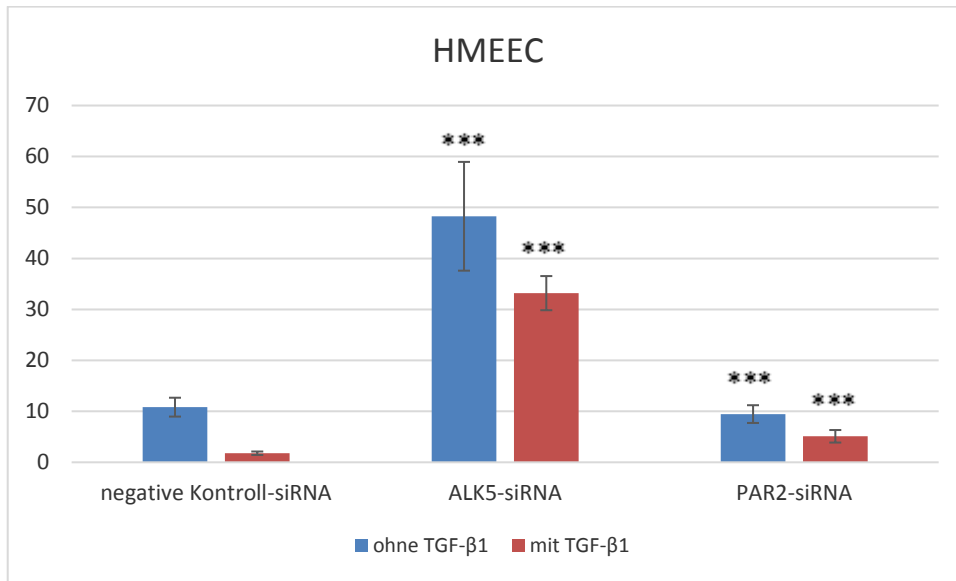


Abb. 18: Zelllinie HMEEC: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF-β1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedex XS (Roche). Im Durchschnitt erfolgten sechs Zählungen pro behandelte Zellen (Mittelwert mit Standardabweichung s. Tabelle). Signifikanz (bezogen auf die negative Kontroll-siRNA): * $\triangleq 0,05 \geq p \geq 0,01$; ** $\triangleq 0,01 > p \geq 0,001$; *** $\triangleq p > 0,001$

	Mittelwert ± SA Zellzahl · 10 ⁵ ohne TGF-β1	Mittelwert ± SA Zellzahl · 10 ⁵ mit TGF-β1	Zellzunahme(+) bzw. -abnahme (-) in %
Negative Kontroll-siRNA	10,82 ± 1,85	1,78 ± 0,34	-83,55
ALK5-siRNA	48,27 ± 10,67	33,19 ± 3,35	-31,24
PAR2-siRNA	9,46 ± 1,74	5,10 ± 1,23	-46,09

Tab. 15: Zelllinie HMEEC: nach Transfektion und Inkubation mit TGF-β1, hier sind die Mittelwerte aus 6 Zählungen pro Transfektion mit Standardabweichung (SA) dargestellt

Bei der Untersuchung der Zelllinie HMEEC konnte man bei Zellen, die mit negativer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, eine Verminderung der Proliferationsrate um 83,55% erkennen. Bei der Betrachtung der Wirkung einer Deletion des PAR2 Proteins bei der Zelllinie HMEEC zeigte sich eine deutliche Verminderung der Zellproliferationsinhibition durch TGF-β1 gegenüber der Kontrolle (berechnete Signifikanz: PAR2-siRNA ohne TGF-β1 $4,2550 \cdot 10^{-6}$, PAR2-siRNA mit TGF-β1: $6,0656 \cdot 10^{-4}$).

Wie erwartet, kam es bei der Inhibition von ALK5 über ALK5-siRNA zu einer stark verminderten Proliferationshemmung (31,24%, berechnete Signifikanz: ALK5-siRNA ohne TGF- β 1: $3,6347 \cdot 10^{-4}$, ALK5-siRNA mit TGF- β 1 $1,2981 \cdot 10^{-5}$). Insgesamt kam es jedoch zu einer deutlichen Zellzahlvermehrung der Zellen bei ALK5 Inhibition im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dies bedeutet, dass ALK5 in dieser Zelllinie zwar für die TGF- β 1 induzierte Proliferationsinhibition eine wesentliche Bedeutung einnimmt, die basale Proliferationsrate aber zu hemmen scheint (siehe Diskussion).

Zusammenfassend kann man zu den Ergebnissen mit den HMEEC feststellen, dass auch für diese Zellen PAR2 eine wesentliche Komponente der TGF- β 1 induzierten Proliferationshemmung darstellt.

4.4 Die Untersuchung der Art der Interaktion von PAR2 mit ALK5

Der Versuch wurde, wie unter Punkt 3.7 beschrieben, durchgeführt. In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Depletion von PAR2 bzw. ALK5 zu ähnlichen Veränderungen führte und zwar zu einer Hemmung von TGF- β 1-abhängiger Smad-Aktivierung und Proliferationsinhibition. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide Rezeptoren funktionell miteinander interagieren. Im folgenden Versuch soll nun in Panc-1-Zellen untersucht werden, ob es eine direkte physische Interaktion beider Proteine gibt.

Diese wurden mit verschiedenen Plasmiden nach folgendem Schema transfiziert:

Behandlung	Lipofectamin 2000	PAR2-myc-DKK+pcDNA3	ALK5-HA+pcDNA3	PAR2-myc-DKK+ALK5-HA
30 Min. TGF- β 1	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen
60 Min. TGF- β 1	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen	1·10 ⁶ Zellen

Tab. 16: Transfektionsschema der Zelllinie Panc-1. Es wurden gleiche Mengen an Gesamt-DNS durch Auffüllung mit Leervektor (pcDNA3) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Inkubation mit TGF- β 1 für die Hälfte der transfizierten Zellen für 30 Minuten und für die andere Hälfte für 60 Minuten.

Durch die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden kam es zu einer Überexpression der entsprechenden Proteine in der Zelle. An den überexprimierten Proteinen befinden sich sogenannte „tags“, welche aus einer kleinen Peptidstruktur bestehen und für die spätere Anreicherung im Rahmen der Co-Immunpräzipitation notwendig sind. In der Co-Immunpräzipitation banden Antikörper, welche dem Zelllysate hinzugefügt wurden und sich mit ihrem Fab-Anteil gegen den „tag“-Anteil der Fusionsproteine richteten, mit ihrem am Fc-Anteil gebundenen magnetischen „bead“ an den Magneten der Säule. Anschließend erfolgte die Trennung der „tag“-Proteine von dem Antikörper und das jeweilige Protein konnte in einem Eppendorfgefäß isoliert werden. Dieses Verfahren dient zur Isolation und Aufkonzentrierung von Proteinen aus einem Zelllysate, in welchem das Protein lediglich in einer geringen Konzentration enthalten ist.

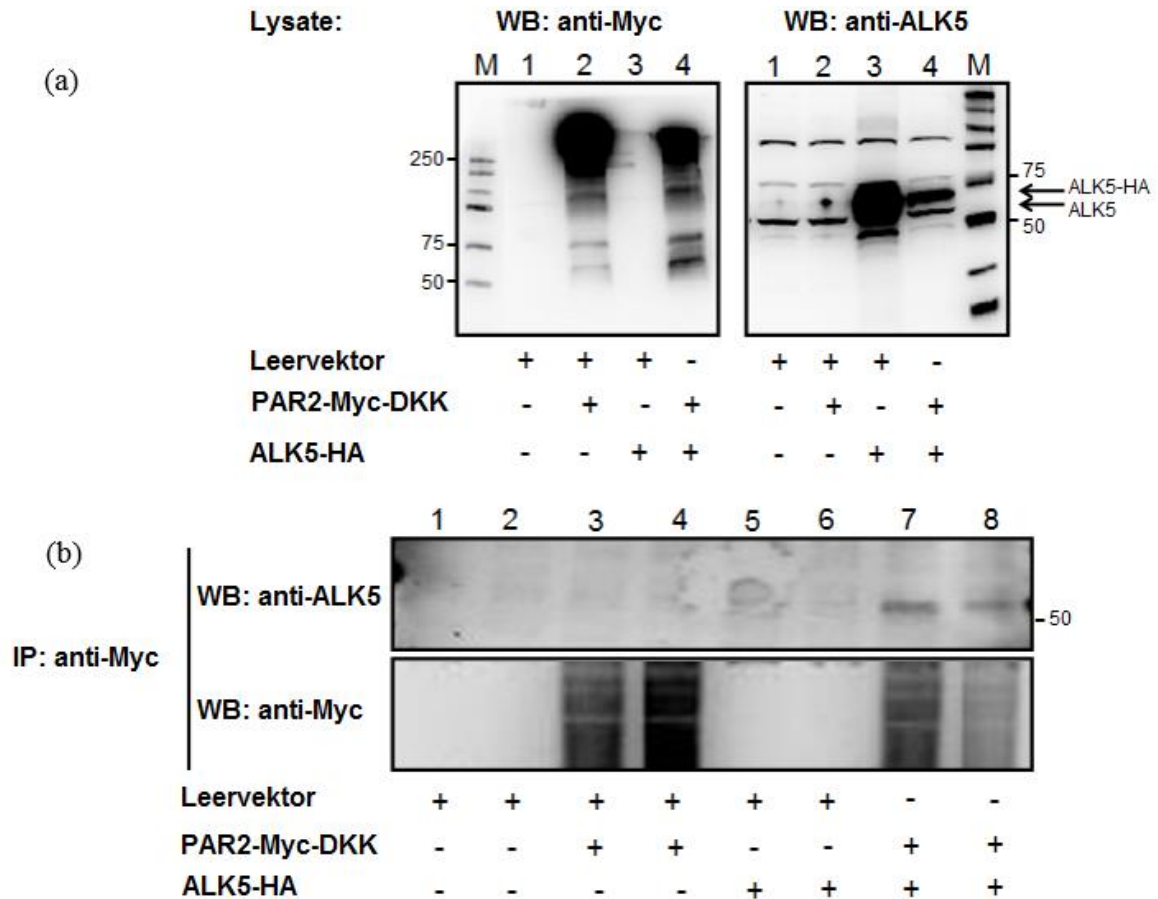


Abb. 19: (a) Westernblot der Zelllysate ohne Co-Immünpräzipitation: Der linke Westernblot wurde mit dem Primärantikörper anti-myc und der rechte mit anti-ALK5 inkubiert. M = Molekulargewichtsmarker, WB = Westernblot

(b) oben: Darstellung eines Westernblots mit ALK5 (Primärantikörper: anti-ALK5) nach vorheriger Co-Immünpräzipitation von ektop exprimiertem PAR2 Protein mittels anti-Myc-Antikörper unten: Darstellung eines Westernblots mit dem „tag“-Protein (Primärantikörper: anti-myc). M = Molekulargewichtsmarker, WB = Westernblot, IP = Co-Immünpräzipitation

Die Abbildung zeigt einen Versuch, der repräsentativ für vier unabhängige Experimente ist.

Nachdem im Rahmen einer Co-Immünpräzipitation das Protein PAR2-myc-DKK isoliert werden konnte, wurde anschließend ein ALK5-Antikörper im Westernblot verwendet.

Nach der Behandlung des Blots mit dem ALK5-Antikörper erhält man nur dann ein Signal, wenn eine direkte oder indirekte physische Interaktion zwischen dem isolierten PAR2-myc-DKK und ALK5-HA besteht und beide aus diesem Grund zuvor ko-präzipitiert werden konnten.

In den Kontrollen (Lipofectamin 2000 alleine, nur PAR2-Myc-DKK oder nur ALK5-HA mit jeweils Leervektor) konnten keine Signale nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die Zellen mit TGF- β 1 für 30 oder 60 Minuten stimuliert worden waren.

Die Zellen, die lediglich mit dem Plasmid PAR2-Myc-DKK transfiziert wurden, zeigten nach Behandlung mit dem ALK5-Antikörper im Westernblot mit und ohne TGF- β 1-Inkubation keine Signale, da ALK5 nicht über Plasmidtransfektion überexprimiert wurde und der endogene Anteil von ALK5 zur Signaldarstellung quantitativ nicht ausreicht. Die Panc1-Zellen, die mit dem Plasmid ALK5-HA transfiziert wurden, zeigten ebenfalls keine Signale, da im Rahmen der Co-Immunpräzipitation lediglich das Protein PAR2-myc-DKK isoliert werden konnte, welches in dieser Zellfraktion nicht transfiziert wurde. Aus diesem Grund konnte im Westernblot auch keine Darstellung von Signalen nach Behandlung mit ALK5-Antikörpern erfolgen. Nur die Zellfraktion, die sowohl mit dem Plasmid PAR2-Myc-DKK als auch mit ALK5-HA transfiziert wurde, wies deutliche Banden auf. Hierbei konnte nach Isolierung des Proteins PAR2-Myc-DKK durch Co-Immunpräzipitation erfolgreich das Protein ALK5-HA durch Antikörperbehandlung im Westernblot nachgewiesen werden. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass eine physische Interaktion von PAR2 mit ALK5 im Zelllysate vorhanden sein musste.

Um den Nachweis zu erbringen, dass auch direkt nach Lyse und vor der Co-Immunpräzipitation der Zellen ALK5-HA und PAR2-myc-DKK ausreichend im Zelllysate vorhanden waren, erfolgte der Nachweis mit anti-myc-Antikörper und anti-ALK5-Antikörper in einem gesondertem Western Blot (siehe Abb. 18 (a)). Dieser Nachweis konnte durch eine deutliche Bandendarstellung erbracht werden.

5 Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas` ist eine hochmaligne Tumorerkrankung mit einer oft infausten Prognose. In den westlichen Ländern belegt es aufgrund der hohen Mortalitätsrate Platz vier in der Rangliste der häufigsten Krebstodesursachen (Jemal et al., 2013). In Deutschland erkranken jährlich etwa 16.000 Menschen an einem duktalem Pankreaskarzinom (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V., Robert Koch Institut, 2015). Die Diagnosestellung des Tumors erfolgt meist in einem Stadium der Metastasierung, so dass therapeutische Behandlungsmaßnahmen bei einer 5 Jahres-Überlebensrate von weniger als 5% sehr eingeschränkt sind (Schneider et al., 2005). Aus diesem Grund ist es von erheblicher Bedeutung, neue biologische und zielgerichtete Strategien zur Behandlung dieser Tumorentität zu entwickeln, auch weil diese sich durch eine geringe Chemosensitivität bzw. erhöhte Chemoresistenzentwicklung auszeichnet (Nakano et al., 2007).

Sowohl PAR2 als auch TGF- β 1 haben unterschiedlich physiologische und pathophysiologische Funktionen im Zellstoffwechsel. In fortgeschrittenen Stadien der Tumorprogression fördern sie beide das Wachstum des Primärtumors, die Proliferation von Tumorzellen (Iwaki et al., 2008; Shimamoto et al., 2004) sowie deren Migration, Invasion und Metastasierung (Jaber et al., 2014; Kaufmann et al., 2009; Su et al., 2009; Morris et al., 2006; Shi et al., 2004; Ge et al., 2004; Hjortoe et al., 2004). Erste Hinweise für eine funktionelle Kooperation zwischen den PAR-Proteinen und dem TGF- β -Signalweg kamen von Burch und Mitarbeitern, die nach einer *ex vivo* Behandlung von glatten Gefäßmuskelzellen mit Thrombin eine Transaktivierung von ALK5 durch PAR1 mit anschließender Phosphorylierung der Smad-Proteine sowie eine erhöhte Proteoglykansynthese beobachteten (Burch et al., 2010).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nach einer Inhibition der PAR2 Expression mittels siRNA die durch TGF- β 1 induzierte Phosphorylierung des C-Terminus von Smad2 und Smad3 sowohl in Pankreaskarzinom-Zellen als auch in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT drastisch reduziert war.

Es wurde somit die Hypothese aufgestellt, dass das Vorliegen von PAR2-Protein in der Zelle essentiell für die Aktivierung des TGF- β 1 Signalwegs ist.

In den Reporter-gen-Assays ließen sich die Auswirkungen einer Transfektion der Zellen mit PAR2- oder ALK5-siRNA nicht nur biochemisch, sondern auch funktionell auf die durch TGF- β 1/Smad induzierte Gentranskription nachweisen. Es kam nach Inhibition beider Proteine in Panc-1-Zellen zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität der Reporter-Gene p(CAGA)₁₂-MLP-luc und p6SBE-luc. Dieses Ergebnis passt gut zu Daten von Dennler und Kollegen, die eine erhöhte Smad3C-Abhängigkeit des p(CAGA)₁₂-MLP-luc Reportergens nachgewiesen haben (Dennler et al., 1998). Dieser Versuch unterstreicht die große Bedeutung von PAR2 sowie ALK5 für die TGF- β 1-abhängige Smad2/3-Phosphorylierung und die daraus resultierenden Veränderungen in der Aktivität von TGF- β 1 responsiven Genen in Pankreastumorzellen.

In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass in Panc-1- und HaCaT-Zellen die Zellzahl in TGF- β 1-behandelten Kulturen nach einer Depletion sowohl von PAR2 als auch ALK5 über siRNA relativ zur nicht-TGF- β 1-behandelten Kontrolle nicht mehr geringer war, also die TGF- β 1-induzierte Proliferationsinhibition vermindert oder völlig aufgehoben war. Dies ist in den meisten Zellen auf eine verminderte Bildung von phosphoryliertem Smad3C zurückzuführen (Kretschmer et al., 2003). PAR2 scheint zusätzlich für die Biosynthese des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors (CDK-Inhibitor) p21^{WAF1} erforderlich zu sein, da bei einer PAR2 Depletion die TGF- β 1-Induktion dieses CDK-Inhibitors sowohl in Panc1- als auch in HaCaT-Zellen im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte (Daten aus der AG Ungefroren, in dieser Arbeit nicht dargestellt). So ist bei einer PAR2-Depletion und der daraus resultierenden Wirkung auf den Verlust der Proliferationsinhibition der Tumorzellen vermutlich auf eine verminderte Expression von p21^{WAF1} (Gartel und Radhakrishnan, 2005) zurückzuführen. In Panc1-Zellen mit ALK5 Depletion zeigte sich sowohl in unbehandelten als auch in TGF- β 1-behandelten Zellen eine paradoxe Zunahme der Zellproliferation im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen.

Dieses Phänomen ist wahrscheinlich eine Folge der Aufhebung der unter Zellkulturbedingungen ablaufenden, autokrinen, über TGF- β und ALK5 vermittelten Wachstumsinhibition der Zellen (Ungefroren et al., 2011).

TGF- β 1 fördert die EMT und die Bildung von extrazellulären Matrixproteinen. Bei Panc-1-Zellen kommt es nach Behandlung mit TGF- β 1 zu einer Herunterregulation von Genen für epitheliale Marker und einer Hochregulation von Genen, die für mesenchymale Marker und extrazelluläre Matrixproteine kodieren (Ungefroren et al, 2011). In einem früheren Experiment unserer Arbeitsgruppe konnte nach Inhibition von ALK5 durch den spezifischen Inhibitor SB431542 die morphologischen Veränderungen, die die Zellen bei der TGF- β 1-induzierten EMT durchlaufen, verhindert werden (Ungefroren et al., 2011). Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe in Panc-1-Zellen zeigen, dass nach einer PAR2-Depletion die TGF- β 1-induzierte Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-2 und MMP-9 sowie des EMT-assoziierten Transkriptionsfaktors Slug reduziert war. Da EMT eine Voraussetzung für die Migration und Invasion von Tumorzellen darstellt, ist die Bedeutung von PAR2 und ALK5 auch für die Motilität von Pankreastumorzellen klar ersichtlich. Eine weiterführende Abklärung ist Gegenstand aktueller Forschung in der Arbeitsgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von PAR2 Protein mittels RNA Interferenz inhibiert. Ein Nachweis der reduzierten Proteinmenge im Western Blot war wegen des Fehlens Western Blot-tauglicher Antikörper leider nicht möglich, wurde aber mittels Durchflusszytometrie von einer Mitarbeiterin der AG Ungefroren erbracht. Um auch in positiver Weise zu zeigen, dass die Reduktion des Proteins (und nicht der mRNA) für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, wurde zusätzlich eine ektope Überexpression von PAR2 in Panc-1-Zellen vorgenommen und die so veränderten Zellen im Luziferaseassay untersucht. Wie erwartet, zeigte sich, dass die TGF- β 1-vermittelte transkriptionelle Aktivität auf das Reporterogen p(CAGA)₁₂-MLP-luc bei einer Überexpression von PAR2 im Vergleich zu Panc-1-Zellen, die mit einer Leervektor-Kontrolle transfiziert worden waren, erhöht war.

PAR2 ist ein Oberflächenprotein und seine Funktion wird durch Gq/G12/13 oder über β -Arrestin vermittelt (Ramachandran et al., 2011 und Soh et al., 2010).

Wie bereits zu Beginn der Diskussion erwähnt, stellt sich die Frage, ob PAR2 für seine Fähigkeit, TGF- β 1-vermittelte Antworten zu fördern, eine Signaltransduktion machen muss.

Aus weiteren Versuchen unserer AG mit GB88, einem PAR2-spezifischen pharmakologischen Inhibitor, gab es Hinweise darauf, dass eine Aktivierung von PAR2 mit einer nachfolgenden Freisetzung von intrazellulärem Kalzium dafür nicht notwendig ist. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass eine gleichzeitige Applikation von TGF- β 1 und dem PAR2-agonistischen Peptid (AP) keine zusätzliche Phosphorylierung von Smad2 und -3 in Panc1-Zellen hervorrufen konnte im Vergleich zu einer Einzelbehandlung mit TGF- β 1, während sich in Colo357-Zellen lediglich ein sehr geringer Effekt nachweisen ließ (unveröffentlichte Daten).

Bei einer Betrachtung des Migrationsverhaltens der Tumorzellen bei einer gleichzeitigen Behandlung mit TGF- β 1 und PAR2-AP zeigte sich hingegen ein additiver Effekt im Vergleich zu einer Einzelbehandlung der Tumorzellen (unveröffentlichte Daten). Wenn jedoch eine gleichzeitige Hemmung von PAR2 und ALK5 erfolgte, so kann kein zusätzlicher oder synergistischer Hemmeffekt bei einer TGF- β 1-induzierten Aktivierung der Smad2 oder -3 Proteine gesehen werden (Zeeh et al., 2016). Auch diese Beobachtung weist darauf hin, dass PAR2 und ALK5 beide zu demselben Signalweg gehören und somit auch gemeinsam an der Tumorprogression beteiligt sind.

In dieser Dissertation konnte in einem Versuch über die Methode der Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden, dass bei einer spezifischen Präzipitation von transfiziertem PAR2-myc-DKK Fusionsprotein mittels eines gegen das myc-Peptid gerichteten Antikörpers nachfolgend im Westernblot auch ALK5 detektiert werden konnte. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass eine physische Interaktion beider Proteine vorhanden sein muss. Es ist denkbar, dass PAR2 und ALK5 einen Rezeptorkomplex bilden und PAR2 die Kinaseaktivität von ALK5, die Ligandenbindung oder die TGF- β 1-Rezeptor-Dichte an der Zelloberfläche kontrolliert. Eine weitere Theorie wäre, dass PAR2 in der Glykosylierung und dem anterograden Transport der TGF- β 1-Rezeptoren von den intrazellulären Speichern an die Zelloberfläche involviert ist. In dem Fall bedeutet dies, dass PAR2-siRNA die Expression von T β RII und/oder ALK5 an der Zelloberfläche reduzieren würde.

In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass PAR2 den anterograden Transport, die Glykosylierung, die Expression von Oberflächenproteinen und die Signalbildung von PAR4 fördert (Cunningham et al., 2012). Dieser Ablauf erfolgt nur durch eine physische Interaktion zwischen PAR2 und PAR4. Daher ist die Erkenntnis aus dieser Arbeit über die physische Interaktion von PAR2 und ALK5 von potentieller Bedeutung für die Erklärung des Wirkmechanismus'. In einer Arbeit mit HEK293T-Zellen von Rallabhandi und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass PAR2 auch mit TLR4 interagiert (Rallabhandi et al., 2008). Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass T β RII und ALK5 beide eine N-Glykosylierung aufweisen (Kim et al., 2012 und Wang et al., 2005) und dass eine N-Glykosylierung sowohl für eine Bindung von TGF- β 1 an T β RII als auch für die weitere Signaltransduktion notwendig ist (Kim et al., 2012).

Neue Ergebnisse aus der AG Ungefroren, die nach Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit gewonnen wurden, zeigen, dass PAR2 die ALK5-Proteinexpression stimuliert und somit die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber TGF- β 1 sicherstellt (Zeeh et al., 2016). Ob die Förderung der ALK5-Proteinexpression auf Ebene der mRNA, z. B. über eine gesteigerte Transkription, über einen verlangsamten Abbau oder auf Proteinebene durch eine Hemmung des ubiquitin-vermittelten Abbaus stattfindet, ist Gegenstand aktueller Forschung in der Arbeitsgruppe. Da die Veränderung der ALK5-Expression ein wichtiges Regulativ ist, über den die Tumorzellen ihre Sensitivität gegenüber TGF- β 1 modulieren können, sitzt PAR2 an einem zentralen Punkt der TGF- β 1 Signalkaskade. Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann PAR2 über die Förderung der ALK5-Expression onkogene Funktionen von TGF- β 1 durch eine vermehrte Phosphorylierung der Smad-Proteine verstärken. Dabei könnte zusätzlich auch noch ein anderer Mechanismus beteiligt sein, der über eine physische Interaktion zwischen PAR2 und ALK5 wirkt.

Eine Blockade der Interaktion zwischen ALK5 und PAR2 könnte einen neuen und innovativen Ansatz in der Therapie des duktales Pankreaskarzinoms darstellen, der darauf abzielt, die kanzerogenen Funktionen von TGF- β 1 zu limitieren.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. B. Rauch (Universität Greifswald) wurde gefunden, dass in primären glatten Muskelzellen der Aorta von PAR2 *knockout* Mäusen die TGF- β 1-induzierte Induktion von plasminogen activator-inhibitor type I (PAI-I) deutlich reduziert war. Mit diesem Versuch konnte auch gezeigt werden, dass die PAR2-ALK5 Interaktion wahrscheinlich auch *in vivo* und in nicht-transformierten Zellen von Bedeutung ist (Zeeh et al., 2016). Dieses Erkenntnis besitzt auch Relevanz für die Pathophysiologie von Erkrankungen anderer Gewebe, beispielsweise bei der Entwicklung von Gefäßthrombosen, fibroproliferativen Erkrankungen, Arteriosklerose und Fibrosen von Lunge, Leber sowie Niere.

Die Resultate dieser Arbeit bilden die Grundlage für weiterführende Studien. So wäre es von großem Interesse, zu überprüfen, wie sich eine PAR2 Depletion in den Tumorzellen auf die Tumorbildung *in vivo* auswirkt. Das könnte in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell für das Pankreaskarzinom untersucht werden. Zusätzlich könnten weitere Studien zur Interaktion von PAR2 und ALK5 in anderen Tumorentitäten, wie z.B. dem Mammakarzinom, oder der Pathophysiologie der Lungen-, Leber- und Nierenfibrose erfolgen.

6 Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) wird aufgrund unspezifischer Symptome meist erst spät und im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem es bereits metastasiert ist und deshalb eine extrem schlechte Prognose hat. In dieser Arbeit lag der Fokus der Untersuchungen auf der Analyse der Interaktion von TGF- β 1 und seines Typ I Rezeptors ALK5 einerseits sowie des G-Proteingekoppelten Rezeptors PAR2 andererseits. Durch eine Inhibition der Expression von PAR2 (und ALK5 als Kontrolle) mittels siRNA in PDAC-abgeleiteten Zelllinien und in Keratinozyten-Zelllinien konnte die TGF- β 1-induzierte C-terminale Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteine Smad2 und Smad3 unterbunden werden. In weiteren Versuchen wurde die Auswirkung einer zellulären PAR2 Depletion auf die durch Smad2/3 vermittelte Aktivierung der Transkription in Reportergenassays analysiert. Dabei konnte nach Transfektion von Reportergenplasmiden in Panc-1-Zellen eine deutlich verminderte Luziferaseaktivität als Zeichen einer verminderten Transkriptionsaktivität und folglich einer verminderten Bildung des Luziferaseproteins detektiert werden. In Versuchen zur TGF- β Regulation der Proliferation in Panc-1-Zellen zeigte sich nach Inkubation der Zellen mit TGF- β 1 eine deutliche Proliferationsinhibition, die nach einer siRNA-vermittelten Hemmung von PAR2 und ALK5 fast komplett aufgehoben war, was auf die bedeutende Funktion von PAR2 und ALK5 bei der Vermittlung des Proliferationsarrestes hinweist. Der Nachweis einer direkten physischen Interaktion von PAR2 und ALK5 konnte nach ektopter Überexpression von PAR2-myc-DKK und ALK5-HA Fusionsproteinen durch Co-Immunpräzipitation aus Panc-1 Zellen und dem anschließenden Nachweis von ALK5 im Western Blot erbracht werden. Allerdings ist die physiologische Relevanz der PAR2-ALK5 Interaktion gegenwärtig noch unklar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für ein neues, innovatives und biologisch orientiertes Therapiekonzept für das metastasierte PDAC.

7 Literaturverzeichnis

Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, Hooper JD: Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*, 130:248–282 (2011)

Akhurst RJ, Derynck R: TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 11: S44-51 (2001)

Arizmendi NG, Abel M, Mihara K, Davidson C, Polley D, Nadeem A, El Mays T, Gilmore BF, Walker B, Gordon JR, et al: Mucosal allergic sensitization to cockroach allergens is dependent on proteinase activity and proteinase-activated receptor-2 activation. *J Immunol*, 186:3164–3172 (2011)

Attisano L und Wrana JL: Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. ;296(5573):1646-7 (2002)

Bachelier P, Nakano H, Oussoultzoglou PD, Weber JC, Boudjema K, Wolf PD, Jaeck D: Is pancreaticoduodenectomy with mesentericoportal venous resection safe and worthwhile? *Am J Surg*; 182: 120–9 (2001)

Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL: Phosphatidylinositol-3 kinase function is required for TGFbeta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275: 36803–36810 (2000)

Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D und DePinho RA: Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*, 20:3130-3146 (2006)

Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J and Garcia De Herreros A.: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89 (2000)

Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z: Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer*. Sep;47(13):1928-37 (2011)

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL: Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27–36 (2001)

Bierie B and Moses HL: Tumour microenvironment: TGFs: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 506-520 (2006)

Bockaert J, Pin JP: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18:1723–1729 (1999)

Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnnett NW: Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* ; 314 (Pt 3):1009-1016 (1996)

- Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M and Cano A.: The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transition: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 116, 499–511 (2003)
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.*;106(3):761-71. (1988)
- Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W, Baghurst P, Moerman CJ, Simard A, Miller AB, Przewoniak K, McMichael AJ, Hsieh CC, Walker AM: Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer:* 67(1): 63-71 (1996)
- Bozzetti F, Arends J, Lundholm K et al. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: non-surgical oncology. *Clin Nutr;* 28: 445–454. (2009)
- Burch ML, Ballinger ML, Yang SN, Getachew R, Itman C, Loveland K, Osman N, Little PJ. Thrombin stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by protease-activated receptor-1 transactivation of the transforming growth factor beta type I receptor. *J Biol Chem.*; 285:26798-26805 (2010)
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry.* 112(2):195–203 (1981)
- Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst;* 94: 1365-1372 (2002)
- Camenisch TD, Molin DG, Person A, Runyan RB, Gittenberger-De Groot AC, McDonald JA, Klewer SE: Temporal and distinct TGF-beta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Dev Biol* 248: 170–181 (2002)
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM: Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology.*; 134:95–101 (2008)
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK: Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 17: 8319-8326 (2006)
- Chung H, Ramachandran R, Hollenberg MD, Muruve DA. Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-β receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis. *J Biol Chem.* 288(52):37319-31. (2013)
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.: Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine;* 364: 1817–25 (2011)
- Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ: TGFβ1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86: 531–542 (1996)

- Cunningham MR, McIntosh KA, Pediani JD, Robben J, Cooke AE, Nilsson M, Gould GW, Mundell S, Milligan G, Plevin R. Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *J Biol Chem*; 287:16656-16669 (2012)
- De Caestecker MP, Piek E, Roberts AB: Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 17: 1388-1402 (2000)
- de Jong K, Nio CY, Hermans JJ, Dijkgraaf MG, Gouma DJ, van Eijck CH, van Heel E, Klass G, Fockens P, Bruno MJ: High prevalence of pancreatic cysts detected by screening magnetic resonance imaging examinations. *Clin Gastroenterol Hepatol.*; 8:806-11 (2010)
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM: Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17:3091-3100 (1998)
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2: 117-129 (2001)
- Diener MK, Fitzmaurice C, Schwarzer G, Seiler CM, Antes G, Knaebel HP, Büchler MW: Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* (2011)
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrusis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L.: MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFb-regulatedMAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86, 543-552 (1996)
- Facchini LM und Penn LZ: The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 12, 633-651 (1998)
- Gallihier AJ and Schiemann WP: Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8: R42 (2006)
- Gartel AL, Radhakrishnan SK: Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.*;15;65(10):3980-5 (2005)
- Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K.: Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem*; 279:55419-55424 (2004)
- Ghadirian P, Liu G, Gallinger S, Schmocker B, Paradis AJ, Lal G, Brunet JS, Foulkes WD, Narod SA: Risk of pancreatic cancer among individuals with a family history of cancer of the pancreas. *Int J Cancer.* 20;97(6):807-10 (2002)
- Ghosh R, Gilda JE und Gomes AV: The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics.* 11(5): 549-560 (2014)

Giardiello FM, Offerhaus GJ, Lee DH, Krush AJ, Tersmette AC, Booker SV, Kelley NC, Hamilton SR. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut*; 34: 1394-1396 (1993)

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*; 119: 1447-1453 (2000)

Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R.: Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communication and Signaling* (2013)

Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH und Kern SE: Genetic alterations of the transforming growth factor b receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas *Cancer Res.* 58, 5329–5332 (1998)

Gold LI: The role for transforming growth factorb (TGF-b) in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 10, 303–360 (1999)

Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JK, Markowitz S: Mutational inactivation of transforming growth factor b receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 59, 320–324 (1999)

Grandaliano G, Pontrelli P, Cerullo G, Monno R, Ranieri E, Ursi M, Loverre A, Gesualdo L, Schena FP: Protease-activated receptor-2 expression in IgA nephropathy: a potential role in the pathogenesis of interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.*: 14(8):2072-83 (2003)

Hammel P, Huguet F, Van Laethem JL, et al.: Comparison of chemoradiotherapy (CRT) and chemotherapy (CT) in patients with a locally advanced pancreatic cancer (LAPC) controlled after 4 months of gemcitabine with or without erlotinib: Final results of the international phase III LAP 07 study. *ASCO Meeting Abstracts* (2013)

Harms V: *Medizinische Statistik.* 8. Aufl., Harms-Verlag, Lindhöft/Kempten (2012)

Hay ED: An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 154: 8–20 (1995)

Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV: Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood*; 103:3029-3037 (2004)

Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB: Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer.*;47(3):323-8 (1991)

Howell DC, Johns RH, Lasky JA, Shan B, Scotton CJ, Laurent GJ, Chambers RC: Absence of proteinase-activated receptor-1 signaling affords protection from bleomycin-induced lung inflammation and fibrosis. *Am J Pathol*, 166:1353–1365 (2005)

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.*; 6:2969–72 (2000)

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S.: An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol.*; 28:977–87 (2004)

Hruban RH, Klimstra DS, Pitman MB: Tumors of the pancreas. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; (2006)

Hruban RH, Maitra A, Goggins M.: Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol.*; 1:306–16 (2008)

Huse M, Chen YG, Massagué J und Kuriyan J: Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425–436 (1999)

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M : Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer.*;92(11):2076-83 (2005)

Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL: Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev*,20:3147-3160 (2006)

Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M.: Expression of proteinaseactivated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol.*: 22:295-300 (2003)

Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Takahashi M, Ogawa M. Signal of proteinaseactivated receptor-2 contributes to highly malignant potential of human pancreatic cancer by up-regulation of interleukin-8 release. *Int J Oncol.*; 28:939-946 (2006)

Ikushima H und Miyazono K.: TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 10:415-424 (2010)

Ito H, Gardner-Thorpe, Zinner, MJ, Ashley SW and Whang EE: Inhibition of tyrosine kinase Src suppresses pancreatic cancer invasiveness. *Surgery* 134: 221-226 (2003)

Iwaki K, Shibata K, Ohta M, Endo Y, Uchida H, Tominaga M, Okunaga R, Kai S, Kitano S: A small interfering RNA targeting proteinase-activated receptor-2 is effective in suppression of tumour growth in a Panc1 xenograft model. *Int J Cancer*: 122:658-663 (2008)

Jaber M, Maoz M, Kancharla A, Agranovich D, Peretz T, Grisaru-Granovsky S, Uziely B, Bar-Shavit R: Protease-activated-receptor-2 affects protease-activated-receptor-1-driven breast cancer. *Cell Mol Life Sci*; 71:2517-2533 (2014)

Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S: Ras and TGF-beta cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156: 299–313 (2002)

Jemal A Simard EP, Xu J, Ma J, Anderson RN: Selected cancers with increasing mortality rates by educational attainment in 26 states in the United States, 1993-2007. *Cancer Causes Control.*; 24:559-565 (2013)

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signalling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*: 321:1801-1806 (2008)

Kaiser MH, Ellenberg SS: Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg*; 120: 899–903. (1985)

Kang Y: Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the Smad pathway. *J Cell Biochem* 6: 1380-1390 (2006)

Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*; 302: 1790-1795 (2009)

Jacobs EJ, Chanock SJ, Fuchs CS, Lacroix A, McWilliams RR, Steplowski E, Stolzenberg-Solomon RZ, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB, Gross M, Helzlsouer K, Petersen G, Zheng W, Agalliu I, Allen NE, Amundadottir L, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Canzian F, Clipp S, Dorransoro M, Gaziano JM, Giovannucci EL, Hankinson SE, Hartge P, Hoover RN, Hunter DJ, Jacobs KB, Jenab M, Kraft P, Kooperberg C, Lynch SM, Sund M, Mendelsohn JB, Mouw T, Newton CC, Overvad K, Palli D, Peeters PH, Rajkovic A, Shu XO, Thomas G, Tobias GS, Trichopoulos D, Virtamo J, Wactawski-Wende J, Wolpin BM, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A: Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Int J Cancer.*;127(6):1421-8 (2010)

Kaufmann R, Oettel C, Horn A, Halbhuber KJ, Eitner A, Krieg R, Katenkamp K, Henklein P, Westermann M, Böhmer FD, Ramachandran R, Saifeddine M, Hollenberg MD, Settmacher U: Met receptor tyrosine kinase transactivation is involved in proteinase-activated receptor-2-mediated hepatocellular carcinoma cell invasion. *Carcinogenesis.*: 30(9):1487-96 (2009)

Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F: Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol*, 153: S230–S240 (2008)

Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, Gurusurthy S, Berger J, Alencar H, Depinho RA, Mahmood U, Weissleder R: Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS Med.* (2008)

Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD, Sommerhoff CP, McLean JS, Ferrell WR: Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*: 316:1017–1024 (2006)

Kim TK und Eberwine JH: Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 397(8): 3173–3178 (2010)

- Kim YW, Park J, Lee HJ, Lee SY, Kim SJ. TGF- β sensitivity is determined by N-linked glycosylation of the type II TGF- β receptor. *Biochem J*; 445:403-411 (2012)
- Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Griffin C, Cameron JL, Yeo CJ, Kern S, Hruban RH. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res*; 64: 2634-2638 (2004)
- Knight V, Tchongue J, Lourensz D, Tipping P, Sievert W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology*; 55:879-887 (2012)
- Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH: Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)* 1: 716-729 (2011)
- Kretschmer A, Moepert K, Dames S, Sternberger M, Kaufmann J, Klippel A. Differential regulation of TGF-beta signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene*; 22:6748-6763 (2003)
- Laffan TA, Horton KM, Klein AP, Berlanstein B, Siegelman SS, Kawamoto S, Johnson PT, Fishman EK, Hruban RH: Prevalence of unsuspected pancreatic cysts on MDCT. *Am J Radiol.*; 191:802–07 (2008)
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G: Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.*;15(5):741-7 (1975)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*;193(1):265-75 (1951)
- Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF, Brand R. Pancreatic cancer and the FAMMM syndrome. *Fam Cancer*; 7: 103-112 (2008)
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R: Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*: 53:245–282 (2001)
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. ;268(5215):1336-8 (1995)
- Massagué J: TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Bio-chem.* 67, 753–791 (1998).
- Massagué J, Blain SW und Lo RS: TGF-beta Signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295–309 (2000)
- Massagué J und Wotton D: Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745–1754 (2000)
- Massagué J, Seoane J, Wotton D: Smad transcription factors. *Genes Dev* 23: 2783-2810 (2005)
- Massucco P, Ribero D, Sgotto E, Mellano A, Muratore A, Capussotti L: Prognostic significance of lymph node metastases in pancreatic head cancer treated with extended lymphadenectomy: not just a matter of numbers. *Ann Surg Oncol*; 16: 3323–32 (2009)

Masters SC: Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol.* ;261:337-50 (2004)

Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, Yeo CJ, Kalloo A, Hruban R, Goggins M.: DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res.*; 66:1208–1 (2006)

Matsubayashi H, Takaori K, Morizane C, Maguchi H, Mizuma M, Takahashi H, Wada K, Hosoi H, Yachida S, Suzuki M, Usui R, Furukawa T, Furuse J, Sato T, Ueno M, Kiyozumi Y, Hijioka S, Mizuno N, Terashima T, Mizumoto M, Kodama Y, Torishima M, Kawaguchi T, Ashida R, Kitano M, Hanada K, Furukawa M, Kawabe K, Majima Y, Shimosegawa T. Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues. *World J Gastroenterol*; 23(6): 935-948 (2017)

Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR und Derynck R: TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127: 2021–2036 (1994)

Miyazono K, Ehata S, Koinuma D. Tumour-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci.*; 117:143-152 (2012)

Mokdad AA, Minter RM, Zhu H, Augustine MM, Porembka MR, Wang SC, Yopp AC, Mansour JC, Choti MA, Polanco PM: Neoadjuvant Therapy Followed by Resection Versus Upfront Resection for Resectable Pancreatic Cancer: A Propensity Score Matched Analysis. *J Clin Oncol.* (2016)

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: 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: 1960–6 (2007)

Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signalling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.*: 66:307-314 (2006)

Moss AC, Morris E, Mac Mathuna P. Palliative biliary stents for obstructing pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* (2006)

Moussa L, Apostolopoulos J, Davenport P, Tchongue J, Tipping PG: Protease-activated receptor-2 augments experimental crescentic glomerulonephritis *Am J Pathol.*: 171(3):800-8 (2007)

Mu Y, Gudey SK, Landstrom M: Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347: 11–20 (2012)

Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*; 62: 3789-3793 (2002)

Nagaraj NS und Datta PK: Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 1: 77-91 (2010)

Nakano Y, Tanno S, Koizumi K, Nishikawa T, Nakamura K, Minoguchi M, Izawa T, Mizukami Y, Okumura T, Kohgo Y: Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer.*;96(3):457-63. (2007)

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*; 350: 1200–10 (2004)

Nichols HL, Saifeddine M, Theriot BS, Hegde A, Polley D, El-Mays T, Vliagoftis H, Hollenberg MD, Wilson EH, Walker JK, Defea KA: β -Arrestin-2 mediates the proinflammatory effects of proteinase-activated receptor-2 in the airway. *Proc Natl Acad Sci*, 109:16660–16665 (2012)

Niederlander C, Walsh JJ, Episkopou V und Jones CM: Arkadia enhances nodal-related signalling to induce mesendoderm. *Nature* 410: 830–834 (2001)

Nishimura S, Ishikura H, Matsunami M, Shinozaki Y, Sekiguchi F, Naruse M, Kitamura T, Akashi R, Matsumura K, Kawabata A: The proteinase/ proteinase-activated receptor-2/transient receptor potential vanilloid-1 cascade impacts pancreatic pain in mice. *Life Sci*: 87:643–650 (2010)

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*; 297: 267– 277 (2007)

Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, Sinn M, Hinke A, Riess H: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*; 310: 1473–81 (2013)

Oft M, Heider KH und Beug H: TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr. Biol.* 8, 1243–1252 (1998)

Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Andrade-Gordon P, Cottrell GS, Bunnett NW, Diamandis EP, Hollenberg MD: Proteinaseactivated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem*: 281:32095–32112 (2006)

Oikonomopoulou K, Hansen K, Saifeddine M, Vergnolle N, Tea I, Diamandis E, Hollenberg M: Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. *Biol Chem*: 387:677–685 (2006)

Ouaissi M, Hubert C, Verhelst R, Astarci P, Sempoux C, Jouret-Mourin A, Loundou A, Gigot JF: Vascular reconstruction during pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas improves resectability but does not achieve cure. *World J Surg*; 34: 2648–61 (2010)

Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y und Wrana JL: Regulation of the polarity protein Par6 by TGFb receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307: 1603–1609 (2005)

- Padua D und Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.*; 19:89-102 (2009)
- Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST: Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology.*;134(4):981-7 (2008)
- Patterson, G.I., and Padgett, R.W. TGF-beta-related pathways-Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet.* 16, 27–33 (2000)
- Pelzer U, Arnold D, Gövercin M, Stieler J, Doerken B, Riess H, Oettle H: Parenteral nutrition support for patients with pancreatic cancer. Results of a phase II study. *BMC Cancer* (2010)
- Phizicky EM und Fields S: Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 59(1):94-123 (1995)
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, Ten Dijke P: TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112 (Part 24): 4557–4568 (1999)
- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, Johnson GT: Signaling Mechanisms. In: *Cell Biology - Das Original mit Übersetzungshilfen.* 2. Aufl., 7. Kap., 425 - 512, Springer-Spektrum, Berlin/Heidelberg (2008)
- Rallabhandi P, Nhu QM, Toshchakov VY, Piao W, Medvedev AE, Hollenberg MD, Fasano A, Vogel SN: Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: a novel paradigm for receptor cooperativity. *J Biol Chem*; 283:24314-24325 (2008)
- Ramachandran R, Mihara K, Chung H, Renaux B, Lau CS, Muruve DA, DeFea KA, Bouvier M, Hollenberg MD: Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem*, 286:24638–24648 (2011)
- Ramachandran R, Noorbakhsh F, DeFea K, Hollenberg MD: Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 11:69–86 (2012)
- Reiss M: Transforming growth factor-beta and cancer: a love-hate relationship? *Oncol. Res.* 9, 447–457 (1997)
- Rickles FR und Edwards RL: Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood.*;62(1):14-31 (1983)
- Riediger H, Keck T, Wellner U, zur Hausen A, Adam U, Hopt UT, Makowiec F: The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*; 13: 1337–44 (2009)
- Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): *Krebs in Deutschland 2011/2012.* 10. Ausgabe. (2015)
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci* 78: 5339–5343 (1981)

- Romano LA und Runyan RB: Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 223: 91–102 (2000)
- Russell FA und McDougall JJ: Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflamm Res*: 58:119–126 (2009)
- Russell FA, Schuelert N, Veldhoen VE, Hollenberg MD, McDougall JJ: Proteinase-activated receptor-2 (PAR(2)) activation sensitises primary afferents and causes leukocyte rolling and adherence in the rat knee joint. *Br J Pharmacol*: 167:1665–1678 (2012)
- Saito A, Osuga Y, Yoshino O, Takamura M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Harada M, Takemura Y, Yano T, Taketani Y: TGF- β 1 induces proteinase-activated receptor 2 (PAR2) expression in endometriotic stromal cells and stimulates PAR2 activation-induced secretion of IL-6. *Hum Reprod.*: 26:1892-1898 (2011)
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-De Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T: TGF-beta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124: 2659–2670 (1997)
- Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: *Kompendium Internistische Onkologie*, Springer Verlag (2006)
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM: Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*; 128:1606-1625 (2005)
- Schniewind B, Groth S, Sebens Muerköster S, Sipos B, Schäfer H, Kalthoff H, Fändrich F, Ungferoren H.: Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumour suppressive and prometastatic function. *Oncogene*: 26:4850-4862 (2007)
- Schöwe R und Knapp J: *Mathematik-Wirtschaft, Allgemeine Hochschulreife, Erweiterte Ausgabe*. Cornelsen Verlag, 1. Auflage, 465-473, Berlin (2010)
- Seufferlein T, Porzner M, Heinemann V, Tannapfel A, Stuschke M, Uhl W: Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int.*;111(22):396-402 (2014)
- Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P: Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* vii33-40 (2012)
- Sherr CJ und Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512 (1999)
- Shi K, Queiroz KC, Roelofs JJ, van Noesel CJ, Richel DJ, Spek CA. Protease-activated receptor 2 suppresses lymphangiogenesis and subsequent lymph node metastasis in a murine pancreatic cancer model. *J Pathol.*: 234:398-409 (2014)
- Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM: Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res.*;2(7):395-402 (2004)

- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J und Pavletich NP: Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585–594 (1998)
- Shi Y und Massagué J: Mechanisms of TGF-Signaling, Review from Cell Membrane to the Nucleus, *Cell*, Vol. 113, 685–700 (2003)
- Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue M, Kimura K, Yamashita Y, Yamada N, Nishihara T, Ohira M, Hirakawa K: A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol.*; 24:1401-1406 (2004)
- Siomi MC: Short interfering RNA-mediated gene silencing; towards successful application in human patients. *Adv Drug Deliv Rev.*: 25;61(9):668-71 (2009)
- Skoulidis F, Cassidy LD, Pisupati V, Jonasson JG, Bjarnason H, Eyfjord JE, Karreth FA, Lim M, Barber LM, Clatworthy SA, Davies SE, Olive KP, Tuveson DA, Venkitaraman AR. Germline Brca2 heterozygosity promotes Kras(G12D) -driven carcinogenesis in a murine model of familial pancreatic cancer. *Cancer Cell*;18: 499-509 (2010)
- Slidell MB, Chang DC, Cameron JL, Wolfgang C, Herman JM, Schulick RD, Choti MA, Pawlik TM: Impact of total lymph node count and lymph node ratio on staging and survival after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma: a large, populationbased analysis. *Ann Surg Oncol*; 15: 165–74 (2008)
- Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol*; 160:191-203 (2010)
- Sporn MB und Roberts AB: TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul*: 875-82 (1990)
- Sporn MB und Roberts AB: The transforming growth factor-betas: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.*: 593:1-6 (1990)
- Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D: Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.*;93(12):937-41 (2001)
- Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q und Luo K: Negative feedback regulation of TGF-b signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286: 771–774 (1999)
- Su S, Li Y, Luo Y, Sheng Y, Su Y, Padia RN, Pan ZK, Dong Z, Huang S: Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration. *Oncogene*: 28(34):3047-57 (2009)
- Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P: Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 25: 2607–15 (2007)
- Sumi A, Yamanaka-Hanada N, Bai F, Makino T, Mizukami H, Ono T: Roles of coagulation pathway and factor Xa in the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Biol Pharm Bull.*: 34(6):824-30 (2011)

Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, Hay ED: TGF-beta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* 125: 95–105 (1998)

Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K und Saji S: Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer*; 78(9): 1152–1155 (1998)

Tang B, Bottinger EP, Jakowlew SB, Bagnall KM, Mariano J, Anver MR, Letterio JJ und Wakefield, LM: Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat. Med.* 4, 802–807 (1998)

Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S: Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191: 1-16 (2002)

Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454 (2002)

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2: 87-108 (2015)

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 76(9):4350–4354 (1979)

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL: SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 6: 779-791 (1998)

Uchida K, Nagatake M, Osada H, Yatabe Y, Kondo M, Mitsudomi T, Masuda A, Takahashi T und Takahashi T: Somatic in vivo alterations of the JV18–1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56, 5583–5585 (1996)

Ungefroren H, Groth S, Sebens S, Lehnert H, Gieseler F, Fändrich F.: Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF-b1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1. *Molecular Cancer* (2011)

Vasen HF, Gruis NA, Frants RR, van Der Velden PA, Hille ET, Bergman W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer*; 87: 809-811 (2000)

Valle JW, Palmer D, Jackson R, Cox T, Neoptolemos JP, Ghaneh P, Rawcliffe CL, Bassi C, Stocken DD, Cunningham D, O'Reilly D, Goldstein D, Robinson BA, Karapetis C, Scarfe A, Lacaine F, Sand J, Izbicki JR, Mayerle J, Dervenis C, Oláh A, Butturini G, Lind PA, Middleton MR, Anthony A, Sumpter K, Carter R, Büchler MW: Optimal duration and timing of adjuvant chemotherapy after definitive surgery for ductal adenocarcinoma of the pancreas: Ongoing lessons from the ESPAC-3 study. *J Clin Oncol*: 32: 504–12 (2014)

Verbeke CS: Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer are we there yet? *Histopathology*; 52: 787–96 (2008)

Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Ellies LG, Andrade-Gordon P, Mueller BM, Ruf W: Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice, *Cancer Res.*, 68(17):7219-27. (2008)

Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, de Villalonga P, Agell N, Lluís F, Bachs O und Capella G: Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17, 1969–1978 (1998)

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M: Pancreatic cancer. *Lancet* 9791: 607-620 (2011)

Wagner M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW, Korc M: Enhanced expression of the type II transforming growth factor-beta receptor is associated with decreased survival in human pancreatic cancer. *Pancreas*: 19:370-376 (1999)

Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW: Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*; 91: 586–94 (2004)

Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Nakano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Ihara S, Lee SH, Ikeda Y, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, Kondo A, Shapiro SD, Lopez-Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, Taniguchi N: Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102:15791-15796 (2005)

Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2013)

Whitcomb DC, Applebaum S, Martin SP. Hereditary pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*; 880: 201-209 (1999)

Wrana JL: Signaling by the TGF-b Superfamily, Cold Spring Harb Perspect Biol (2013)

Wygrecka M, Kwapiszewska G, Jablonska E, von Gerlach S, Henneke I, Zakrzewicz D, Guenther A, Preissner KT, Markart P: Role of protease-activated receptor-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*: 183(12):1703-14 (2011)

Yagi Y, Otani H, Ando S, Oshiro A, Kawai K, Nishikawa H, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C: Involvement of Rho signaling in PAR2-mediated regulation of neutrophil adhesion to lung epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 536:19–27 (2006)

Yezhelyev MV, Koehl G, Guba M, Brabletz T, Jauch KW, Ryan A, Barge A, Green T, Fennell M and Bruns CJ: Inhibition of SRC tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 10: 8028-8036 (2004)

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR und Guise TA: TGFbeta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* 103, 197–206 (1999)

Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F und Ehlers MD: TGF-b signaling specifies axons during brain development. *Cell* 142: 144–157 (2010)

Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E, Böttinger EP: Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6686–6691 (2001)

Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N and Bottinger EP: Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-mesenchymal transition. EMBO J 23(5), 1155–1165 (2004)

Zavadil J und Böttinger EP: TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. Oncogene: 24(37):5764-74 (2005)

Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE: Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. Mol Cell: 1:611-617 (1998)

Zeeh F, Witte D, Gädeken T, Rauch B, Grage-Griebenow E, Leinung N, Fromm SJ, Stölting S, Mihara K, Kaufmann R, Settmacher U, Lehnert H, Hollenberg MD und Ungefroren H: Proteinase-activated receptor 2 promotes TGF- β -dependent cell motility in pancreatic cancer cells by sustaining expression of the TGF- β type I receptor ALK5. Oncotarget, Vol. 7, No. 27 (2016)

Zhang W, Gao J, Zhao T, Wei L, Wu W, Bai Y, Zou D, Li Z: Proteinaseactivated receptor 2 mediates thermal hyperalgesia and is upregulated in a rat model of chronic pancreatitis. Pancreas, 40:300–307 (2011)

Internetaufrufe:

Austin Community College Distict:

<http://www.austincc.edu/mlt/mdfund/pictures/GelElectrophoresis.jpg> (letzter Zugriff am 02.10.2016)

Deutsche Krebsgesellschaft:

<https://www.krebsgesellschaft.de/> (letzter Zugriff am 26.12.2016)

Kompetenznetz Leukämie:

http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/scores/performance_status/ (letzter Zugriff 15.12.2016)

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 2013, AW MF Registernummer: 032-0100L, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (letzter Zugriff am 01.10.2016)

Miltenyibiotec:

<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0002500/IM0002517.ashx> (letzter Zugriff am 25.05.2016)

PathologyOutlines.com:

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0140673610623070-gr2.jpg> (letzter Zugriff: 18.03.2018)

Spektrum.de:

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/transfektion/67229> (letzter Zugriff: 27.11.16)

Universitätsklinikum Ulm, Comprehensive Cancer center Ulm (CCCU):

<http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/pankreaskarzinom.html> (letzter Zugriff am 05.01.2016)

Universidad de Guadalajara (UdG), Mexiko, Cell Biology and Biochemistry:

<http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Forschung/GelSandwich.gif> (letzter Zugriff: 17.05.2015)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Text	Seite
Abb. 1	(a) Darstellung der geschätzten Anzahl an Krebsneuerkrankungen im Jahr 2012 weltweit mit Aufteilung nach Geschlecht und Häufigkeit (exklusive nicht-melanomatöse Hauttumore) (b) Darstellung der geschätzten krebsbedingten Todesfälle im Jahr 2012 weltweit aufgeteilt nach Geschlecht und Häufigkeit, exklusive nicht- melanomatöse Hauttumore	1-2
Abb. 2	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) und genetische Veränderungen	8
Abb. 3	Karnofsky-Index	14
Abb. 4	Eastern Co-operative Oncology Group (ECOG)-Status	15
Abb. 5	Studienvergleiche der Kombinationschemotherapie in der Palliativsituation im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie	16
Abb. 6	Signalweg des TGF- β - Rezeptors über Smad-Proteine	20
Abb. 7	Der alternative (nicht Smad-abhängige) Signalweg über den TGF- β -Rezeptor	22
Abb. 8	Aufbau 96-Loch-Platte zur Proteinbestimmung	45
Abb. 9	<i>Beladung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Proteinproben</i>	46
Abb. 10	<i>Versuchsordnung der Bestandteile beim Westernblotting</i>	48
Abb. 11	<i>Mechanismus der Co-Immünpräzipitation durch Antikörper mit Microbeads von MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach</i>	54
Abb. 12	Panc-1-Zelllinie: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF- β 1 für 1 Stunde erfolgte die Bestimmung der C-terminalen Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 im Western Blot	60
Abb. 13	HaCaT-Zelllinie: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF- β 1 für 1 Stunde erfolgte die Bestimmung der C-terminalen Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 im Western Blot	61
Abb. 14	Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Panc-1 Zellen mit p6SBE-luc/pRL-TK-luc und den aufgeführten siRNAs mit nachfolgender TGF- β 1-Inkubation für 24 Stunden	63
Abb. 15	Luziferase-Aktivität nach Transfektion von Panc-1 Zellen mit p(CAGA) ₁₂ -luc/pRL-TK-luc und den aufgeführten siRNAs mit nachfolgender TGF- β 1-Inkubation für 24 Stunden	64

Abbildungsverzeichnis

Abb. 16	<i>Zelllinie Panc-1: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF-β1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedes XS (Roche)</i>	66
Abb. 17	Zelllinie HaCaT: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF- β 1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedes XS (Roche)	67
Abb. 18	Zelllinie HMEEC: Nach Transfektion und Inkubation der Hälfte der Zellen mit TGF- β 1 für 24 Stunden erfolgte die Zellzählung mit dem Zellzählgerät Cedes XS (Roche)	69
Abb. 19	(a) Westernblot der Zelllysate ohne Co-Immunpräzipitation: Der linke Westernblot wurde mit dem Primärantikörper anti-myc und der rechte mit anti-ALK5 inkubiert. (b) oben: Darstellung eines Westernblots mit ALK5 (Primärantikörper: anti-ALK5) nach vorheriger Co-Immunpräzipitation von ekto exprimiertem PAR2 Protein mittels anti-Myc-Antikörper unten: Darstellung eines Westernblots mit dem „tag“-Protein	72

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei dem damaligen Direktor der medizinischen Klinik I und dem aktuellen Präsidenten der Universität zu Lübeck Herrn Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert sowie dem aktuellen kommissarischen Direktor der medizinischen Klinik I Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Steinhoff für die Möglichkeit der Durchführung einer Dissertation in seiner Klinik danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Ungefroren möchte ich für die Überlassung des Themas, der Bereitstellung der Verbrauchsmaterialien, seiner hochkompetenten Beratungsfunktion und zeitnahen Beantwortung sämtlicher Fragen in besonderem Maß danken. Er hatte stets ein offenes Ohr sowie die Geduld für aktuelle Problembehandlungen während der Arbeit und war immer bemüht, eine schnelle und individuelle Hilfestellung bereitzustellen.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei den medizinisch technischen Assistenten Sylvia Grammerstorf, Monika Vollmert und Heike Albrecht für Ihre liebevolle Unterstützung und erfahrenen Hilfestellungen in der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung danken. Nur durch ihre technische Einweisung und erfahrenen Tipps zur Optimierung der Versuchsdurchführung kam es zu einem Gelingen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur während der Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation, sondern auch bereits während meines Studiums in unendlichem Maße unterstützten. Erst durch ihre liebevolle und emotionale Unterstützung konnte es zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit kommen.

Ein weiterer Dank gilt auch meinen Geschwistern Katharina und Henning Gädeken sowie seinem Lebensgefährten Andy Herrmann für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit und der emotionalen Unterstützung.

LEBENS LAUF



■ Persönliche Daten

Name: Thomas Gädeken
Geburtstag: 03.04.1984 in Wilhelmshaven

■ Schulbildung

1991 – 1995 Besuch der Grundschule Neuenburg
1995 – 1997 Besuch der Orientierungsstufe Zetel
1997 – 2001 Besuch der Realschule Zetel
2001 – 2004 Besuch des Wirtschaftsgymnasiums Wilhelmshaven

■ Ausbildung

28.02.2012-31.01.2013 Praktisches Jahr
1. Terial: Anästhesiologie UKSH Lübeck
2. Terial: Innere Medizin UKSH Lübeck
3. Terial: Chirurgie UKSH Lübeck

2004-2013 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Studienabschluss mit dem 2. Staatsexamen am 21.11. 2013

■ beruflicher Werdegang

2014 - 2015 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für innere Medizin, Klinikum und Herzzentrum Oldenburg gGmbH, Klinik für Kardiologie, Direktor: Prof. Dr. med. Elsässer

2015 - 2016 Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Kardiologie, Direktor: Prof. Dr. med. Bauersachs

Seit 2016 bis heute Ärztehaus Zetel, hausärztliche Gemeinschaftspraxis

■ Zeitraum der Dissertation

2009- 2013 Durchführung des praktischen Teils der Dissertation in der medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Abteilung experimentelle Onkologie, Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Ungefroren

■ Publikationen:

2016:

Zeeh F, Witte D, Gädeken T, Rauch B, Grage-Griebenow E, Leinung N, Fromm SJ, Stölting S, Mihara K, Kaufmann R, Settmacher U, Lehnert H, Hollenberg MD und Ungefroren H: Proteinase-activated receptor 2 promotes TGF- β -dependent cell motility in pancreatic cancer cells by sustaining expression of the TGF- β type I receptor ALK5. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 27 (2016)

Witte D, Zeeh F, Gädeken T, Gieseler F, Rauch BH, Settmacher U, Kaufmann R, Lehnert H, Ungefroren H: Proteinase-Activated Receptor 2 Is a Novel Regulator of TGF- β Signaling in Pancreatic Cancer, *J Clin Med.*; 5(12): 111 (2016)

2017:

Ungefroren H, Witte D, Fiedler C, Gädeken T, Kaufmann R, Lehnert H, Gieseler F, Rauch B: The Role of PAR2 in TGF- β 1-Induced ERK Activation and Cell Motility, *Int J Mol Sci.*; 18(12): 2776 (2017)

■ Posterpräsentationen

2011:

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie, 2011, Basel (Schweiz):

Titel: Die Expression von PAR-2 ist erforderlich für TGF-b1-induzierte Zellmigration in duktaalen Pankreasadenokarzinomzellen

2012:

Doktorandentag der Universität zu Lübeck, 2012:

Titel: Ein tödliches PAR der Metastasierung