

**Die Rolle von TGF- $\beta$  bei der Regulation des Biglykan-  
Gens und bei der Tumorprogression des  
Pankreaskarzinoms**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel



vorgelegt von

Dipl.-Biol. Stephanie Groth

Kiel

2007

Referent:.....

Korreferent:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt: Kiel,.....

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
--	------------

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XII</b>
------------------------------	------------

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
----------------------	----------

1.1 Transforming-Growth-Factor (TGF)- $\beta$ 1	1
1.2 Rezeptoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie und Signaltransduktion	1
1.3 Smad-Proteine	2
1.4 Weitere Signalwege, die durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden	4
1.5 Fehlregulation des TGF- $\beta$ -Systems und assoziierte Pathophysiologie beim Menschen	4
1.5.1 TGF- $\beta$ und Krebs	4
1.5.2 Duktales Pankreaskarzinom	5
1.6 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)	6
1.6.1 Biglykan	6
1.6.2 Induktion der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1: Stand der Forschung	7
1.6.3 Rac1	9
1.6.4 NAD(P)H (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidase	10
1.7: Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Tumorprogression	12
1.7.1 TGF- $\beta$ 1 als Tumorsuppressor	12
1.7.2 TGF- $\beta$ 1 als Tumorpromotor	12
1.7.3 EMT	14
1.7.4 Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf die Tumorumgebung	14
1.7.5 Intrazelluläre Signalwege der tumorsupprimierenden und -fördernden Effekte von TGF- $\beta$ 1	15
1.7.6 Verwendete Mutanten der ALK5-Kinase	15
1.7.7 Ziele	16

---

---

<b>2. MATERIAL</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Sonstige	19
2.4 Chemikalien	19
2.5 Kits	20
2.6 Standards	20
2.7 Antikörper	21
2.8 Enzyme	21
2.9 Vektoren	22
2.9.1 Rekombinante Plasmide	22
2.10 Oligonukleotide	22
2.11 Zellmaterial	24
2.11.1 Zelllinien	24
2.11.2 Stabil transduzierte Zellen	24
2.11.3 Bakterienstamm	24
2.12 Medien	25
2.12.1 Medium zur Anzucht von prokaryotischen Zellen	25
2.12.2 Zellkulturmedium und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen	25
2.13 Software	26
<b>2.14 Internet-Ressourcen</b>	<b>26</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Zellbiologische Verfahren	27
3.1.1 Kultivierung der Zelllinien	27
3.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	28
3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	29
3.1.4 Zellproliferationsassay Easy For You (EZ4U)	29
3.2 Isolierung und Analyse von Proteinen	30
3.2.1 Gewinnung von Gesamtprotein mittels 1x SDS-Puffer	30
3.2.2 Proteinisolierung mittels RIPA-Puffer	30
3.2.3 Proteinisolierung mittels IP-Puffer (Immunpräzipitations-Puffer)	31
3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung	31

---

---

3.2.5 Immunpräzipitation	32
3.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	33
3.2.7 Westernblot (WB)-Analyse (Elektroblot)	34
Immunfärbung	34
3.2.8 Rac1 Aktivitäts-Assay	35
3.2.9 Ponceau-Färbung	35
3.3 Molekularbiologische Methoden	36
3.3.1 RNA-Isolierung	36
3.3.2 Reverse Transkription	36
3.3.3 „Standard endpoint“ PCR (Polymerase Chain Reaction)	36
<i>Amplifikation der Inserts für die Klonierungen</i>	38
3.3.4 „Real-time“-RT-PCR	40
<i>Auswertung der Echt-Zeit-PCR</i>	41
3.3.5 Kompetitive PCR	42
3.3.5a Herstellung des jeweiligen internen Standards	42
3.3.5b PCR und Auswertung	43
3.3.6 Agarosegel-Elektrophorese	44
3.3.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mittels Elektroelution	45
3.3.8 Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren	45
3.3.8a Phenol/Chloroform-Extraktion	45
3.3.8b Alkohol-Fällung	46
3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
3.4 Klonierung von PCR-Produkten	46
3.4.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	47
3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten	47
3.5 Arbeiten mit Bakterien	48
3.5.1 Kultivierung von E. coli	48
3.5.2 Transformation von E. coli	48
3.5.3 „Colony“-PCR	49
3.5.4 Plasmidpräparation mit dem Qiagen Miniprep Kit	
(QIAprep Spin Miniprep)	49
3.6 Transiente Transfektion	49
3.7 Luziferase-Assay	50
3.8 Konstruktion der verwendeten Vektoren	51

---

---

3.9 Retrovirale Transduktion	52
3.10 Orthotopes Tumormodell	53
3.10.1 Routine Histologie und Immunhistochemie	54
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)	55
4.1.1 Die Rolle von T $\beta$ RII bei der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten BGN-Expression	55
4.1.2 Die ALK5-Kinase-Aktivität ist sowohl für die Aktivierung von p38-MAPK als auch die Induktion der BGN-Expression erforderlich	57
4.1.3 Die Smad-aktivierende Funktion der ALK5-Kinase ist sowohl für die Aktivierung von p38-MAPK als auch für die Hochregulation der BGN-mRNA notwendig	59
4.1.4 Die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Aktivierung von p38-MAPK und die Hochregulation von BGN sind abhängig von der Zelladhäsion	62
4.1.5 Dominant-negatives Rac1 blockiert die durch TGF- $\beta$ 1- induzierte Expression von BGN durch die Inhibition der p38-Aktivierung	67
4.1.6 Die ektope Überexpression von Rac1 steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression	71
4.1.7 Konstitutiv-aktives Rac1 kann den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression in nicht-adhärenenten Zellen nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation wiederherstellen	73
4.1.8 Rac1 wird durch TGF- $\beta$ 1 in adhärenenten Zellen, nicht aber in Suspensions-Zellen aktiviert.	75
4.1.9 DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression und die p38-Aktivierung	77
4.1.10 Effekte verschiedener Agonisten und Antagonisten der ROS-Produktion auf die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN	78
4.1.11 Expression von Nox- und phox-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Panc-1-Zellen	80
4.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ bei der Tumorprogression	81

---

---

4.2.1 Charakterisierung der ALK5-Mutante caRImL45 in Bezug auf die Smad- und die p38-MAPK-Aktivierung in Panc-1-Zellen	81
4.2.2 Vergleich der Effekte von caALK5 und caRImL45 auf die Smad-abhängige Regulation verschiedener TGF- $\beta$ -responsiver Gene	82
4.2.3 Die Expression von caALK5 kann den proliferations-hemmenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 in Panc-1-Zellen imitieren	84
4.2.4 Die Expression von caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene, die in die Neoangiogenese, EMT und Invasion/Metastasierung involviert sind	86
4.2.5 ALK5 supprimiert zwar das Tumorstadium, steigert aber gleichzeitig die Metastasierung in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms	89
<b>5. Diskussion</b>	<b>95</b>
5.1 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)	95
5.1.1 Die Smad-aktivierende Funktion und die Kinasefunktion der ALK5-Kinase sind Voraussetzung für die Aktivierung von p38-MAPK und die Hochregulation der BGN-mRNA	96
5.1.2 Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38-MAPK und Hochregulation von BGN sowie die Aktivierung von Rac1 sind abhängig von der Zelladhäsion	97
5.1.3 Die ektope Überexpression von Rac1-WT steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression	98
5.1.4 CaRac1 kann den TGF- $\beta$ 1-Effekt auf die BGN-Expression in nicht-adhären Zellen wieder herstellen	99
5.1.5 DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38 und die Induktion der BGN-Expression	100
5.1.6 Bedeutung von ROS bei der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN	100
5.1.7 Panc-1-Zellen exprimieren verschiedene Nox- und phox-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase	101

---

---

5.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ bei der Tumorprogression	103
5.2.1 Effekte der stabilen Expression der konstitutiv-aktiven ALK5-Mutante auf verschiedene TGF- $\beta$ -responsive Gene und die Proliferationshemmung	104
5.2.2 ALK5 supprimiert das Tumorwachstum in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell des duktaalen Pankreasadenokarzinoms	105
5.2.3 Die Expression von caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene, die an der Neoangiogenese und der EMT beteiligt sind	106
5.2.4 Konstitutiv-aktives ALK5 fördert die Metastasierung in SCID-Mäusen	107
5.2.5 Ausblick	108
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>128</b>
<b>8. Summary</b>	<b>130</b>
<b>9. Curriculum vitae</b>	<b>132</b>
<b>10. Erklärung und Publikationsliste</b>	<b>133</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>135</b>

---

---

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung</b>	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in der Zelle (nach Lodish <i>et al.</i> , 2001)	3
<b>Abb. 2:</b> Signalflussmodell der BGN-Induktion durch TGF- $\beta$ 1	9
<b>Abb. 3:</b> Regulierung der Rac-Aktivität	10
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der leukozytären (nach Ray und Shah, 2005, Griendling <i>et al.</i> , 2000) und nicht-phagozytischen NAD(P)H-Oxidase (Griendling <i>et al.</i> 2000)	11
<b>Abb. 5:</b> TGF- $\beta$ als Tumorsuppressor und Tumorpromotor	13
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der Domänen des T $\beta$ RI und der Mutante caRI <sub>mL45</sub>	16
<b>Abb. 7:</b> Beispiel der kompetitiven PCR für BGN, PAI-1- und GAPDH nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung	44
<b>Abb. 8:</b> Ein funktioneller T $\beta$ R <sub>II</sub> ist wichtig für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression	55
<b>Abb. 9:</b> Detektion der ektope Expression der dn Mutante des T $\beta$ R <sub>II</sub> in Panc-1-Zellen	56
<b>Abb. 10:</b> Die ektope Expression der dnT $\beta$ R <sub>II</sub> -Mutante unterdrückt die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Hochregulation der BGN- und PAI-1-Expression	57
<b>Abb. 11:</b> Die pharmakologische Inhibition der ALK5-Kinase unterdrückt die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression.	57
<b>Abb. 12:</b> Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 und p38-MAPK wird durch kdALK5 unterdrückt	58
<b>Abb. 13:</b> Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN wird durch die ektope Expression von kdALK5 inhibiert	59

---

---

<b>Abb. 14:</b> Die Fähigkeit der ALK5-Kinase, Smad2 und p38-MAPK zu phosphorylieren, beruht auf ihrer Smad-aktivierenden Funktion	60
<b>Abb. 15:</b> Die Mutante caRImL45 kann das Smad-responsive Reporterplasmid p6SBE-Luc nicht aktivieren	61
<b>Abb. 16:</b> Die Mutante caRImL45 ist nicht fähig, den TGF- $\beta$ 1-Effekt auf die BGN-Expression nachzuahmen	62
<b>Abb. 17:</b> Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Hochregulation von BGN ist abhängig von der Zelladhäsion	63
<b>Abb. 18:</b> Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38-MAPK ist abhängig von der Zelladhäsion	64
<b>Abb. 19:</b> Die Expression von PAI-1 ist nicht abhängig von der Zelladhäsion	65
<b>Abb. 20:</b> Integrine sind an der durch TGF- $\beta$ 1 vermittelten Induktion der Expression von BGN beteiligt	66
<b>Abb. 21:</b> Cytochalasin D reduziert sowohl die basale als auch die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression	67
<b>Abb. 22:</b> Die pharmakologische Inhibition von Rac1 reduziert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression	68
<b>Abb. 23:</b> Überprüfung des Erfolgs der retroviralen Transduktion von Panc-1-Zellen mit einer dnRac1-Mutante	68
<b>Abb. 24:</b> Die Inhibition (Knock-out) von Rac-1 durch ektope Expression der dn Mutante Rac1-T17N reduziert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression	69
<b>Abb. 25:</b> Dominant-negatives Rac1 verhindert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38 MAPK	69
<b>Abb. 26:</b> Die ektope Expression von dnRac1 führt in Panc-1-Zellen nicht zu einer Reduktion der Aktivierung von Smad3 durch TGF- $\beta$ 1	70

---

---

<b>Abb. 27:</b> Die Inhibition von Rac-1 durch eine dn Mutante führt nicht zu einer Reduktion des TGF- $\beta$ 1-Effektes auf die GADD45 $\beta$ –Expression	71
<b>Abb. 28:</b> Nachweis der ektopen Expression von Rac1 in Einzelklonen nach einer retroviralen Transduktion	72
<b>Abb. 29:</b> Die Überexpression von Rac1 steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression	72
<b>Abb. 30:</b> Konstitutiv-aktives Rac1 aktiviert p38 MAPK in Panc-1-Zellen ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1	73
<b>Abb. 31:</b> Überprüfung der stabilen Transfektion von Panc-1-Zellen mit einer caRac1-Mutante	74
<b>Abb. 32:</b> caRac1 stellt den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf BGN in nicht-adhärenenten Zellen wieder her	75
<b>Abb. 33:</b> Die Beladung von Rac1 mit GTP wird durch TGF- $\beta$ 1 in adhärenenten-, aber nicht in Suspensions-Zellen induziert	76
<b>Abb. 34:</b> Der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN	77
<b>Abb. 35:</b> DPI reduziert die Aktivierung von p38-MAPK	78
<b>Abb. 36:</b> Effekte von verschiedenen Antioxidationsmitteln und Inhibitoren der NADPH-Oxidase bzw. redox-sensitiver Proteine auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion der BGN-mRNA	79
<b>Abb. 37:</b> Expression verschiedener NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in Panc-1-Zellen	80
<b>Abb. 38:</b> WB-Analyse für ALK5 und phospho-Smad2 (p-Smad2) mit Zelllysaten aus Panc-1-Einzelklonen, die stabil caALK5 oder caRImL45 exprimierten	81

---

---

<b>Abb. 39:</b> Untersuchung der Wirkung von caRImL45 auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von Smad2	82
<b>Abb. 40:</b> Die ektope Expression von caALK5 beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von Myc- und Smad7-Reportergen-Konstrukten	83
<b>Abb. 41:</b> Untersuchung des Effektes von caALK5 und caRImL45 auf die Expression von Genen, die an der durch TGF- $\beta$ 1-vermittelten Wachstumsinhibition beteiligt sind	84
<b>Abb. 42:</b> Die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 ist notwendig für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Wachstumsinhibition	85
<b>Abb. 43:</b> caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Marker der Neoangiogenese	86
<b>Abb. 44:</b> Die caALK5-exprimierenden Zellen weisen morphologische Merkmale der EMT auf	87
<b>Abb. 45:</b> Expression von EMT-Markern in TGF- $\beta$ 1 behandelten WT-, unbehandelten caALK5- und caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen	88
<b>Abb. 46:</b> caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene der Metastasierung	89
<b>Abb. 47:</b> Durchschnittliches Tumor-volumen von orthotop gewachsenen Panc-1-Zellpools (n=6 Mäuse/ Gruppe) in SCID-Mäusen nach 28 Tagen	90
<b>Abb. 48:</b> Expression der ALK5 Mutanten in den Xenograft-Tumoren	90
<b>Abb. 49:</b> Immunhistochemischer Nachweis von ALK5 in Schnitten eines Tumors, der aus den caALK5-exprimierenden Panc-1-Zellen entstanden ist (Panc-1-caALK5 Tumor #3)	91
<b>Abb. 50:</b> Mitotischer Index der von Panc-1-caALK5-, Panc-1-caRImL45-exprimierenden und Panc-1-WT-Zellen abstammenden Tumore	92

---

---

<b>Abb. 51:</b> Färbung von Kryoschnitten aus den in Abb. 47 gezeigten Tumoren mit CD31 zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte	93
<b>Abb. 52:</b> Mittleres Volumen der Lebermetastasen	94
<b>Abb. 53:</b> Integration von Rac1 in das Signalflussmodell der BGN-Induktion durch TGF- $\beta$ 1	98
<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1:</b> Smads werden in drei Gruppen eingeteilt	2
<b>Tabelle 2:</b> Primärantikörper und Sekundärantikörper	21
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Zelllinien	24
<b>Tabelle 4:</b> Retrovirale Vektoren und das jeweilige Antibiotikum	27
<b>Tabelle 5:</b> Inhibitoren	28
<b>Tabelle 6:</b> „touch-down“-PCR-Standardprogramm	38
<b>Tabelle 7:</b> PCR-Programm für die Pfu-Turbo-Polymerase	40
<b>Tabelle 8:</b> RT-PCR Standardprogramm	41
<b>Tabelle 9:</b> Einteilung der Versuchstiere	53

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (s. Seite 16)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Act	Activin
ALK	Activin-like kinase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BCA	bicinchoninic acid
BGN	Biglykan
BMP	Bone morphogenetic protein"
BSA	bovine serum albumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	konstitutiv-aktiv
CBP	CREB-binding protein
CDC42	cell division cycle 42
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase/cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
c-myc	zelluläres myc
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COLIA2	Kollagen Typ I alpha 2
Co-Smad	common mediator Smad
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	Threshold cycle
CuSO <sub>4</sub>	Kupfer(II)-sulfat
D	Asparaginsäure
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO (Me <sub>2</sub> SO)	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DNA	deoxyribonucleic Acid/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol

---

---

ECL	enhanced chemiluminescence/verstärkte Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glykol-Tetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
et al.	und andere
FCS	Fetales Kälber Serum /fetal calf serum
FLAG	Protein- <i>Tag</i>
g	Gramm
G	Glycin (s. Seite 16)
G	Gunanin
G-418	Geneticin
GADD45 $\beta$	Growth arrest DNA damage 45 $\beta$
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5-diphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GS-Domäne	Glycin/Serin-reiche Domäne
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	hour (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare NOS
IP	Immunpräzipitation
I-Smad	inhibitorisches Smad
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K	Lysin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Kd	kinase-defizient
kDa	Kilodalton
Ki-67	Proliferationsantigen, welches nur in der G1-, S-, G2-und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird
l	Liter
LB	Nährmedium nach Luria Bertani
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar

---

---

mA	Milliampere
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	messenger ribonucleic acid/Boten-Ribonukleinsäure
MVD	micro vessel density, Mikrogefäßdichte
MW	Mittelwert
<i>MyD118</i>	Myeloid differentiation primary response gene
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
N	Asparagin
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
1N	1 Normal
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NaCl	Natrimumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaF	Natriumfluorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NFκB	Nuclear Factor kappa B, nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nox	NADPH-Oxidase
NP40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p-	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit Tween20 Zusatz
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
p	pico (10 <sup>-12</sup> )
p.a.	zur Analyse
PAK	p21 aktivierte Kinase (p21 activated kinase)
PAK-PBD	Proteindomäne von PAK (p21-rho-binding domain)

---

---

PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
phox	phagocytic NADPH oxidase
Polybrene	1,5-dimethyl-1,5-Diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RIPA-Puffer	radioimmunoprecipitation-Puffer
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Chain Reaction (Reverse- Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)
R-Smad	Rezeptor-regulierte Smads
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCID	severe combined immunodeficiency disease
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
Smad	leitet sich von MAD (mothers against decapentaplegic) und von SMA (smaller worms) ab
sog.	sogenannten
t-	<i>total/gesamt-</i>
T	Threonin (s. Seite 16)
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TIMPs	<u>T</u> issue <u>I</u> nhibitors of <u>M</u> MPs
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
U	unit, Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System
UE	Untereinheit
UV	ultraviolett

---

(v/v)	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen
ü.N.	über Nacht
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
z.B	zum Beispiel

---

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Transforming-Growth-Factor (TGF)- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 ist ein multifunktionelles Zytokin, welches die Zellproliferation, die Differenzierung, die Angiogenese, die Apoptose, die Produktion der extrazellulären Matrix und die Zellmotilität reguliert. Außerdem spielt TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Modulation des Immunsystems (Massagué, 1998). Es sind fünf verschiedene Isoformen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1-5) bekannt. Nur die Isoformen 1-3 kommen in Säugetieren vor, wobei es sich bei TGF- $\beta$ 1 um die am häufigsten exprimierte Isoform handelt. TGF- $\beta$ 1 gilt als Prototyp der TGF- $\beta$ -Superfamilie, zu der unter anderem auch die Activine, Inhibine und die BMPs („bone morphogenetic proteins“) gehören. TGF- $\beta$ 1 wird von den meisten Geweben/Zellen synthetisiert und als biologisch inaktive Proform sezerniert. Die Freisetzung des homodimeren aktiven TGF- $\beta$ 1-Proteins aus diesem Proteinkomplex mit dem LAP („latency-associated peptide“) erfolgt durch eine proteolytische Spaltung (Bonewald *et al.*, 1991; Gleizes *et al.*, 1997). In mesenchymalen Zellen wirkt TGF- $\beta$ 1 im Allgemeinen wachstumsstimulierend, während epitheliale Zellen in ihrer Proliferation gehemmt werden (Gleizes *et al.*, 1997, Massagué, 1998).

## 1.2 Rezeptoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie und Signaltransduktion

Die TGF- $\beta$ -Isoformen und auch die anderen Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie binden an drei verschiedenen TGF- $\beta$ -Rezeptoren (TGF- $\beta$ -Typ I- bis Typ III-Rezeptoren). Bei den Rezeptoren handelt es sich um eine Familie von Transmembran-Rezeptoren, von denen Typ I- und Typ II-Rezeptoren Serin/Threonin Kinaseaktivität besitzen. Als Typ III-Rezeptoren werden Betaglykan und Endoglin bezeichnet, deren Aufgabe darin besteht, TGF- $\beta$  zu binden und es den beiden anderen Rezeptoren zu präsentieren (Krishnaveni und Eickelberg, 2006). Sie selber besitzen keine Enzymaktivität und sind daher nicht direkt an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt.

Bis jetzt wurden im Menschen zwei Typ II-Rezeptoren für TGF- $\beta$  identifiziert: TGF- $\beta$ -RII (T $\beta$ RII) und T $\beta$ RII-B (Massagué, 1998; Hirai und Fijita, 1996). Im Gegensatz dazu wurden drei TGF- $\beta$  Typ I-Rezeptoren (T $\beta$ RI) identifiziert, die als „Activin receptor-like kinases (ALKs)“ bezeichnet werden (ten Dijke *et al.*, 1993). Zu ihnen zählen

---

ALK1/TSR-1 (ten Dijke *et al.*, 1993), ALK2/Tsk7L (Ebner *et al.*, 1993) und TGF- $\beta$  Typ-I-Rezeptor/ALK5 (Franzén *et al.* 1993). Eine wichtige Region innerhalb der Kinase-Domäne der Typ I-Rezeptoren ist die L45-Schleife. Durch diese Region ist die Spezifität des Rezeptors für sein jeweiliges Substratmolekül festgelegt (Feng und Derynck, 1997). TGF- $\beta$  bindet zunächst an den T $\beta$ RII, welcher seinerseits die Bildung eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes aus zwei Typ II- und zwei Typ I-Serin/Threonin-Kinasen induziert (Wrana *et al.*, 1994). Nach Komplexbildung kommt es zu einer Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in der GS-Domäne des T $\beta$ RI, wodurch dieser aktiviert wird. Bei der GS-Domäne handelt es sich um eine stark konservierte glycin-/serinreiche Sequenz, die aus 30 AS besteht. Nach seiner Aktivierung ist der T $\beta$ RI in der Lage, seine Effektorproteine, die Smads, zu phosphorylieren und somit zu aktivieren.

### 1.3 Smad-Proteine

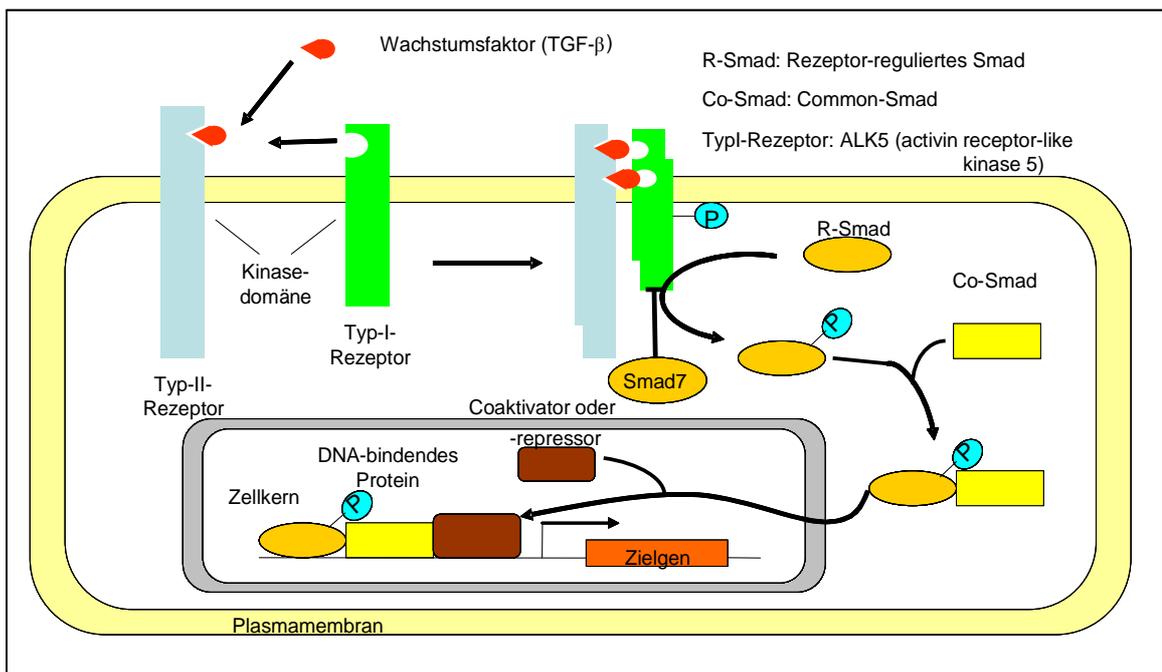
Die Weiterleitung des TGF- $\beta$ -Signals erfolgt über zyttoplasmatische Proteine, die als Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression einwirken, den sog. Smads. Der Name SMAD leitet sich von den zuerst identifizierten homologen Genen MAD, einem Drosophila-Protein („mothers against decapentaplegic“) und von SMA („smaller worms“), einem Gen aus *C. elegans*, ab (Sekelsky *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 1996; Riggins *et al.*, 1996, Nakao *et al.*, 1997). Smads werden nach ihren funktionellen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt: die Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8), die „common mediator“ Smads (Co-Smads: Smad4) und die inhibitorischen Smads (I-Smads: Smad6, Smad7) (de Caestecker *et al.*, 2000; siehe Tab.2). Charakteristisch für die Smad-Proteine ist das Vorhandensein von zwei homologen Domänen, jeweils am Amino- und Carboxy-Ende, welche als MH1 bzw. MH2 („mad homology domains“) bezeichnet werden (Massagué *et al.*, 2000) und für verschiedene Smad-Funktionen wichtig sind.

**Tabelle 1: Smads werden in drei Gruppen eingeteilt.**

R-Smads	Co-Smad	I-Smads
Smad1	Smad4	Smad6
Smad2		Smad7
Smad3		
Smad5		
Smad8		

Die R-Smads Smad2 und Smad3 werden direkt von ALK5 aktiviert, während Smad1, Smad5 und Smad8 von ALK1/2 phosphoryliert werden (Mazerbourg *et al.*, 2005).

Im Fall der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion werden wahlweise Smad2 oder Smad3 durch die aktivierte ALK5/T $\beta$ RI-Kinase mittels carboxy-terminaler Phosphorylierung aktiviert. Dadurch wird eine Konformationsänderung in den Smad-Proteinen ausgelöst, so dass sie vom Rezeptor abdissoziieren und anschließend mit dem Co-Smad4 (DPC4) (Hahn *et al.*, 1996) einen oligomeren Proteinkomplex bilden können.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in der Zelle (nach Lodish *et al.*, 2001).** TGF- $\beta$  bindet an die transmembranen Typ-II- und Typ-I-Rezeptoren, wodurch es zur Bildung heteromerer Serin/Threonin-Kinase-Komplexe kommt. Durch den Rezeptorkomplex erfolgt eine spezifische Phosphorylierung der Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads). Anschließend kommt es zur Dimerisierung von R-Smad- und Co-Smad-Molekülen. Dieser Komplex wird in den Nukleus transloziert, wo der Smad-Komplex zusammen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren die Expression von TGF- $\beta$ -Zielgenen reguliert.

Dieser Komplex wird in den Nukleus transloziert und reguliert dort die Aktivität von TGF- $\beta$ -responsiven Genen über verschiedene Mechanismen wie Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren wie CBP (CREB-binding protein), p300 (Derynck und Zhang, 2003) oder Corepressoren. Smad3 kann direkt an die DNA binden, während Smad2 aufgrund einer Insertion dazu nicht in der Lage ist. Eine wichtige Rolle bei der Regulation des TGF- $\beta$ -Signalweges spielen die I-Smads (z.B. Smad7), welche die Phosphorylierung der R-Smads und somit die Bindung an den Rezeptorkomplex dadurch verhindern, dass sie selbst in Interaktion mit dem Rezeptor treten und dadurch Smad2/3 verdrängen (de Caestecker *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*,

1997). Die Expression der I-Smads ist streng reguliert, durch extrazelluläre Faktoren beeinflussbar und kann auch durch TGF- $\beta$ 1 selbst induziert werden, wodurch ein autoinhibitorischer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird (Massagué *et al.*, 2000).

#### **1.4 Weitere Signalwege, die durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden**

Neben den Smads können auch andere Signalwege durch die ALK5-Kinase aktiviert werden (Derynck und Zhang, 2003), wie z.B. die p38-MAPK- („mitogen-activated protein kinase“) Signalwege (Yu *et al.*, 2002; Takekawa *et al.*, 2002), ERK („extracellular-signal regulated kinase“) und JNK („c-Jun-N-terminal kinase“) sowie die Rho-GTPasen RhoA, Rac und Cdc42. Die Aktivierung dieser Signalwege erfolgt sowohl Smad-abhängig als auch Smad-unabhängig. Umgekehrt kann die Aktivierung der Smads durch TGF- $\beta$ 1 in normalen Zellen und in Krebszellen durch MAPKs moduliert werden (Derynck und Zhang, 2003; Javelaud und Mauviel, 2005).

#### **1.5 Fehlregulation des TGF- $\beta$ -Systems und assoziierte Pathophysiologie**

Eine Fehlregulation von TGF- $\beta$ 1 ist mit einer Reihe häufiger Erkrankungen verknüpft, u.a. mit Organfibrosen, Wundheilungsstörungen sowie Tumor- und Autoimmunerkrankungen (Massagué *et al.*, 2000). Die Erkrankungen können z.B. durch genetische Modifikationen oder epigenetische Veränderungen einzelner Komponenten der TGF- $\beta$  Signalweiterleitung oder durch die Überexpression des Liganden selbst hervorgerufen werden.

##### **1.5.1 TGF- $\beta$ und Krebs**

TGF- $\beta$ 1 übt auf die meisten Epithelzellen einen antiproliferativen Effekt aus (Massagué *et al.*, 2000; Derynck *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wird TGF- $\beta$ 1 zu Beginn der Tumorprogression eine tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben, die durch weitere Mutationen im TGF- $\beta$ -Signalweg während der Tumorentwicklung in eine tumorfördernde Wirkung übergehen kann (siehe unten) (Bachman und Park, 2005; Muraoka-Cook *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass es in nahezu allen Pankreas- und Kolonkarzinomen zu inaktivierenden Mutationen in mindestens einer Komponente

---

---

des TGF- $\beta$ -Signalweges kommt (Massagué *et al.*, 2000). Einige dieser Mutationen treten in den TGF- $\beta$  Rezeptoren, Smad4 oder Smad2 auf.

Inaktivierende Mutationen im T $\beta$ RII treten z.B. in humanen kolorektalen Karzinomen, Magenkarzinomen und hereditären kolorektalen Karzinomen ohne Polyposis auf (Massagué *et al.*, 2000; Buck und Ellenrieder, 2006). Weniger häufig konnten auch inaktivierende Mutationen im T $\beta$ RI in Ovarialkarzinomen, metastasierendem Brustkrebs, Pankreaskarzinomen (Goggins *et al.*, 1998) und T-Zell-Lymphomen beobachtet werden (Derynck *et al.*, 2001). Weiterhin können in einer großen Zahl von Pankreaskarzinomen (50%) und kolorektalen Karzinomen (30%) chromosomale Deletionen und Mutationen von Smad4 (DPC4) (Hahn *et al.*, 1996), einem zentralen Mediator der TGF- $\beta$ -Wirkung beobachtet werden. Das Tumorsuppressorgen Smad4 spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Wachstumsinhibition, worauf im Wesentlichen seine Tumorsuppressor-Wirkung beruht. Zusätzlich kommt es bei 50% der Pankreaskarzinome zu einer Überexpression des inhibitorischen Smad7 (Kleeff *et al.*, 1999), was zu einer Unterbrechung des TGF- $\beta$ -Signalweges und dadurch zu duktalem Läsionen im Pankreas führt (Kuang *et al.*, 2006).

### 1.5.2 Duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreaskarzinom macht mit seinen Varianten über 90% aller Pankreastumore aus (Zuidema und Yeo, 2002). Es stellt mit seiner extrem schlechten Prognose, einer 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 3%, die fünfthäufigste krebserkrankungsbedingte Todesursache in Deutschland dar (Logsdon *et al.*, 2003). Pankreaskarzinome treten überwiegend zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr auf (Bertz *et al.*, 2006). Die Diagnose der Erkrankung wird aufgrund der Symptomlosigkeit häufig erst dann gestellt, wenn sich schon Metastasen in den umliegenden Organen wie Leber oder Lymphknoten befinden und eine kurative Operation nicht mehr möglich ist (Yeo *et al.*, 2002). Ein zusätzliches Problem ist die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber Strahlen- und/oder Chemotherapie, woraus sich die Notwendigkeit ergibt, neue Therapieansätze für die Patienten zu entwickeln (Logsdon *et al.*, 2003; Fölsch und Schäfer, 2004).

Wie bei Karzinomen allgemein sind auch beim Pankreaskarzinom die Mechanismen der Entstehung weitgehend ungeklärt. Es handelt sich aber mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem verschiedene Auslöser eine Rolle spielen. Unter anderem werden als Auslöser in der Literatur Nikotin, eine fett- und fleischreiche

---

Ernährung, eine längere Exposition gegenüber verschiedenen kanzerogenen Substanzen (DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan),  $\beta$ -Naphthylamin) und eine genetische Prädisposition diskutiert (Vimalachandran *et al.*, 2004; Bertz *et al.*, 2006). Abb. 5 (s. Seite 13) zeigt das postulierte Tumorprogressionsmodell der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN), in dem versucht wird, die auftretenden Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen in eine zeitliche Abfolge entsprechend ihres Auftretens zu bringen (Wilentz *et al.*, 2000). Die Pankreasläsionen werden in PanIN 1A, 1B, 2 und 3 unterteilt, wobei jede dieser Stufen durch bestimmte morphologische Veränderungen und Akkumulation der genetischen Veränderungen charakterisiert ist (Wilentz *et al.*, 2000). In über 90% der Pankreaskarzinome tritt eine aktivierende Mutation des *K-Ras* Proto-Onkogens auf (Moskaluk *et al.*, 1997; Rozenblum *et al.*, 1997). Zusätzlich kommt es auch zu inaktivierenden Mutationen von Tumorsuppressorgenen wie p16<sup>INK4a</sup> und p53 (Rozenblum *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003). Die Tumorzellen wachsen dann unabhängig von den Kontrollmechanismen der Apoptose und der Proliferation, was zum Teil auch eine veränderte oder fehlende Responsivität gegenüber Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 zur Folge haben kann. Weiterhin treten verschiedene Alterationen der TGF- $\beta$ -Signalkaskade in Pankreaskarzinomen auf (siehe oben), die zu einem Verlust der antiproliferativen Wirkung von TGF- $\beta$ 1 führen. Im duktalem Pankreaskarzinom werden alle drei Isoformen von TGF- $\beta$  überexprimiert (Friess *et al.*, 1993).

## **1.6 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)**

### **1.6.1 Biglykan**

TGF- $\beta$ 1 reguliert unter anderem die Produktion der extrazellulären Matrix und gilt als Hauptvermittler der Fibrose und der Desmoplasie unterschiedlicher Gewebe (Border und Noble, 1994). Der Wachstumsfaktor induziert die Synthese von Strukturproteinen wie Kollagenen, Fibronektinen und Proteoglykanen und hemmt die Expression und/oder Aktivierung von Matrix-degradierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) direkt oder durch die Aktivierung ihrer Inhibitoren, der TIMPs (Tissue Inhibitors of MMPs) (Schiller *et al.*, 2004). Als etabliertes TGF- $\beta$ 1-Zielgen gilt Biglykan, das zur Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane gehört (Iozzo, 1999; Iozzo, 1997). BGN ist am Matrixaufbau, an der Zelladhäsion, der Zellmigration und der Regulation

---

von Wachstumsfaktoren, wie z.B. der TGF- $\beta$ 1-Aktivität, beteiligt (Iozzo, 1999; Kinsella *et al.*, 2004). BGN neutralisiert durch Bindung an TGF- $\beta$ 1 dessen biologische Aktivität, indem es die Interaktion von TGF- $\beta$ 1 mit seinen Rezeptoren verhindert (Hildebrand *et al.*, 1994).

Eine Überexpression von BGN wird z.B. für fibrotische Läsionen der Lunge (Westergren-Thorsson *et al.*, 1993), der Leber (Gressner *et al.*, 1994), der Nieren (Schaefer *et al.*, 2001), für die chronische Pankreatitis und auch für das Stroma solider Tumore, wie dem Pankreaskarzinom (Weber *et al.*, 2001), beschrieben. Die Akkumulation von BGN ist zumindest zum Teil eine Folge der erhöhten TGF- $\beta$ 1-Konzentration in diesen Geweben. Aus diesem Grund gilt BGN auch als Marker für fibrotisches Gewebe (Funderburgh *et al.*, 2001). Weiterhin kann TGF- $\beta$ 1 die epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) auslösen (Kap. 1.7.3). Bei diesem Vorgang kommt es z.B. in Pankreaskrebszellen u.a. zu einer Abnahme in der Expression von epithelialen Markern, wie E-Cadherin und einer Zunahme der Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin und Biglykan.

Weber und Mitarbeiter haben gezeigt, dass exogen verabreichtes BGN in TGF- $\beta$ 1-responsiven und TGF- $\beta$ 1-unresponsiven Pankreaskrebszellen zu einer Wachstumshemmung durch die Induktion eines Arrestes in der G1-Phase des Zellzyklus führt. Dieses geht mit einer gesteigerten Expression von p27<sup>KIP1</sup> und einer Reduktion in der Expression von Zyklin A und des „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) einher (Weber *et al.*, 2001). Dabei sind es nicht nur die Stromazellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die zur BGN-Synthese fähig sind. Chen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen selbst auf eine TGF- $\beta$ 1-Stimulation mit der Synthese und der Expression von BGN reagieren (Chen *et al.*, 2002). Da TGF- $\beta$ 1 in frühen Stadien der Tumorentwicklung üblicherweise noch eine antiproliferative Wirkung besitzt, könnte daher das durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN hieran beteiligt sein, indem es als extrazelluläre Zellzyklusbremse fungiert und das Wachstum der Krebszellen über den oben beschriebenen Mechanismus hemmt.

### **1.6.2 Induktion der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1: Stand der Forschung**

Die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 ist sehr komplex (siehe Abb. 2). Chen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN abhängig von der Expression eines funktionellen Smad4 und somit von einem intakten Smad-Signalweg ist (Chen *et al.*, 2002). Da TGF- $\beta$ 1 nicht nur den Smad-Signalweg aktiviert

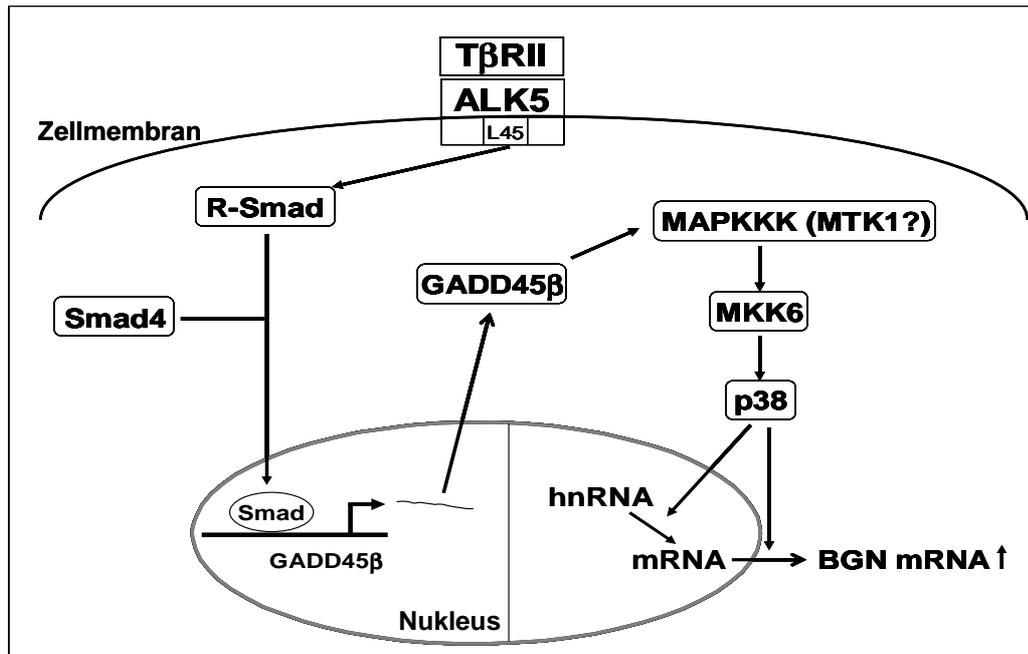
---

---

(siehe oben), wurde außerdem untersucht, ob andere Signalwege an der Regulation von BGN beteiligt sind. Für den p38-MAPK-Signalweg ist u.a. bekannt, dass er zusammen mit dem Smad-Signalweg für die EMT von Zellen verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob p38 auch an der Regulation von BGN beteiligt ist. Ungefroren und Mitarbeiter konnten schließlich zeigen, dass für die TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN auch eine Aktivierung des p38-Signalweges nötig ist (Ungefroren *et al.*, 2003). Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu klären, in welcher Weise diese beiden Signalwege miteinander verknüpft sind. Schließlich konnte demonstriert werden, dass es sich bei dem gesuchten Gen, das Smad-abhängig durch TGF- $\beta$ 1 aktiviert wird und dessen Proteinprodukt selbst wiederum p38-MAPK aktiviert, um das stress response“ Gen GADD45 $\beta$  („growth arrest DNA damage 45  $\beta$ “; kodiert von *MyD118*) handelt (Ungefroren *et al.*, 2005; Takekawa *et al.*, 2002). Allerdings ist diese Regulation noch nicht in allen Einzelheiten bekannt und bietet daher einen Ansatzpunkt für weitere Studien zur Klärung der am Signalfluss beteiligten Proteine oder anderer wichtiger Faktoren, wie z.B. der Zelladhäsion.

Für den p38-MAPK-Signalweg wurde beschrieben, dass er Smad-abhängig oder auch Smad-unabhängig durch den T $\beta$ RI/ALK5 aktiviert werden kann. Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Smad-abhängige transkriptionelle Induktion von GADD45 $\beta$ , welche Teil der Antwort der Zelle auf genotoxischen Stress (Liebermann und Hoffman, 2002) ist, führt zur verzögerten Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$ 1 (Yoo *et al.*, 2003; Takekawa *et al.*, 2002) über Bindung und Aktivierung der MAPKKK MTK1/MEKK4 (Takekawa *et al.*, 2002; Takekawa und Saito, 1998). So führt die Aktivierung von p38 über GADD45 $\beta$  schließlich zur Expression von BGN (Ungefroren *et al.*, 2003; Ungefroren *et al.*, 2005). Seitdem bekannt ist, dass die Regulation der Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$  auch von Integrinen abhängig ist (Bhowmick *et al.*, 2001), geht man davon aus, dass es sich bei der p38-Aktivierung um einen zentralen Punkt des „Cross-Talks“ zwischen der TGF- $\beta$ /Smad-Signalwirkung und der Adhäsions-/Integrin-Signalwirkung handelt. Es ist bekannt, dass die GTPasen Rac und Cdc42 der Rho-Familie Adhäsions-/Integrin-abhängige Signale an MAPKs weiterleiten, wodurch diese aktiviert werden, so dass sie auch imstande sind, den p38-MAPK-(und den JNK-) Signalweg zu aktivieren (Zhang *et al.*, 1995).

---



**Abb. 2: Signalfliessmodell der BGN-Induktion durch TGF- $\beta$ 1.** In diesem Schema sind die bekannten durch TGF- $\beta$ -induzierten Signalwege dargestellt, die vom Rezeptorkomplex zum Nukleus und schließlich zur Akkumulation von BGN-mRNA führen. Nach der Aktivierung von T $\beta$ RII und ALK5 kommt es durch die Smad-aktivierende Funktion von ALK5, die in der L45-Schleife lokalisiert ist, zur Phosphorylierung eines R-Smads, welches daraufhin einen Komplex mit Smad4 bildet, der in den Nukleus transloziert wird und die Expression von GADD45 $\beta$  induziert. GADD45 $\beta$  aktiviert wiederum p38 MAPK über die Aktivierung von MAPKKKs. Aktiviertes p38 gelangt in den Zellkern und induziert dort die BGN-mRNA-Akkumulation im Zytoplasma durch nukleäre Transkript-Prozessierung, Stabilisierung und/oder Export.

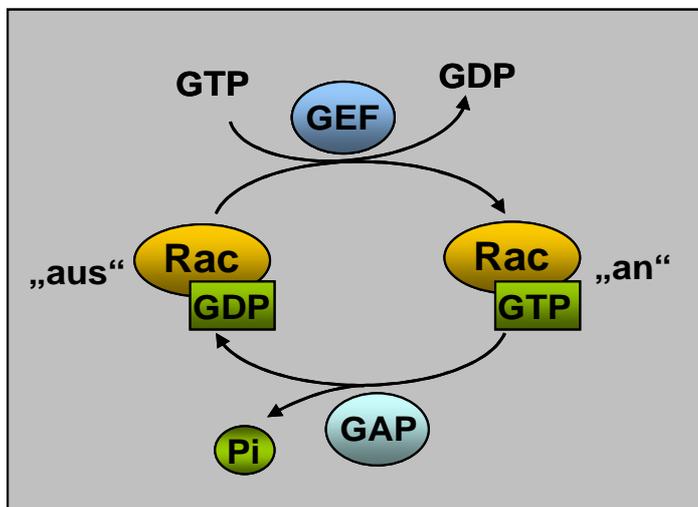
Die Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$ 1 kann auch über reaktive Sauerstoffspezies (ROS: „reactive oxygen species“) erfolgen, die von der NAD(P)H-Oxidase (Chiu *et al.*, 2001) produziert werden. Für die enzymatische Aktivität dieses NAD(P)H-Oxidase-Komplexes wird Rac1 als Untereinheit benötigt (Bokoch und Diebold, 2002).

Von Ungefroren und Mitarbeitern wurde zuvor gezeigt, dass die p38-Signalfunktion eine wichtige Rolle bei der durch TGF- $\beta$ 1 induzierten Expression von BGN spielt. Da bekannt ist, dass Rac1 und die NAD(P)H-Oxidase an der Regulation von p38 beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob diese auch an der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN in Pankreaskarzinomzellen beteiligt sind. Für diese Untersuchungen sollte die Zelllinie Panc-1 verwendet werden, da schon zuvor gezeigt wurde, dass sie TGF- $\beta$ 1-responsiv ist, BGN exprimiert und auf Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 mit einer deutlichen Hochregulation der BGN-mRNA reagiert (Chen *et al.*, 2002).

### 1.6.3 Rac1

Rac1, Rho und Cdc42 sind die am besten charakterisierten Mitglieder der kleinen GTPasen der Rho-Familie. Diese kleinen Proteine (190-250 AS) bestehen aus einer

GTPase-Domäne und kurzen N- und C-terminalen Verlängerungen. Sie besitzen eine hohe Affinität für GDP und GTP und oszillieren zwischen aktivem GTP-gebundenem Zustand (Schalter „an“) und inaktivem GDP-gebundenem Zustand (Schalter „aus“) (siehe Abb. 3). Im GTP-gebundenen Zustand können Rho-Proteine an verschiedene Zielmoleküle/Effektorproteine binden, welche direkt oder indirekt die Aktinorganisation kontrollieren und diese aktivieren. Dadurch können die kleinen GTPasen die Zelladhäsion regulieren und morphologische Veränderungen der Zelle hervorrufen (Kjoller und Hall, 1999; Zhang *et al.*, 1995). Nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren induziert Rac1 die Ausbildung von Lamellipodien (Nobes und Hall, 1995; McCarty *et al.*, 2005) an der Plasmamembran und führt zu dem sog. „membrane ruffling“, einer Kräuselung der Zellmembran (Ridley, 1994), während Cdc42 die Bildung von Filopodien induziert (Chang *et al.*, 2005). Wie schon erwähnt, ist das Rac1-Protein an der Signalübermittlung von der Zelloberfläche bis zum Zellkern beteiligt und stimuliert sowohl die Aktivität der JNK als auch die der p38-MAPK (Zhang *et al.*, 1995). Weiterhin ist bekannt, dass Rac-Proteine die Aktivität des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes regulieren können und somit an der Superoxidproduktion beteiligt sind (Heyworth *et al.*, 1993; Bokoch und Diebold, 2002).

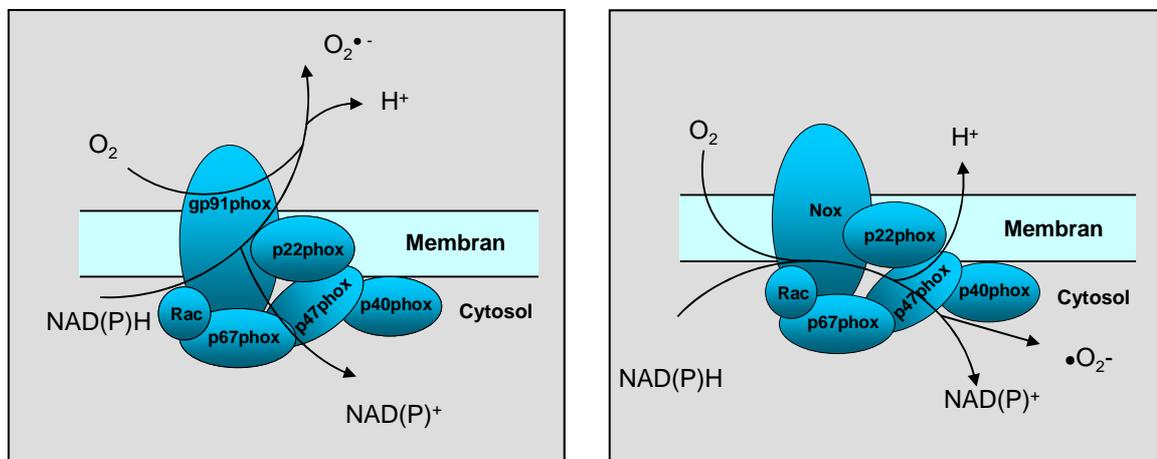


**Abb. 3: Regulation der Rac-Aktivität.** Der Wechsel von GDP- zu GTP-gebundener Form und damit die Aktivierung von Rac („an“) wird durch Guanin-Nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) katalysiert. Sie fördern den Austausch von gebundenem Nukleotid, indem sie die Dissoziation von GDP und die anschließende Aufnahme von GTP beschleunigen. Die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) inaktivieren Rac („aus“), indem sie die Hydrolyse von GTP bewirken, wobei Rac fest mit GDP verbunden bleibt (Alberts *et al.*, 2004).

#### 1.6.4 NAD(P)H (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidase

Bei den NAD(P)H-Oxidasen (Nox) handelt es sich um eine Gruppe membran-assoziiierter Enzymkomplexe. Am besten untersucht ist die leukozytäre NAD(P)H-Oxidase, welche in Phagozyten und B-Lymphozyten exprimiert wird. Dieser Multienzymkomplex besteht aus membran-gebundenen Komponenten (gp91<sup>phox</sup>,

$p22^{phox}$ , wobei *phox* für „PHagocyte OXidase“ steht), die das Flavocytochrom b558 bilden, und zytosolischen Komponenten ( $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  und den GTPasen Rac1 oder Rac2), die nach Aktivierung an die Membran gelangen (siehe Abb. 4) (Bokoch und Knaus, 2003). Bei diesem Enzym handelt es sich um einen Elektronen-Transfer-Komplex, der NAD(P)H als Substrat nutzt und die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ , reaktive Sauerstoffspezies, ROS) katalysiert (Bokoch und Diebold, 2002; Bokoch und Knaus, 2003; Geiszt und Leto, 2004). In Phagozyten spielen das NAD(P)H-Oxidase System und die durch dieses generierten Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle bei der Infektabtötung, dem sog. „Respiratory Burst“ (Bokoch und Knaus, 2003; Forman und Torres, 2002). Für die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in humanen Neutrophilen wurde gezeigt, dass sie abhängig von der Zelladhäsion (Zhao *et al.*, 2003) und von Tyrosinkinase-Aktivitäten ist (Yang *et al.*, 2000; Dusi *et al.*, 1996). In den letzten Jahren wurden Homologe oder Komponenten der neutrophilen/phagozytischen NAD(P)H-Oxidase in verschiedenen nicht-phagozytischen Geweben und Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Gefäßmuskelzellen und Schilddrüsenzellen gefunden (Oliveira *et al.*, 2003).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der leukozytären (nach Ray und Shah, 2005, Griendling *et al.*, 2000) und nicht-phagozytischen NAD(P)H-Oxidase (Griendling *et al.* 2000). Links: Der Multienzymkomplex in Leukozyten besteht aus den membrangebundenen Komponenten gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, die dem Elektronentransport dienen, und den zytosolischen Komponenten p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> und den GTPasen Rac1 oder Rac2, die nach Aktivierung an die Membran wandern. Rechts: Dargestellt sind die Komponenten der NAD(P)H-Oxidase, die in glatten Gefäßmuskelzellen identifiziert werden konnten (Griendling *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002). Wie zu erkennen ist, findet hier die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung, anders als in den Leukozyten, hauptsächlich intrazellulär statt.**

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese nicht-phagozytischen Oxidasen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidanionen produzieren (Irani, 2000; Görlach *et al.*, 2000), die als Signalmoleküle in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden fungieren.

---

Bis jetzt sind fünf verschiedene Isoformen der nicht-phagozytischen Oxidase (Nox 1-5) bekannt (Bokoch und Knaus, 2003; Geiszt und Leto, 2004).

## 1.7 Die Rolle von TGF- $\beta$ in der Tumorprogression

Da Biglykan in Pankreaskarzinomzellen u.a. als mesenchymaler Marker der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten EMT gilt, durch die die Tumorzellen die Fähigkeit zur Migration und Invasion erlangen, sollte im Folgenden die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms untersucht werden.

### 1.7.1 TGF- $\beta$ 1 als Tumorsuppressor

TGF- $\beta$ 1 kann als Tumorsuppressor und als Tumorpromotor wirken (siehe Abb. 5). Seine tumorsupprimierende Funktion kann dadurch erklärt werden, dass TGF- $\beta$ 1 normalerweise eine stark antiproliferative Wirkung auf epitheliale und lymphoide Zellen, aus denen die meisten Tumore entstehen, ausübt und in einigen Zelltypen auch Apoptose induzieren kann (Derynck *et al.*, 2001).

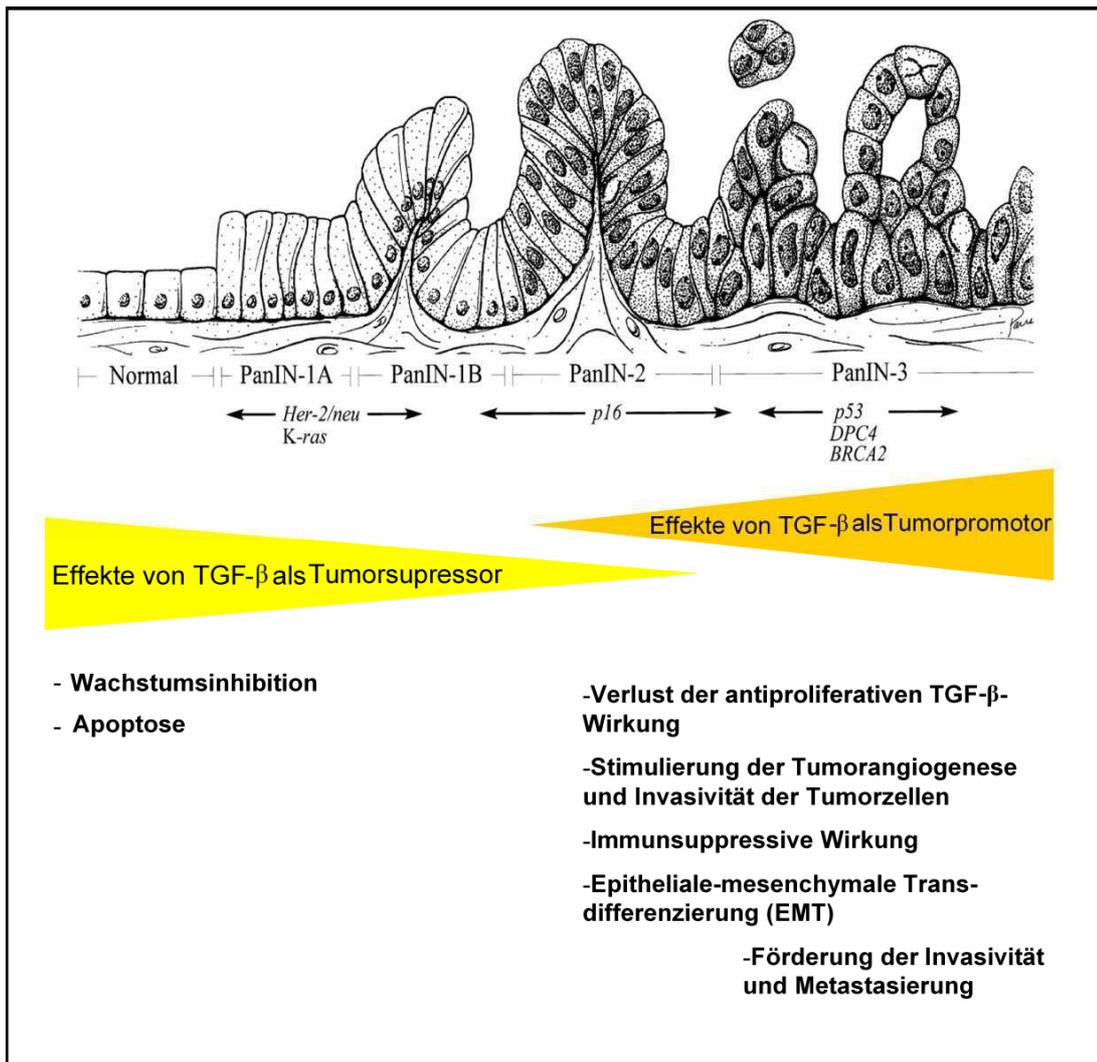
Die Wachstumsinhibition durch TGF- $\beta$ 1 erfolgt aufgrund seiner Eigenschaft, die Expression einiger Gene zu beeinflussen, die den Zellzyklus regulieren. So ist TGF- $\beta$ 1 z.B. in der Lage, die Expression des Proto-Onkogens *c-myc* herunterzuregulieren und die Transkription von Zyclin-abhängigen Kinase-(CDK)Inhibitoren wie p15<sup>INK4b</sup> und/oder p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zu aktivieren (Derynck *et al.*, 2001). Der Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP</sup> tritt z.B. in Wechselwirkung mit Komplexen aus CDK2 und Zyclin A oder E und inhibiert dadurch die Aktivität von CDK2, wodurch der Ablauf des Zellzyklus unterbrochen wird (Massagué *et al.*, 2000).

### 1.7.2 TGF- $\beta$ 1 als Tumorpromotor

Während der fortschreitenden Tumorprogression wird die antiproliferative Wirkung von TGF- $\beta$ 1 aufgehoben. Die normale Kontrolle der Apoptose und der Proliferation geht durch verschiedene Mutationen in Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogenen verloren. Im Pankreaskarzinom kann es durch eine Anreicherung von „Loss-of-function“-Mutationen (Smad4/DPC4, siehe oben) oder anderen Störungen im Smad-Signalweg zu einer Resistenz der Tumore gegen den antiproliferativen Effekt von TGF- $\beta$ 1 und damit zu einem Verlust der Tumorsuppression kommen. Normalerweise kommt es durch

---

TGF- $\beta$ 1 zu einer Inhibition der *c-myc*-Expression (siehe Kap. 1.7.1), die aufgrund von Mutationen verloren gehen kann, so dass keine inhibierende Regulation des Zellzyklus mehr stattfindet und die Zellen auf TGF- $\beta$ 1 nicht mehr mit einer Wachstumshemmung reagieren (Derynck *et al.*, 2001). Auch TGF- $\beta$ 1, das von den Pankreaskrebszellen selbst gebildet wird, kann folglich nicht mehr zu einer Suppression des Tumorwachstums führen.



**Abb. 5: TGF- $\beta$  als Tumorsuppressor und Tumorpromotor.** Dargestellt ist das Tumorprogressionsmodell der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) mit seinen morphologischen und genetischen Veränderungen (nach Wilentz *et al.*, 2000). Zusätzlich sind in dieser Abbildung die Effekte von TGF- $\beta$ 1 als Tumorsuppressor und Tumorpromotor aufgeführt.

Allerdings könnte es Prozesse wie die Invasion und die Metastasierung begünstigen, die zusätzlich durch aktivierte Onkogene, wie z.B. *Ras* gesteigert werden könnten. Es ist bekannt, dass K-Ras zusammen mit der TGF- $\beta$ -Signalwirkung die epitheliale-

---

mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) und die Invasion beeinflusst (Oft *et al.*, 2002; Janda *et al.*, 2002). Zusätzlich bewirkt TGF- $\beta$ 1 während der Tumorprogression eine Suppression des Immunsystems, die das Wachstum der Tumore begünstigt (Derynck *et al.*, 2001).

### 1.7.3 EMT

Die Fähigkeit von Tumorzellen zur Migration und Invasion beruht u.a. auf dem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und dem Erwerb einer fibroblastoiden Morphologie. Als Folge der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten Veränderungen in der Genexpression geht der epitheliale Phänotyp verloren und die Zellen weisen schließlich einen mesenchymalen Phänotyp (spindelförmige oder fibroblasten-ähnliche Gestalt) auf. Es kommt zu Veränderungen des Zytoskeletts und zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, da TGF- $\beta$ 1 z.B. die Expression von Zytokeratinen und dem epitheliale Marker E-Cadherin herunterreguliert und die Expression der mesenchymalen Marker wie Vimentin, N-Cadherin und BGN (siehe oben) hochreguliert (Bhowmick *et al.*, 2001; Oft *et al.*, 1996, Ellenrieder *et al.*, 2001a; Ellenrieder *et al.*, 2001b; Derynck *et al.*, 2001). Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT ist häufig mit einer erhöhten Migration und Invasivität der Tumorzellen verbunden (Bhowmick *et al.*, 2001; Ellenrieder *et al.*, 2001a; Ellenrieder *et al.*, 2001b) und wird als essentiell für den Prozess der Metastasierung angesehen.

### 1.7.4 Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf die Tumorumgebung

TGF- $\beta$ 1 beeinflusst u.a. die Umgebung des Tumors und bewirkt Veränderungen, die das Tumorwachstum unterstützen. Durch eine gesteigerte Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP), wie z.B. MMP-2, und des Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA) kommt es lokal zur Degradation der extrazellulären Matrix und der damit verbundenen Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 Molekülen (Derynck *et al.*, 2001, Ellenrieder *et al.*, 2001a). Weiterhin vermittelt TGF- $\beta$ 1 die Neo-Angiogenese u.a. durch eine gesteigerte Expression des pro-angiogenen Faktors VEGF-A („vascular endothelial growth factor“) und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1) (Benckert *et al.*, 2003; Sugano *et al.*, 2003). Durch diese Wirkungen begünstigt TGF- $\beta$ 1 zusätzlich das Tumorwachstum und die Metastasierung.

---

### **1.7.5 Intrazelluläre Signalwege der tumorsupprimierenden und -fördernden Effekte von TGF- $\beta$ 1**

Die Effekte von TGF- $\beta$ 1 werden intrazellulär sowohl über den Smad-Signalweg (siehe oben) als auch über Smad-unabhängige Kinase-Signalwege vermittelt, was letztendlich zu einem komplexen Zusammenspiel zwischen Smad-abhängigen und Smad-unabhängigen Signalwegen führen kann (Derynck und Zhang, 2003; Javelaud und Mauviel, 2005). Eine zentrale Frage besteht darin, inwiefern der Smad-Signalweg an der Tumorsuppression und den tumorfördernden Effekten von TGF- $\beta$ 1 beteiligt ist und wie Veränderungen im Gleichgewicht zwischen TGF- $\beta$ -abhängigem Smad2/3-Signalweg und den MAPK- oder anderen Signalwegen die Tumorsuppression beeinflussen.

Beobachtungen, die hauptsächlich aus Brustkrebszellmodellen stammen, zeigen, dass der Smad2/3-Signalweg, abhängig vom jeweiligen Stadium der Progression der Zellen, sowohl tumorsupprimierende als auch prometastatische Effekte von TGF- $\beta$ 1 vermitteln kann (Tian *et al.*, 2004; Deckers *et al.*, 2006; Kang, 2006). Allerdings wurden entsprechende Studien für das duktales Pankreaskarzinom noch nicht durchgeführt.

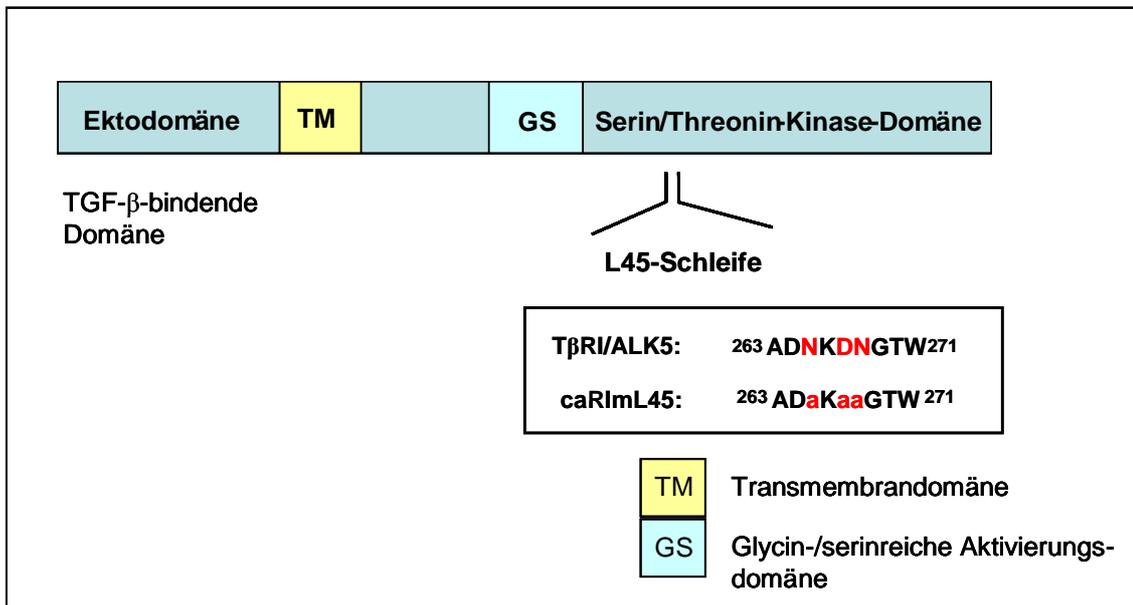
### **1.7.6 Verwendete Mutanten der ALK5-Kinase**

Zur spezifischen Untersuchung der Rolle des Smad-Signalweges bei der durch TGF- $\beta$ 1 vermittelten Tumorsuppression und den prometastatischen Effekten von TGF- $\beta$ 1 können verschiedene Ansätze gewählt werden. Es können z.B. dominant-negative Smad-Mutanten (z.B. Mutante von Smad4) in Transduktionsexperimenten eingesetzt werden, die eine spezifische Hemmung des jeweiligen Smads und damit eine Unterbrechung der Smad-Signalkaskade bewirken. Auch eine Hemmung der Smad-aktivierenden Rezeptoren lässt eine weitere Untersuchung der Bedeutung des Signalweges für die tumorsupprimierende Funktion und des prometastatischen Effektes von TGF- $\beta$ 1 zu.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene konstitutiv-aktive (ca) Mutanten des TGF- $\beta$ -Typ I-Rezeptors ALK5 (ALK5-T204D und RImL45-T202D) für die Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* verwendet, die ihre Effekte ohne Liganden-Bindung vermitteln (Siegel *et al.*, 2003; Muraoka-Cook *et al.*, 2006) (siehe Abb. 6). Die Spezifität der ALK5-Kinase für ein R-Smad ist durch die L45 Schleife zwischen den Kinase-Subdomänen IV und V festgelegt (Feng und Derynck, 1997). Ersetzt man drei L45-Schleifen-AS-Reste

---

durch Alanin (RImL45), wird die Fähigkeit des Rezeptors, mit den Smads zu interagieren und sie zu phosphorylieren, unterdrückt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Domänen des TβRI und der Mutante caRImL45.** Die Spezifität des TβRI für sein R-Smad ist durch die Sequenz in der L45-Schleife festgelegt. Werden die drei Reste der Schleife (N265, D267 und N268) durch Alanin ersetzt, verliert der Rezeptor seine Fähigkeit, Smads zu phosphorylieren. Die Kinase-Aktivität wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Allerdings bleibt die Kinase-Domäne davon unbeeinflusst und der Rezeptor ist weiterhin in der Lage, andere Signalwege, wie z.B. MAPK-Signalwege direkt, also Smad-unabhängig, zu aktivieren. Aus diesem Grund lassen sich mit dieser Mutante Smad-abhängige Effekte von Smad-unabhängigen differenzieren (Itoh *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002; Tian *et al.*; 2004).

### 1.7.7 Ziele

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie der Smad-Signalweg und der p38-MAPK-Signalweg bei der Regulation des kleinen leucinreichen Proteoglykans BGN durch TGF-β1 zusammen wirken. Weiterhin sollten die Effekte der TGF-β-Signalwirkung auf das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und auf ihre Tumorigenität *in vivo* analysiert werden.

- Zunächst sollte die Funktion der ALK5-Kinase bei der Weiterleitung des Signals von TGF-β1 an BGN mit Hilfe verschiedener Rezeptormutanten (siehe u.a.

---

Kap. 1.7.6) untersucht werden. Für die Experimente wurde die Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Panc-1 gewählt, da sie auf TGF- $\beta$ 1-Behandlung mit einer starken Induktion der BGN-mRNA reagiert (Ungefroren *et al.*, 2003)

- b) Basierend auf dem Wissen, dass die Regulation von p38-MAPK durch TGF- $\beta$ 1 integrin- und adhäsions-abhängig ist (Bhowmick *et al.*, 2001), sollte weiterhin untersucht werden, ob die Kontrolle von BGN durch TGF- $\beta$ 1 auch adhäsions-abhängig ist. Da bekannt ist, dass diese Signale hauptsächlich durch die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 vermittelt werden, aber nur Rac1 auch als UE der NAD(P)H-Oxidase fungiert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Rac1 auch an der Induktion von BGN durch TGF- $\beta$ 1 über die Aktivierung von p38 beteiligt sind. Aus diesem Grund sollte die Bedeutung von Rac1 für die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 untersucht werden.
  - c) Ebenso sollte überprüft werden, welche Untereinheiten oder Homologe der neutrophilen NAD(P)H-Oxidase in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 exprimiert werden und ob die ROS-Produktion in diesen Zellen eine Rolle bei der Regulation von BGN spielt.
  - d) Außerdem sollte die Bedeutung der durch TGF- $\beta$ 1 vermittelten Aktivierung der ALK5-Kinase bzw. des Smad-Signalweges für die Tumorprogression von Pankreaskarzinomzellen und die Regulation von metastasierungs-assoziierten Genen in diesen Zellen geklärt werden. Hierzu sollten verschiedene *in vitro* und *in vivo* (SCID-Mausmodell) Experimente durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Mutanten des Rezeptors verwendet (siehe Abb. 6), caALK5 und caRimL45. Die Zelllinie Panc-1 wurde ausgewählt, da sie noch einen intakten TGF- $\beta$ /Smad-Signalweg besitzt und repräsentativ für ein frühes Tumorstadium ist. Außerdem ist diese Zelllinie in Hinblick auf die TGF- $\beta$ 1-Regulation genetisch, phänotypisch und funktionell gut charakterisiert.
-

## 2. MATERIAL

### 2.1 Geräte

Autoklav			Webeco, Bad Schwartau
Brutschrank (Zellkultur)	Hera cell240		Heraeus, Hanau
Brutschrank (Bakterien)			Binder, Tuttlingen
Elektrophoreseapparaturen	Agarose-Gele:	Mini-Sub® Cell GT	BioRad, München
		Sub® Cell GT	BioRad, München
	Polyacrylamid-Gele:	Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell	BioRad, München
Elektroelutionskammer	Elutrap Electroelution Systems		Schleicher u. Schüll, Dassel
Kühlzentrifugen	Multifuge 3 S-R (Rotor: #75006445)		Heraeus, Hanau
Küvetten	Quarzküvetten (10 mm)		BioRad, München
Eismaschine Scotsman			Fisher Scientific, Nidderau
Gefrier-/Kühlschränke	-80°C, -20°C, 4°C		Liebherr, Heraeus
Harvester			Wallac, Turku, Finnland
Kippschüttler	Duomax 1030		Heidolph, Kehlheim
Luminometer			Promega, Heidelberg
Magnetrührer Monotherm	Variomag® Electronicrührer		Merck, Darmstadt
Mikroskope	Lichtmikroskop:	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
	Fluoreszenzmikroskop:	Axioskop 40	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplattenphotometer	OpsysMR		ThermoLabsystems, Frankfurt
Mikrowelle			Bosch
Spannungsquellen	PowerPack 300		BioRad, München
VORTEX Genie 2			Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
PCR-Cycler	MyCycler™ thermal cycler		BioRad, München
	Micro Cycler E		Eppendorf, Hamburg
	Icycler IQ		BioRad, München
Pipettierhilfe	Pipetus-akku		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
pH-Meter	Level1		inoLab (WTW), Wertheim
Photometer	Smart Spec™ 3000		BioRad, München

Pipetten (0,2-2,5µl, 20µl, 200µl, 1000µl)			Gilson, Eppendorf
Rotator (Test Tube Rotator)			Kisker GbR, Steinfurt
Röntgenfilmentwicklungsautomat			Agfa, Köln
Schüttelinkubator	Orbital Incubator S150		Stuart Scientific, GB
Sterilbank	HeraSafe KS 12		Heraeus, Hanau
Stickstofftank	Biosafe® MD		Messer, Griesheim
Tischzentrifuge	Biofuge pico (Rotor #3328)		Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge/Kühlzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3328)		Heraeus, Hanau
Transferkammer WB	Mini Tans-Blot Cell Kühlelement		BioRand, München BioRand, München
Thermomixer	(1,5 ml) comfort  (2 ml) comfort		Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	UVT 204		Herolab, Wiesloch
Waagen	Analysenwaage:	CP 124 S	Satorius, Göttingen
	Laborwaage:	CP 2201	Satorius, Göttingen
Wasserbad	W12		Medigen, Dresden

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Bakterien-Inkubationsröhrchen (14 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmalspritzen (1ml, 50 ml)	Alaris Ivac, Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen (1 ml, 1,8 ml)	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen	Sarstedt, Nürmbrecht
Gestopfte Pipetten-Spitzen (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
PVDF-Membran: Immobilon-P, 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Skalpelle	Feather, pfm, Köln
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße), Sterile Acrodisc Syringe Filters (0,45 µm Porengröße)	Sarstedt, Nürmbrecht, Pall Life Sciences
3 MM Whatman Papier	Schleicher u. Schüll, Dassel
15 ml und 50 ml Zentrifugen-Röhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nürmbrecht
96- Well-, 24-Well-, 6-Well-Platten (Mikrotiterplatten)	Nunc, Wiesbaden; Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturplatten mit Fibronectin- und poly-D-Lysin-Beschichtung	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2.3 Sonstiges

Einfrierbox	Nalgene™, München
Filmkassette	Appligene, Heidelberg
Glasgefäße	Schott Duran, Mainz
Neubauerzählkammer	Superior, Marienfeld

## 2.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg).

---

Ampicillin, Cytocholasin D, Polybrene (1,5-dimethyl-1,5-Diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide)	
DPI (Diphenylenidodoniumchlorid)	Sigma-Aldrich
Rac1-Inhibitor	Merck
Geneticin (G-418), Puromycin	Invitrogen
H <sub>2</sub> O ad injectabilia	Braun, Melsungen
Protein A-Agarose, Protein G-Plus-Agarose	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
SB431542	Tocris, Ellisville, MO
TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden

---

## 2.5 Kits

---

BCA <sup>TM</sup> Proteinassay	Pierce, Rockford, IL
Dual-Luciferase-Reporter-Assay- Systems	Promega, Heidelberg
ECL/ECL plus Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences, Freiburg
EZ4U Test	Biomedica, Wien, Österreich
Mercury Pathway Profiling Luciferase System 4	BD Biosciences, Clontech, Heidelberg
Rac1-Activationkit	Stressgen, Biomol, Hamburg
IQTM Sybr® Green Supermix	Bio Rad, München
Qiagen Plasmid-Mini-Kit	Qiagen, Hilden

---

## 2.6 Standards

---

Bench Mark <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Marker	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb Marker	MBI Fermentas, Sant Leon-Rot
Marker VIII	Roche Diagn., Mannheim

---

## 2.7 Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper und Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle/Firma	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>		
Ratte-anti-Maus-CD31/PECAM-1 (MEC13.3)	BD Pharmingen, Hamburg	1:50
Maus-anti-Rac1, monoklonal	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:1000
Maus-anti-p38 MAPK, monoklonal	Cell Signaling Techn., Heidelberg	1:1000
Kaninchen-anti-phospho-p38 MAPK, polyklonal	Cell Signaling Techn., Heidelberg	1:1000
Kaninchen-anti-phospho-Smad2, polyklonal	Cell Signaling Techn., Heidelberg	1:1000
Maus-anti-phospho-Erk (E-4)	Santa Cruz	1:200
Maus-anti-ERK2 (D2)	Santa Cruz	1:200
Maus-anti-Myc-tag (9B11), monoklonal	Cell Signaling Techn., Heidelberg	1:1000
Maus-anti-Maus-Ki-67 (MIB-1), monoklonal	Dianova, Hamburg	1:50
Maus-anti-human-p27 <sup>KIP1</sup> , monoklonal	DAKO, Glostrup, Dänemark	1:250
Kaninchen-anti-Smad2	Zymed Laboratories Inc, Berlin	1:250
Kaninchen-anti-phospho-Smad3	Biosource, Nivelles, Belgien	1:1000
Ziege-anti-Smad3 (I-20), polyklonal	Santa Cruz Biotech., Heidelberg	1:1:200
Maus-anti-β-Aktin (AC-15), monoklonal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1:10000
Maus-anti-FLAG (M2), monoklonal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1:1000
Kaninchen-anti-TβRII (L-21), polyklonal	Santa Cruz Biotech., Heidelberg	1:200
Kaninchen-anti-ALK5 (V-22), polyklonal	Santa Cruz Biotech., Heidelberg	1:200, 1:100
Maus-anti-HA (12CA5), monoklonal	Roche Diagn., Mannheim	1:400
<b>Sekundärantikörper</b>		
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Amersham Biosciences, Freiburg	1:5000
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter anti-Maus IgG	Amersham Biosciences, Freiburg	1:7500
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter anti-Ziege	Amersham Biosciences, Freiburg	1:5000

## 2.8 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Aktivität/Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
Restriktionsenzyme:		
<i>Bam</i> HI	10 U/μl	MBI Fermentas, Sant Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	10 U/μl	MBI Fermentas, Sant Leon-Rot
<i>Eco</i> RV	10 U/μl	Boehringer Mannheim, Mannheim
<i>Pvu</i> I	10 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Sal</i> I	10 U/μl	MBI Fermentas, Sant Leon-Rot
<i>Xho</i> I	10 U/μl	MBI Fermentas, Sant Leon-Rot
Weitere Enzyme:		
Pfu-Turbo-Polymerase	2,5 U/μl	Stratagene, Heidelberg
RNase A	100 mg/ml	Qiagen, Hilden
SuperScript™ II Rnase H-Reverse Transkriptase	200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	5 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	2000 U/μl	NEB, Schwabach

## 2.9 Vektoren

Name	Herkunft
pcDNA3	Invitrogen , Karlsruhe (Map: <a href="http://invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.pdf">http://invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3.pdf</a> )
TJBA5bMoLink- neo (TJM)	Geschenk von BD Howard (Howard <i>et al.</i> , 2000)
pBABE-puro	Stefan Ludwig, Universität Düsseldorf

### 2.9.1 Rekombinante Plasmide

rekombinantes Plasmid	Herkunft
pRac1-T17N-cDNA3	K. Giehl, Universität Ulm
pRK5F-Myc-Rac1-Q61L	G.M. Bokoch, Scripps Clinic, San Diego, CA
pFLAG-p38-cDNA3	S. Ludwig, Universität Münster
pFLAG-Smad2-pcDNA3	K. Miyazono The Cancer Institute, Tokyo, Japan
pHA-caALK5-pcDNA3	Dr. J. Massague´, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York
pHA-caRimL45-pcDNA3	Yu et al., 2002
p6SBE-Luc	Scott Kern, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD
pRL-TK	Promega, Heidelberg
pMYC-TA-Luc	BD Biosciences, Clontech, Heidelberg
pSmad7-Luc	V. Ellenrieder, Universität Ulm

## 2.10 Oligonukleotide

Die Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
β-Aktin-forward	5'-GACGAGGCCAGAGCAAGAG-3'
β -Aktin-reverse	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'
BGN-sense (nt 124-143)	5'-CCCTCTCCAGGTCCATCCGC-3'
BGN-antisense (nt 623-604)	5'-GAGCTGGGTAGGTTGGGCGGG-3'
E-Cadherin-sense	5'-TCTTCCCCGCCCTGCCAATC-3'
E-Cadherin-antisense	5'-GCCTCTCTCGAGTCCCCTAG-3'
GAPDH-sense	5'-GGCGTCTTACCACCATGGAG-3'
GAPDH-antisense	5'-AAGTTGTCATGGATGACCTTGGC-3'
N-Cadherin-sense	5'-GTGCCATTAGCCAAGGGAATTC-3'
N-Cadherin-antisense	5'-CCTGTTCCACTCATAGGAGG-3'
MMP-2-sense	5'-CACCTGGAGCGAGGGTAC-3'
MMP-2-antisense	5'-CTGATTAGCTGTAGAGCTGAAGGC-3'
Nox1 forward	5'-ACAAATTCAGTGTGCAGACCAC-3'
Nox1 reverse	5'-AGACTGGAATATCGGTGACAGCA-3'
Nox2 forward	5'-GGGCTGTTCAATGCTTGTGGCT-3'
Nox2 reverse	5'-ACATCTTCTCCTCATCATGGTGC-3'

---

Nox3 forward	5'-ATGAACACCTCTGGGGTCAGCTGA-3'
Nox3 reverse	5'-GGATCGGAGTCACTCCCTTCGCTG-3'
Nox4 forward	5'-CTCAGCGGAATCAATCAGCTGTG-3'
Nox4 reverse	5'-AGAGGAACACGACAATCAGCCTTAG-3'
Nox5 forward	5'-ATCAAGCGGCCCTTTTTTTCAC-3'
Nox5 reverse	5'-CTCATTGTACACTCCTCGACAGC-3'
p22 <sup>phox</sup> forward	5'-GTGTTTGTGTGCCTGCTGGAGT-3'
p22 <sup>phox</sup> reverse	5'-CTGGGCGGCTGCTTGATGGT-3'
p47 <sup>phox</sup> forward	5'-GTACCCAGCCAGCACTATGTGT-3'
p47 <sup>phox</sup> reverse	5'-AAAGTAGCCTGTGACGTCGTCT-3'
p67 <sup>phox</sup> forward	5'-TTCGAGGGAACCAGCTGATAGA-3'
p67 <sup>phox</sup> reverse	5'-GCATGGGAACACTGAGCTTCAC-3'
PAI-1-sense (nt 357-378)	5'-CTTCTTCAGGCTGTTCCGGAGC-3'
PAI-1-antisense (nt 1164-1143)	5'-GGGTCAGGGTCCATCACTTGG-3'
PAI-1-Hybrid-sense	5'-CTTCTTCAGGCTGTTCCGGAGCCCACAAA TCAGACGGCAGCACTG-3'
Rac1- forward	5'-ACCATGCAGGCCATCAAGTGTGTGG-3'
Rac1- reverse	5'-TTACAACAGCAGGCATTTTCTCTTC-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
TATA-box binding protein forward	5'-GCTGGCCCATAGTGATCTTT-3'
TATA-box binding protein reverse	5'-CTTACACGCCAAGAAACAG-3'
TSP-1-forward	5'-CAATCCGGATCAGCTGGACTC-3'
TSP-1-reverse (Genbank: X14787)	5'-TGATGATTAGGGATCTCTACATTCG-3'
uPA-sense	5'-ACACGCAAGGGGAGATGAAGTTT-3'
uPA-antisense	5'-TCGAGGGCAGGCAGATGGT-3'
VEGF-A-forward	5'-CATGAACTTTCTGCTGTCTTGG-3'
VEGF-A-reverse (Genbank: X62568)	5'-CCTGGTGAGAGATCTGGTTCC-3'
Vimnetin-sense	5'-TGGCACGTCTTGACCTTGAA-3'
Vimentin-antisense	5'-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3'

---

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer kann nach einer empirischen Formel abgeschätzt werden:

$$T_m = 81,5 [^\circ\text{C}] + 16,6 \times \log (M[\text{NaCl}]) + 0,41 \times (\% \text{G+C}) - (550/\text{bp})$$

wobei: NaCl-Konzentration [M]

% G + C: Anteil der Basen Guanin und Cytosin in Prozent

bp: Anzahl der Basen im Oligonukleotid

---

## 2.11 Zellmaterial

### 2.11.1 Zelllinien

Die nachfolgenden Zelllinien (siehe Tab. 3) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit für Transfektions- oder Transduktionsexperimente und zur Gewinnung von Nukleinsäuren und Proteinextrakten verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Zelllinien**

Name der Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
Panc-1	Pankreaskarzinom	American Type Culture Collection
SW48	Kolonkarzinom	Gabe v. M.Löhr (Universität Mannheim)
HEK 293T	Embryonale Nierenzellen, exprimieren das „large-T“-Antigen des SV40-Virus	Prof. H. Kalthoff (Molekulare Onkologie, UK-SH, Kiel)

### 2.11.2 Stabil transduzierte Zellen

Folgende schon zuvor mit verschiedenen retroviralen Vektoren stabil transduzierte Zellen fanden in dieser Arbeit für unterschiedliche Experimente Verwendung:

- Panc-1-FLAG-caRI<sub>m</sub>L45-TJM
- Panc-1-HA-dnT $\beta$ RII-TJM
- Panc-1-HA-caALK5-TJM
- Panc-1-HA-kdALK5-TJM

Diese stabil exprimierenden Zellen sind freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ungefroren zur Verfügung gestellt worden.

### 2.11.3 Bakterienstamm

*E. coli* (ONE SHOT TOP 10F')

Invitrogen, Karlsruhe

**Genotyp:**

F- {lac<sup>f</sup>, Tn10(Tet<sup>R</sup>)} mrcA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80dlacZ  $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rspL endA1 nupG

## 2.12 Medien

### 2.12.1 Medium zur Anzucht von prokaryotischen Zellen:

---

<b>Pulver für LB-Medium:</b>	Luria Bertani broth, LABM, IDG
beeinhaltet: 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren	
<b>Pulver für Agarnährboden:</b>	LABM, IDG
beeinhaltet: 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl, 15 g Agar auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren	

---

Für die Bakterienanzucht wurden Agarnährböden benötigt. Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zum Agar hinzugefügt, der dann in Petrischalen gegossen, bei Raumtemperatur zum Abkühlen stehen gelassen und anschließend bei 4°C lichtgeschützt gelagert wurde.

### 2.12.2 Zellkulturmedium und Lösungen zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

---

<b>PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup></b>	Cambrex, Verviers, Belgien
<b>PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung):</b>	
123 mM NaCl	
17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
2,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
pH 7,0	
<b>RPMI-1640 Medium</b>	Cambrex, Verviers, Belgien
+ 25 mM HEPES, + L-Glutamine	
<b>DMEM:</b>	Cambrex
+ 4,5 g/l Glukose, ohne L-Glutamin	
<b>Zusätze:</b>	
50 ml FCS (10%, v/v)	Invitrogen, Karlsruhe
5 ml 200 mM L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
5 ml 100 mM Na-Pyruvat	Sigma-Adrich
5 ml Penicillin/Streptomycin (PEN/STREP)	Invitrogen, Karlsruhe
(10000 U/ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin)	

---

---

Bei DMEM zusätzlich:

5 ml Nonessential amino acids     Invitrogen, Karlsruhe  
(NEAA)

**Trypsin/EDTA-Lösung**     Invitrogen, Karlsruhe  
(0,5% Trypsin/0,2% EDTA) in PBS

---

## 2.13 Software

---

Axio Vision 3.1	Zeiss, Jena
Revelation Quicklink Version 4.04	DYNEX Techn.
NIH Image Software Version 1.62	NIMH, Bethesda, USA

---

## 2.14 Internet-Ressourcen

---

Pub Med	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a> (Literaturrecherche)
Gen Bank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

---

## 3. Methoden

### 3.1 Zellbiologische Verfahren

#### 3.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich passagiert.

Jeden zweiten bis dritten Tag wurde nach einmaligem Spülen mit sterilem PBS das Medium (RPMI 1640; Zusätze: 10% (v/v) FCS, 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml 100 mM Na-Pyruvat; 5 ml PEN/STREP, DMEM; Zusätze: wie bei RPMI und 5 ml NEAA) gewechselt. Dieses diente der Neuversorgung der Zellen mit Nährstoffen sowie dem Entfernen toter Zellen. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-90% wurde das Medium entfernt und der verbleibende Zellrasen mit sterilem PBS gespült. Nach dem Spülen wurden die Zellen für 3-5 min mit 50 µl bis 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5% Trypsin/0,2% EDTA) (96-well-Platten bis T-125 Flaschen) in PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) bei 37°C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Untergrund wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von RPMI-Medium mit 10% FCS gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und die erhaltene Suspension ggf. einer Zellzahlbestimmung unterzogen. Zur weiteren Kultivierung der Zellen fand eine Verdünnung der Zellsuspension mit RPMI-Medium und eine Verteilung der Suspension auf neue Kulturflaschen statt. Mit retroviralen Expressionsvektoren transduzierte Zellen wurden in Gegenwart des jeweiligen Antibiotikums kultiviert (siehe Tab. 4).

**Tabelle 4: Retrovirale Vektoren und das jeweilige Antibiotikum**

Zelllinie	Vektor-Konstrukt	Antibiotikum	Aktive Konzentration
Panc-1	TJM	Geneticin	700 µg/ml
	pBABEpuro	Puromycin	2,5 µg/ml
	pcDNA3	Geneticin	700 µg/ml

Die Zugabe der pharmakologischen Inhibitoren und anderer Chemikalien (siehe Tab. 5) erfolgte 30 min - 1 h vor der TGF-β1-Behandlung der Zellen. In allen Experimenten betrug die TGF-β1-Konzentration 5 ng/ml.

**Tabelle 5: Inhibitoren**

<b>Inhibitoren/Chemikalien</b>	<b>Eingesetzte Konzentrationen</b>
Apocynin (in DMSO)	1 mM
Ascorbinsäure (in ddH <sub>2</sub> O)	1 mM
Cytochalasin D (in DMSO)	1 µM, 10 µM
DPI (in DMSO)	1 µM, 10 µM
NAC (in ddH <sub>2</sub> O)	10 mM, 50 mM
PDTC (in DMSO)	50 µM
Rac1-Inhibitor (in ddH <sub>2</sub> O)	50 µM
SB431542 (in DMSO)	1 µM, 5 µM
S-M-Sulfat (in ddH <sub>2</sub> O)	10 µM
Tiron (in ddH <sub>2</sub> O)	10 mM, 100 mM

In einigen Experimenten wurden Zellen in 3,5 cm-Schalen mit Fibronectin und poly-D-Lysin-Beschichtung (BD) oder in 10 cm bzw. 3,5 cm Schalen mit Agarosebeschichtung ausgesät. Die Lösung für die Agarosebeschichtung bestand aus einem Gemisch von 31 mg/ml Agarose und RPMI 1640 (ohne Zusätze, vorgewärmt auf 37°C) in einem Verhältnis von 1:3.

### 3.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Um für einen Versuchsansatz eine definierte Zellzahl pro Kulturschale/Well zu erhalten, wurden die Zellen nach dem Abstoppen der Trypsinreaktion in 50 ml Röhren überführt, bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert (Multifuge S-R, Heraeus, Rotor: #75006445), das Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und dann in 5 ml Medium resuspendiert. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines Hämatozytometers (Neubauer-Zählkammer). Damit eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich war, erfolgte eine Entnahme von 100 µl der Zellsuspension, welche im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau (0,4%) verdünnt wurde. Trypanblau färbt tote Zellen blau, in lebende Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen. Es wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes jeweils 4 Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert berechnet und mit dem Verdünnungsfaktor und  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro 1 ml zu erhalten. Es fanden Doppelbestimmungen statt. Durch mehrmaliges Aufziehen und Auslassen mit einer Pipette war die homogene Verteilung der Zellen gewährleistet. Anschließend wurden die Zellen auf die Wells der jeweiligen Platte verteilt.

### 3.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Konfluente Zelllinien wurden trypsiniert, im jeweiligen Medium aufgenommen, pelletiert, in 1-1,8 ml FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallbildung innerhalb der Zellen verhindert, aufgenommen und je 1 oder 1,8 ml in Nunc-Kryo-Röhrchen überführt. Danach erfolgte eine Lagerung der Röhrchen bei -80°C.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell, indem man die Röhrchen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführte. Der Inhalt jedes Röhrchens wurde in 5 ml 37°C warmes Medium gegeben und 5 min bei 1200 rpm (Multifuge S-R, Rotor #75006445) zentrifugiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 5 ml 37°C warmem Medium, mit anschließender Überführung in eine kleine Kulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (T-25 Flasche). Nach 12-24 h wurden die Kulturflaschen zur Entfernung toter Zellen mit PBS gewaschen und erneut mit Medium befüllt.

### 3.1.4 Zellproliferationsassay Easy For You (EZ4U)

Kit-Komponenten: Substrat (lyophilisiert), Aktivatorlösung

Bei dem Test EZ4U handelt es sich um einen nicht radioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest, welcher an den Thymidin-Standardtest anlehnt (EZ4U- Firmenschrift der Biomedica-Gesellschaft). Er orientiert sich an dem klassischen MTT-Test.

Der EZ4U-Test verwendet Tetrazoliumsalze als Indikatoren für die Zellvitalität. Die Testmethode beruht auf der Umwandlung von schwach gefärbten oder farblosen nicht toxischen Tetrazoliumsalzen in intensiv gefärbte Formazanderivate bei Zellen mit intakten Mitochondrien. Die Umwandlung in Formazanderivate lässt sich im Photometer quantifizieren. In diesem Fall diente der EZ4U-Test zur Messung von Unterschieden in der Proliferationsgeschwindigkeit von Panc-1 Zellen, die stabil mit unterschiedlichen Mutanten des TβRI transduziert waren.

Es erfolgte die Aussaat von  $2 \times 10^3$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte. Insgesamt wurden vier 96-Well-Platten mit Zellen beschickt, da die Messung der Proliferation alle zwei Tage, insgesamt über sechs Tage erfolgte. Für jeden Klon wurde eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Am jeweiligen Tag der Messung wurde das Substrat des EZ4U-Kits in 2,5 ml Aktivatorlösung aufgelöst und 10 µl der Lösung zu 100 µl Zellkultur pro Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C im

---

Brutschrank wurde die Platte kurz geschüttelt und anschließend die Absorption bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (OpsysMR) gemessen (620 nm diente als Referenzwellenlänge).

Die Absorption eines Blindwertes (Substrat ohne Zellen) wurde von den Messwerten abgezogen.

## 3.2 Isolierung und Analyse von Proteinen

### 3.2.1 Gewinnung von Gesamtprotein mittels 1x SDS-Puffer

---

<b>1 x SDS Probenpuffer:</b>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
	2% SDS
	10% Glycerin
	1M DTT
	1M NaF
	0,01% Bromphenolblau
	auf 20 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

---

Bei Erreichen einer Konfluenz von mindestens 80% wurden die Zellen in den jeweiligen Wells oder Kulturflaschen mit PBS gewaschen, in 50 µl (24-Well) bis 350 µl (T-75) 1x SDS-Puffer lysiert und die Lysate in 1,5 ml Gefäße überführt. Vor Verwendung der Lysate für die Westernblot-Analyse (siehe Kap. 3.2.7) erfolgte eine Ultraschallbehandlung, um die DNA zu scheren. Nach anschließender Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 4 min) wurde die benötigte Lysat-Menge entnommen und die Proteine wurden durch das anschließende Erhitzen auf 100°C für 5 min denaturiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 3.2.2 Proteinisolierung mittels RIPA-Puffer

---

<b>RIPA-Puffer:</b>	0,1% SDS
(radioimmuno-	1% NP-40
precipitation buffer)	0,5% Na-deoxycholat
	+ 1 Complete-Tablette (Protease-Inhibitor-Cocktail)
	auf 50 ml mit PBS auffüllen

---

Die jeweiligen Zellen wurden trypsiniert, pelletiert und mit PBS gewaschen. Nach erfolgter Zentrifugation bei 4°C (13000 rpm, 4 min, Biofuge fresco) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 120 µl bzw. 1 ml (6 Well bzw. 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) eiskaltem RIPA-Puffer lysiert. Für die Detektion von ALK5 in den

---

isolierten Tumorgeweben mittels Westernblot-Analyse (siehe Kap. 3.2.7) erfolgte die Herstellung von 20 µm Kryo-Schnitten mit anschließender Lyse des Gewebes in 200-400 µl RIPA-Puffer. Nach einer 15-minütigen Inkubation der Lysate auf Eis wurden die Lysate für 30 min bei -80°C gelagert.

Nach langsamem Auftauen auf Eis wurden die Lysate geschüttelt und dann bei 4°C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand wurde in ein 1,5 ml Gefäß überführt und entweder bei -20°C gelagert oder einer Proteinkonzentrationsbestimmung unterzogen.

### 3.2.3 Proteinisolierung mittels IP-Puffer (Immunpräzipitations-Puffer)

---

**IP-Puffer:**

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
1% Triton-X-100  
2,5 mM Na-Pyrophosphat  
1 mM β-Glycerolphosphat  
50 mM NaF 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Natrium-Orthovanadat)  
+4 Complete-Tabletten (Protease-Inhibitor-Cocktail)  
auf 200 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

---

Die jeweiligen Zellen in den Wells oder in der Kulturflasche wurden mit PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 50 µl–1 ml (24-Well- T-75) Puffer auf Eis für 15 min lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie in Kap. 3.2.2 beschrieben. Die Proteinlösung wurde einer Konzentrationsbestimmung unterzogen und für eine Immunpräzipitation (100-200 µg) verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde für die Immunpräzipitationen (siehe Kap. 3.2.5) und die Westernblot-Analysen (siehe Kap. 3.2.7) benötigt. Um äquivalente Proteinmengen einsetzen zu können, erfolgte eine

---

Verdünnung der Lysate mit RIPA-Lysispuffer oder IP-Puffer auf eine einheitliche Konzentration (1:10). Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard zur Erstellung einer Eichkurve.

Die verdünnten Proben wurden als Doppelwerte zu je 20 µl in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Als Eichkurve diente eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen von 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 und 0.0156 mg/ml in RIPA-Puffer oder IP-Puffer. Zu den verdünnten Proben und der Verdünnungsreihe kamen 200 µl der Reagenzien A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, BCA und Natriumtartrate in 0,1 N NaOH) und B (4% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) aus dem Kit im Verhältnis von 50:1 hinzu. Anschließend erfolgte eine Inkubation der 96-Well-Platte für 60 min bei 60°C. Die Extinktionen der Proben wurden bei 560 nm photometrisch bestimmt. Anhand der Eichkurve konnten die Proteinkonzentrationen der Proben mit Hilfe der Software Revelation Quicklink Version 4.04 (DYNEX) berechnet werden.

### **3.2.5 Immunpräzipitation**

Proteine konnten aus Zelllysaten mittels der entsprechenden Antikörper (anti-FLAG, anti-HA oder anti-Myc, siehe Tab. 2) sowie der zugehörigen Protein-Sepharose immunpräzipitiert werden.

100-200 µg der mittels IP-Puffer (siehe Kap. 3.2.3) hergestellten Zelllysate wurden dazu mit dem IP-Puffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 0,2-2 µg des jeweiligen primären Antikörpers versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Ansätze für 1-2 h bei 4°C auf dem Rotator und nach Zugabe von 20 µl des jeweiligen Agarose-Konjugats (Protein G Plus-Agarose, Protein A/G Plus-Agarose oder Protein A-Agarose) eine weitere Inkubation von 1-2 h. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation der Ansätze bei 4°C (3500 rpm; Biofuge fresco) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl PBS gewaschen. Insgesamt erfolgten vier Waschschrte, wobei das letzte Mal mit 500 µl IP-Puffer (stringenter) gewaschen wurde. Nach quantitativer Entfernung des Überstandes und Aufnahme des Pellets in 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer erfolgte für 5 min eine Denaturierung bei 100°C. Die Proben konnten nun mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.2.6) und anschließender WB-Analyse (siehe Kap. 3.2.7) untersucht werden.

### 3.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

---

<b>Puffer:</b>	
<b>Sammelgel:</b>	0,334 ml Acrylamidlösung (30%) 0,25 ml 0,5M Tris pH 6,8 (HCl) 0,02 ml 10 % (w/w) SDS 0,02 ml 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat (APS) 1,4 ml H <sub>2</sub> O 2 µl TEMED
<b>Trenngel (10%ig):</b>	2 ml Acrylamidlösung (30%ig) 2,24 ml 1,5 M Tris pH 8,8 (HCl) 0,060 ml 10% (w/w) SDS 0,040 ml 10% (w/w) APS 1,74 ml H <sub>2</sub> O 4 µl TEMED
<b>10 x SDS PAGE-Laufpuffer:</b>	Roth, Karlsruhe 1% (g/v) SDS; 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin
<b>2 x SDS Probenpuffer:</b>	125 mM Tris-HCl (pH6,8)
(Lämmli-Puffer)	100 mM DTT 4% SDS 0,02% Bromphenolblau 20% Glycerin

---

Die analytische Gelelektrophorese von Proteinen erfolgte mit selbstgegossenen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurde die Elektrophoresekammer (Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad) mit 1 x SDS PAGE Laufpuffer gefüllt. 20-30 µl der Zellysate oder 20 µl der Immunpräzipitate, die zuvor für 5 min auf 100°C erhitzt wurden, konnten nun auf das Gel aufgetragen werden. Von den mittels RIPA- oder IP-Puffer isolierten Proteinen wurden 10-20 µg mit 1 x Lämmli-Puffer versetzt, denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichts-Marker diente der BenchMark von Invitrogen. Zu Beginn erfolgte die Elektrophorese bei 20 mA. Nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht. Nach dem Austreten der Bromphenolblau-Bande aus dem Gel war das Ende der Elektrophorese erreicht.

---

### 3.2.7 Westernblot (WB)-Analyse (Elektroblot)

---

**Puffer:**

**10 x PBS (PBS Dulbecco)**

Biochrom AG

(Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

200 ml Tris 1M , pH 7,5

81,82 g NaCl (1,4 M)

ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

**Transfer/Blotting-Buffer:**

500 ml Methanol (100%)

0,025 M Tris (Trizma Base)

0,2 M Glycin

auf 2,5 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

---

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore). Die PVDF-Membran und das Whatman-Papier wurden auf die benötigte Größe zugeschnitten, die Membran in Methanol aktiviert und mit Transfer-Puffer äquilibriert.

Für den Transfer, der für 120 min unter konstantem Stromfluss bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche und Kühlung mittels Eiswassers erfolgte, wurde das Mini Trans-Blot Transfer Cell-System (Bio-Rad, München) verwendet.

#### ***Immunfärbung***

Nach dem Blocken proteinfreier Membranareale durch Inkubation mit einer Blocklösung (PBS-T-Puffer mit 5% fettfreiem Milchpulver; mindestens 1 h bei RT) erfolgte eine Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C oder für 1-2 h bei RT. Die Primärantikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen mit PBS-T (PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20) und 5%igem Milchpulver oder BSA eingesetzt (siehe Tab. 2). Die Membran wurde dreimal 5 min in PBS-T gewaschen und mit dem jeweiligen, an Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper in PBS-T + 5% Milch für 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach drei Waschvorgängen á 5 min, wurden die an die Proteine gebundenen Antikörper durch eine Chemilumineszenz-Reaktion (ECL/ECL plus-Kit, Amersham) detektiert. Hierzu diente ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL), der auf die Membran gelegt, für 10 sec - 1 h belichtet und danach in einer Curix 160-Apparatur (AGFA) entwickelt wurde.

---

### 3.2.8 Rac1-Aktivitäts-Assay

Die Rac1-Aktivierung nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation wurde mit Hilfe des Rac1-Aktivierungskits der Firma Stressgen/Biomol gemessen. Hierbei handelt es sich um ein Affinitäts-Präzipitations-Assay, welcher mit einem GST-Fusionsprotein (beeinhaltet AS 67-152 der p21 activated kinase 1 binding domain (GST-PAK-PBD)) arbeitet. Die am besten charakterisierten Effektorproteine von Rac1 und Cdc42 sind die Mitglieder der PAK Familie von 62-68 kDa großen Serin/Threonin-Kinasen, für die gezeigt wurde, dass sie bevorzugt an die GTP-gebundenen Formen dieser Proteine binden (Zhang *et al.*, 1995; Benard *et al.*, 1999).

Für diesen Assay wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 cm-Schalen auf Plastik ausgesät und am nächsten Tag mit TGF- $\beta$ 1 zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit dem Lysispuffer aus dem Kit. In einigen Experimenten wurden die Zellen vor der Lyse für 24 h in Suspension gehalten. Nach Zentrifugation des Lysats wurden 750  $\mu$ g des Proteinlysats für 2 h auf einem immobilisierten Glutathion-Scheibchen zusammen mit 20  $\mu$ g GST-PAK-PBD unter vorsichtigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem Waschen erfolgten die Elution des gebundenen Rac1 durch heißen ( $\sim 90^\circ\text{C}$ ) Lämmli-Puffer (mit 5% (v/v) 2-Merkaptoethanol) und die Untersuchungen des Eluats mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 3.2.6) und Westernblot-Analyse (anti-Rac1-Antikörper; siehe Kap. 3.2.7). Als Kontrollen wurden 750  $\mu$ g von jedem Lysat mit GTP $\gamma$ S oder GDP für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden auf Eis durch Zugabe von 60 mM MgCl<sub>2</sub> gestoppt und wie zuvor beschrieben weiter bearbeitet.

### 3.2.9 Ponceau-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (Proben aus dem Rac1-Aktivitäts-Assay, siehe Kap. 3.2.8) erfolgte eine Färbung der Membran für 5 min in Ponceau-Rot-Färbelösung (1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt), um die eingesetzten Proteinmengen abschätzen zu können. Anschließend wurde die Membran einige Male mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die angefärbte Membran mit einem Scanner digitalisiert. Nach vollständiger Entfärbung der Membran konnte diese für die Immunfärbungen verwendet werden.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Zelllinien erfolgte mit Hilfe peqGOLD RNAPure™ Reagenz. Das Verfahren basiert auf einer Extraktionsmethode mit einer einphasigen Mischung aus Guanidinthiocyanat und Phenol (Chomczynski und Sacchi, 1987).

Die RNA-Isolierung wurde nach Anweisungen des Herstellers mit RNase-freien Materialien durchgeführt. Die Zellen wurden zur Lyse in peqGOLD RNAPure-Lösung aufgenommen (1 ml pro 3,5 cm Schale). Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und kräftigem Mischen wurden die Proben für 10 min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) trennte sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in eine neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 0,5 ml Isopropanol und bei niedrigen RNA-Konzentrationen 70 µg Glykogen (pro 1 ml peqGOLD) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die gefällte RNA bei 13000 rpm und 4°C für 20 min pelletiert, anschließend zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet, dann in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration spektrofotometrisch bestimmt.

#### 3.3.2 Reverse Transkription

Für den Nachweis der Expression bestimmter Gene auf mRNA-Ebene wurde die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) genutzt. Die PCR (siehe Kap. 3.3.3 bis 3.3.5) erfordert als zu untersuchendes Substrat eine DNA-Matrize. Deshalb wurde eine reverse Transkription durchgeführt, um RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Diese Umschreibung wurde mit dem SuperScript™ II-RNase H-Reverse Transkriptase-Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion wurden jeweils 2-5 µg gesamt-RNA eingesetzt. Die letztendlich erhaltene 20 µl cDNA-Lösung enthielt das Template für die PCR und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

#### 3.3.3 „Standard endpoint“ PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die PCR wurde in Thermocyclern der Firma Bio Rad (MyCycler™ thermal cycler) durchgeführt. Die PCR diente der exponentiellen Amplifikation von spezifischen

---

cDNA-Fragmenten für die Klonierung oder für analytische Zwecke, z.B. semiquantitativen Expressionsanalysen. Als Templates dienten cDNA und isolierte Plasmid-DNA. Für Standard-PCRs wurde die Taq-Polymerase (Invitrogen) verwendet, während für PCRs, deren Amplifikate für Klonierungen genutzt wurden, häufig die Turbo-Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt wurde, da sie eine 3'→5'-Proof-reading-Aktivität besitzt. Der Abschnitt, den die Primer (Ansatzstellen der jeweiligen Polymerase) beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt.

Ein Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA (94°C).
2. Anlagerung (Annealing) der Primer an die Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur
3. Synthese der komplementären DNA-Doppelstränge (Elongation) (72°C).

In der Regel wurden zur spezifischeren Bindung der Primer und zur stärkeren Amplifikation „touch-down“-PCRs (siehe Tab. 6) durchgeführt. In diesem Programm wurde mit einer Annealing-Temperatur begonnen, die 10°C über der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer (siehe Kap. 2.10) lag. Nach jedem dritten Zyklus wurde die Temperatur um 2°C gesenkt, bis die primerspezifische Annealing-Temperatur erreicht war, welche 5-10°C unter der  $T_m$  der Primer liegt (siehe Standardprogramm, Tab. 6). Damit es nicht schon vor der PCR-Reaktion zu einer unspezifischen Bindung der Primer an das Template kommen konnte, wurden die Ansätze (siehe Standardansatz) zunächst für 1 min auf 80°C erhitzt, bevor die Primer (jeweils 10 pmol) und das Template (cDNA, die aus 50-100 ng eingesetzter RNA synthetisiert wurde) zugegeben wurden. Zur Verhinderung der Kondensation wurden die PCR-Ansätze mit Öl überschichtet.

**Tabelle 6: „touch-down“-PCR-Standardprogramm:**

		Zeit	Temperatur
		1 min	80°C
Zugabe von Primern und Template			
	Denaturierung	3 min	95°C
Nach jedem 3.Zyklus wird die Annealing-Temp., die anfänglich 10°C über der primerspezifischen Annealing-Temp. liegt, um 2°C reduziert	Denaturierung	1 min	95°C
	Annealing	1 min	10°C über der primerspezif. Annealing-Temp.
	Elongation	2 min	72°C
30 Zyklen (für semiquantitative Bestimmungen auch weniger, je nach Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens)	Denaturierung	1 min	95°C
	Annealing	1 min	Primer-T <sub>m</sub> -5° bis 10°C
	Elongation	2 min	72°C
	Verl. Elongationsschritt	10 min	72°C
	Kühlen	~	10°C

Reaktionsansatz für analytische Zwecke:

In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden für einen 50 µl-Reaktionsansatz folgende Komponenten pipettiert:

**Standard PCR-Ansatz:**

---

<b>50 µl Ansatz:</b>	5 µl 10x Reaktionspuffer der Polymerase (ohne MgCl <sub>2</sub> ) 1,5 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 5 µl 10 mM dNTPs 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl; Invitrogen) auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O ad injectabilia auffüllen
<b>10 x Puffer:</b>	200 mM Tris-HCl (pH 8,4) 500 mM KCl

---

Die Produkte wurden durch eine Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6) aufgetrennt und sichtbar gemacht.

***Amplifikation der Inserts für die Klonierungen***

Zur Amplifikation der Inserts (Rac1-WT und Rac1-Q61L) für eine anschließende Klonierung wurde die Turbo-Pfu-DNA-Polymerase von Stratagene eingesetzt, da dieses Enzym eine 3'→5'-Proof-reading-Aktivität besitzt.

---

Als Matritze dienten cDNAs von Panc-1 (Rac1-WT) und der Vektor pRK5F-Myc-Rac1-Q61L (Gabe von G.M. Bokoch, siehe Kap. 3.4.2). Für die Amplifikation (PCR-Programm siehe Tab. 7) des DNA-Fragments für Rac1-WT wurden Primer verwendet, die Start- und Stopp-Codon für Rac1 enthielten, so dass der komplette offene Leserahmen amplifiziert werden konnte (siehe Kap. 2.10). Nach Gelelektroelution der Amplifikate (siehe Kap. 3.3.7) erfolgte eine „blunt-end“-Klonierung (siehe Kap. 3.4) in die multiple Klonierungstelle des Vektors pcDNA3 (siehe Kap. 2.12), der zuvor mit *EcoRV* (siehe Kap. 2.12.1) geschnitten worden war. Durch Zugabe von *EcoRV* (1 U) in die Ligationreaktion wurde sichergestellt, dass immer genügend Vektormoleküle zur Ligation (siehe Kap. 3.4.2) mit dem Insert vorhanden waren.

Im Fall von Rac1-Q61L wurde auch eine „blunt-end“-Klonierung durchgeführt. Als Template für Rac1-Q61L diente das Plasmid pRK5F-Myc-Rac1-Q61L. Die Amplifikation von Myc-Rac1-Q61L erfolgte mittels MYC-Primer und dem Rac1-revers-Primer (siehe Kap. 2.10). Nach Elektroelution (siehe Kap. 3.3.7) der Amplifikate erfolgte auch hier die Ligation des Inserts in den mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pcDNA3.

#### Reaktionsansatz:

---

<b>50 µl Ansatz:</b>	50-100 ng Template (cDNA) 5 µl 10 x Puffer 10 pmol Primer I 10 pmol Primer II 5 µl 10 mM dNTPs 1 µl Pfu-Turbo Polymerase (2,5 U/µl; Stratagene) auf 50 µl mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
<b>10 x Puffer:</b>	200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C) 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> , 1.0% Triton® X-100 1mg/ml Nuklease-freies BSA.

---

Tabelle 7: PCR-Programm für die Pfu-Turbo-Polymerase

		Zeit	Temperatur
	Denaturierung	2 min	95°C
30 Wiederholungen (je nach Expressionsstärke des Gens)	Denaturierung	30 sec	95°C
	Annealing	30 sec	T <sub>m</sub> - 5°C
	Elongation	1 min für Fragmente ≤1 kb 1 min pro kb für Fragmente > 1 kb	72°C
	Verl. Elongationsschritt	10 min	72°C
	Kühlen	~	10°C

### 3.3.4 „Real-time“-RT-PCR

Die Messungen wurden mit dem iCycler IQ von Bio Rad durchgeführt. Die „Real-time“-PCR dient der quantitativen Expressions-Analyse von Genen. Dabei wird die unterschiedliche Emission von freiem und an DNA gebundenem Sybr-Green (IQ<sup>TM</sup> Sybr® Green Supermix, Bio Rad) ausgenutzt. Bei der Elongation lagert sich kontinuierlich SYBR Green in die kleine Furche der dsDNA ein, wodurch die Gesamt-Fluoreszenz-Intensität ansteigt. Die Fluoreszenz-Messung am Ende jedes Zyklus der PCR dokumentiert den Mengenzuwachs an amplifizierter DNA. Je mehr cDNA in der Probe vorliegt, desto weniger Zyklen sind nötig, bis sich das Fluoreszenzsignal statistisch signifikant vom Hintergrund abhebt und ein bestimmter Amplifikations-Schwellenwert C<sub>t</sub> erreicht wird (Gibson *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1999). Da die DNA während der exponentiellen Phase der PCR, in der keine limitierenden Reaktionskomponenten vorliegen, quantifiziert wird, kann im Gegensatz zu anderen Verfahren eine wesentlich höhere Präzision erzielt werden. Zum Ausgleich von Ungenauigkeiten, die durch Pipettierfehler entstehen können, wurden Doppel- bis Dreifachbestimmungen durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, wobei die Transkriptmenge eines spezifischen Gens in bestimmten transfizierten/transduzierten Zellen relativ zu den jeweiligen Kontrollen (Leervektor, WT-Zellen) bestimmt wurde. Weiterhin wurden die erhaltenen Werte für die mRNA-Konzentrationen der untersuchten Gene auf die von nicht regulierten Genen („housekeeping-gens“) normalisiert. Als unter den experimentellen Bedingungen nicht regulierte Gene wurden  $\beta$ -Aktin und das „TATA-box binding protein“ gewählt. Am Ende einer Amplifikation

wurde durch den iCycler eine Schmelzkurve der PCR-Produkte erstellt, womit die Spezifität der Reaktion überprüft werden konnte. Bei einer Schmelzkurve wird die Temperatur, beginnend bei 55°C, alle 30 Sekunden um 0,5°C erhöht. Für die Messungen wurde der IQ<sup>TM</sup> Sybr® Green Supermix der Firma Bio Rad verwendet, der die „hot-start“ DNA-Polymerase iTaq enthält. Die Supermixmenge wurde nach Herstellerangaben 1:2 verdünnt und in einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 50-100 ng Gesamt-cDNA (äquivalent zur eingesetzten RNA-Menge) sowie 10 pmol von jedem Primer (siehe Kap. 2.10) eingesetzt und die Reaktion nach dem in Tabelle 8 gezeigten Schema durchgeführt. Die Elongationszeiten sind abhängig von der jeweiligen Größe des zu synthetisierenden Fragments, welche durch die Position der Bindungsstelle für die Primer vorgegeben ist (1000 bp/ Minute).

**Tabelle 8: RT-PCR Standardprogramm**

		<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
		3 min	50°C
	Denaturierung	3 min	95°C
30-50 Wiederholungen	Denaturierung	30 sec	95°C
	Annealing	30 sec	Primerspezifisch : T <sub>m</sub> - 5° bis 10°C
	Elongation	variabel	72°C
	Verl. Elongationsschritt	10 min	72°C
	Schmelzkurve (optional), 80 Wiederholungen	40 min	alle 30 sec + 0,5 °C
	Kühlen	~	10°C

### ***Auswertung der Echt-Zeit-PCR***

Am Ende der PCR-Reaktion ließ sich aus den aufgenommenen Gesamtkurven die sogenannte exponentielle Phase bestimmen, die Phase, in der die Fluoreszenz durch interkalierenden Farbstoff stark ansteigt. Um den Beginn der exponentiellen Phase zu messen, wird häufig der C<sub>t</sub>-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Als Quantifizierungsmethode wurde die sogenannte  $\Delta\Delta C_t$ -Methode gewählt, bei der die Menge eines spezifischen Transkripts (S) in zwei Proben relativ zueinander unter Verwendung der nachfolgenden Formeln bestimmt wurde. Als erster Schritt erfolgt die

Normalisierung der gemessenen  $C_t$ -Werte auf die der „housekeeping“- Gene. Dazu wird zunächst die Differenz der  $C_t$ -Werte ( $\Delta C_t$ ) von (S) und  $\beta$ -Aktin/“TATA-box binding protein“ (H) für nicht stimulierte Proben oder auch Kontrollen (Proben aus WT-Zellen oder aus mit dem jeweiligen Leervektor transduzierten Zellen) ( $\Delta C_{tu}$ ) und stimulierter Probe ( $\Delta C_{ts}$ ) gebildet:

$$1.) \Delta C_{tu} = C_t(S) - C_t(H)$$

$$2.) \Delta C_{ts} = C_t(S) - C_t(H)$$

Weiterhin wird die Differenz dieser  $\Delta C_t$ -Werte gebildet:  $\Delta \Delta C_t = \Delta C_{tu} - \Delta C_{ts}$

$\Delta C_{tu}$  entspricht dabei der Differenz in  $C_t$  für spezifisches Gen zu den „housekeeping“- Genen für die nicht stimulierte Probe oder Kontrolle.  $\Delta C_{ts}$  ist die entsprechende Differenz für die stimulierte Probe. Die Expression des spezifischen Transkripts S in der unbehandelten Probe relativ zur stimulierten Probe ergibt sich als:

Relative Expression =  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ , wobei von der Annahme ausgegangen wird, dass die Effizienzen für die verschiedenen Primerpaare gleich sind.

### 3.3.5 Kompetitive PCR

Das Prinzip der kompetitiven PCR beruht auf der Koamplifikation einer unbekannt Menge der zu quantifizierenden cDNA (Target-DNA) und einer als Vergleichsgröße fungierenden Standard-DNA bekannter Konzentration. Aufgrund des Verhältnisses (Endmenge von Target-DNA + Endmenge von Standard-DNA = 100%) und durch Kenntnis der eingesetzten Standard-DNA-Menge ist eine relative Bestimmung der Ausgangsmenge an Target-DNA möglich. Zur Erhöhung der Genauigkeit der Messung wurde eine Standard-Verdünnungsreihe eingesetzt.

#### 3.3.5a Herstellung des jeweiligen internen Standards

Diese Methode fand für die Semiquantifizierung der mRNA von BGN, PAI-1 und GAPDH mit Hilfe von Prof. H. Ungefroren Verwendung. Für BGN wurde eine interne Standard-DNA von 386 bp konstruiert (Chen *et al.*, 2004). Die Standard-DNA für PAI-1 wurde mittels PCR hergestellt. Mit Hilfe eines Hybrid-sense-Primers (Nukleotide 357-378 gefolgt von den Nukleotiden 588-610 (siehe Kap. 2.10)) und des antisense-PAI-1-Primers (siehe Kap. 2.10) wurde ein Produkt (599 bp) amplifiziert, dessen Vervielfältigung in einer zweiten PCR-Reaktion mit den sense- und antisense-Primern für PAI-1 erfolgte.

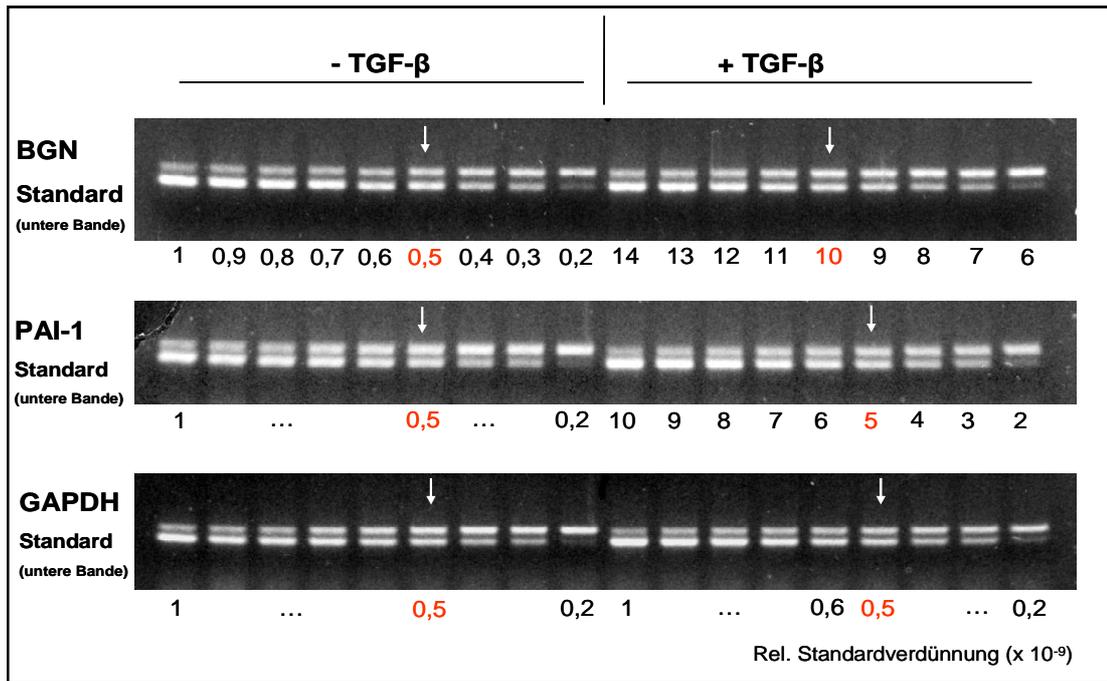
Der Standard für GAPDH wurde in einer PCR-Reaktion synthetisiert, in der, mittels des antisense-Primers für GAPDH (siehe Kap. 2.10) und eines Hybrid-sense-Primers (Nukleotide 358-378 und 439-457 der GAPDH-cDNA), die Amplifikation eines 146 bp großen Fragments erfolgte, welches wiederum mit den sense- und antisense-Primern für GAPDH in einer zweiten Reaktion vervielfältigt wurde. Mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6), Gelelektroelution (siehe Kap. 3.3.7) und anschließender Fällung (siehe Kap. 3.3.8) erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte und anschließende Konzentrationsbestimmung (siehe Kap. 3.3.9).

### **3.3.5b PCR und Auswertung**

Mehrere kompetitive PCR-Reaktionen (Programm, siehe Kap. 3.3.3) mit gleichen cDNA-Mengen (entsprachen 100-200 ng RNA) aber unterschiedlichen Mengen an Standard wurden parallel durchgeführt. Zur Ermittlung der Target-cDNA-Konzentration wurden mehrere serielle Verdünnungen der Standard-cDNA (Grobtitration und anschließende Feintitration; 0.9, 0.8, ....; 0.09, 0.08, ... usw.) eingesetzt.

Damit die Reaktionen in der exponentiellen Phase beendet werden konnten, wurde eine niedrige Anzahl an Zyklen gewählt: 16 Zyklen für BGN und 10 Zyklen für PAI-1 bei einer Annealing-Temperatur von 59°C, so dass die Amplifikate gerade mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnten. Nach Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6) und nachfolgender Färbung mit Ethidiumbromid erfolgte die Quantifizierung durch eine densitometrische Auswertung der Bandenstärke mit Hilfe der NIH Image Software (Version 1.62). Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten (gleiche Intensität der Banden von Target und Standard) konnte so die Konzentration der Target-cDNA ermittelt werden (siehe Abb.7).

Es wurden mehrere PCRs durchgeführt, um mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe den Äquivalenzpunkt (Entstehung von gleichviel Produkt an Standard- und Proben-DNA) der DNAs bestimmen zu können. Die relativen Werte für die BGN- und PAI-1-RNA-Konzentrationen wurden auf die cDNA-Spiegel von GAPDH normalisiert. Für jedes Stimulations-Experiment erfolgte die Durchführung zweier unabhängiger kompetitiver RT-PCR-Assays.



**Abb. 7: Beispiel der kompetitiven PCR für BGN, PAI-1- und GAPDH nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung.** Mittels Gelelektrophorese konnte nach Koamplifikation der Target-cDNA und der jeweiligen Standard-cDNA (jeweils die untere Bande), die Konzentration der Proben-cDNA vor und nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung abgeschätzt werden (siehe rote Ziffern). An diesem Punkt waren die Bandenintensitäten gleich stark. Nach 24-stündiger Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 konnte eine deutliche Induktion der BGN-mRNA (20-fach) sowie auch der PAI-1-mRNA (10-fach) in den Panc-1-Zellen beobachtet werden. Das Haushaltsgen GAPDH wurde unter den gewählten Bedingungen nicht reguliert.

### 3.3.6 Agarosegel-Elektrophorese

<b>50 x TAE-Puffer:</b>	224 g Tris base
(Tris-Acetat-Puffer)	57,1 ml Eisessig
	37,2 g EDTA
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O
<b>6 x Probenauftragspuffer:</b>	
	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanol
	30% Glycerin in Wasser
<b>Ethidiumbromidlösung:</b>	1% (w/v) in Wasser

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wurde eine Gelelektrophorese mit 1-2%igen Agarosegelen durchgeführt. Dieses Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt, wie z.B. der Analyse eines Restriktionsverdau bzw. zur DNA-Charakterisierung, der Überprüfung von PCR-

Produkten, der Qualitätskontrolle von DNA, sowie der Isolierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen und der Kontrolle von RNA-Transkripten.

Zum Vergleich der DNA-Größen auf dem Gel wurden standardisierte Größenmarker verwendet (1 kb Marker, Fermentas; Marker VIII, Roche). Die Agarose wurde in 1 x TAE durch Aufkochen gelöst, mit Ethidiumbromidlösung (1% w/v in Wasser) in eine Agarosegelkammer gegossen und der Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gel in die mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt und die Taschen wurden mit den mit 1/6 Volumen Probenpuffer vermischten DNA-Proben befüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 10 Volt pro 1 cm Gellänge. Anschließend wurde die DNA mit dem interkaliertem Ethidiumbromid durch UV-Bestrahlung, mittel eines UV-Transilluminators (Herolab) sichtbar gemacht und fotografiert.

### **3.3.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mittels Elektroelution**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen diente der Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente. Dieses wurde unter Verwendung der Elektroelution mit Hilfe einer Elektroelutionskammer (Elutrap Electroelution Systems von Schleicher und Schüll) durchgeführt.

Bei der Elektroelution werden geladene Moleküle durch ein elektrisches Feld aus einem Elektrophoresegel herausgelöst. Nach der Auftrennung der DNA durch Agarosegel-Elektrophorese wurde der Gelabschnitt, welcher die DNA von Interesse enthielt, herausgeschnitten und in die Elutionsvorrichtung gelegt. In der verwendeten Biotrap erfolgte die Separation innerhalb einer von zwei Membranen (die erste ist DNA permeabel, die zweite nicht) begrenzten Kammer. Nachdem die DNA in die gebildete Sammelkammer gewandert war, konnte das Eluat aus dieser Kammer abpipettiert werden. Die Elution erfolgte in demselben Puffer, in dem die ursprüngliche Gelelektrophorese stattfand.

### **3.3.8 Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren**

#### ***3.3.8a Phenol/Chloroform-Extraktion***

Im Anschluss an bestimmte Präparationen von Plasmid-DNA bzw. enzymatische Umsetzungen war die Abtrennung oder Inaktivierung verbliebener Proteine oder Enzyme durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion nötig.

---

Die DNA-Lösung wurde auf 100 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:23:1) versetzt. Nach Mischen und Zentrifugieren (13000 rpm, 2 min) wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um das Phenol zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte eine Ethanol-fällung.

### **3.3.8b Alkohol-Fällung**

Zur Konzentration von DNA-Lösungen oder auch nach Phenol/Chloroform-Extraktionen wurden Alkohol-Fällungen durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Lösung mit 0,7 Volumina Isopropanol oder 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 3 Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und gut vermischt. Nach Inkubation für mindestens 1 h bei -20°C unter Verwendung von Ethanol (RT bei Isopropanol) wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C) und der alkoholische Überstand entfernt. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

### **3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Für einige der durchgeführten gentechnischen Arbeitsschritte war es notwendig, die Konzentration von doppelsträngiger (ds)DNA und von RNA in wässrigen Lösungen zu bestimmen. Dazu wurde die Absorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm genutzt. Eine optische Dichte von 1.0 bei 260 nm entspricht dabei etwa einer DNA-Konzentration von 50 mg dsDNA/ml, 40 mg/ml Einzelstrang-DNA oder RNA oder 20 mg/ml für Oligonukleotide. Die Messungen der mit Wasser verdünnten Proben (1:80) erfolgten in Quarzküvetten an einem Spektralphotometer (Smart Spec<sup>TM</sup>3000).

## **3.4 Klonierung von PCR-Produkten**

Zur Klonierung eines PCR-Produktes ist es erforderlich, die amplifizierte Sequenz in ein Plasmid zu ligieren. Dieses Plasmid wird dann nach Transformation in Bakterien in hoher Kopienzahl produziert. Nach Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wird diese durch Transfektion in eukaryotische Zellen eingebracht.

---

### 3.4.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (siehe Kap. 2.11) in dem jeweiligen, vom Hersteller angegebenen Puffer restringiert. Dieser Verdau der dsDNA diente der Vorbereitung von Insert und Vektor für Ligationsreaktionen (siehe Kap. 3.4.2). In der Regel wurden Doppelspaltungen mit einem oder zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt; das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ .

Ein typischer analytischer Restriktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

---

0,5-3 $\mu\text{g}$ DNA
2,0 $\mu\text{l}$ 10 x Restriktionsendonukleasepuffer
1 $\mu\text{l}$ Restriktionsenzym (10 Units)
(1 $\mu\text{l}$ Restriktionsenzym 2 (10 Units))
auf 20 $\mu\text{l}$ mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

---

Der Ansatz wurde 1-2 h oder ü. N. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung der DNA über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Kap. 3.3.8) oder, nach Zugabe von einem Fünftel des Volumens des Reaktionsansatzes an Auftragspuffer, eine Aufreinigung über ein Agarosegel (siehe Kap. 3.3.6). Weiterhin wurde durch Verwendung von Restriktionsenzymen (siehe Kap 2.11) die Klonierung überprüft, beispielsweise indem das DNA-Stück (Insert) wieder herausgeschnitten und seine Größe mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6) überprüft wurde.

### 3.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

---

<b>Ligations-Puffer: 1 x:</b>	50 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM DTT
	1 mM ATP
	25 $\mu\text{g/ml}$ BSA
	pH 7,5

---

Der Klonierungsvektor und das Insert wurden vor der Ligation, in der die DNA-Fragmente mittels der T4-DNA-Ligase zusammengefügt wurden, mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und gereinigt (siehe Kap. 3.3.8). Für die Ligations-Reaktion wurde ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 gewählt.

---

---

<b>Ligationsansatz:</b>	x $\mu$ l Vektor-DNA
	y $\mu$ l Insert-DNA
	1 $\mu$ l T4-DNA-Ligase
	2 $\mu$ l 10 x Ligationspuffer; auf 20 $\mu$ l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

---

Es erfolgte eine Inkubation ü. N. (16 h) bei RT. Die Ligationsansätze wurden nachfolgend für eine Transformation von kompetenten *E. coli* Top10F' (Invitrogen) verwendet.

Im Fall der Klonierung von pRac1-Q16L-cDNA3 (siehe Kap. 3.3.3) wurde das Restriktionsenzym *EcoRV* direkt zu dem Ligationsansatz dazugegeben, damit auf die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors verzichtet werden konnte, die normalerweise bei blunt-end-Klonierungen durchgeführt wird, um eine Rezirkularisierung des Vektors zu unterbinden. Es kommt im Ligationsansatz zu einer Anreicherung der Plasmid-Insert-Kombination, da nach der Ligation keine Schnittstelle mehr für *EcoRV* vorhanden ist.

### 3.5 Arbeiten mit Bakterien

#### 3.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Lagerung der kompetenten *E. coli* Bakterien (Top10F', Invitrogen) erfolgte bei -80°C. Für die Vermehrung von *E. coli* wurden LB-Medium und LB-Agar-Kulturplatten verwendet. Bakterien, die Plasmide aufgenommen hatten, besaßen eine Antibiotikumresistenz und konnten durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums zum Nährmedium selektiert werden. Das Antibiotikum Ampicillin hatte eine Arbeitskonzentration von 100  $\mu$ g/ml.

Flüssigkulturen wurden, falls nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz des für die Klone geeigneten Antibiotikums angesetzt. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, ü.N. bei 37°C und ca. 200 rpm im Schüttelinkubator.

#### 3.5.2 Transformation von *E. coli*

20  $\mu$ l transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von Plasmid-DNA oder dem vollständigen Ligationsansatz erfolgte eine Inkubation der Zellsuspension für weitere 30 min auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz für 30 sec auf 42°C erwärmt, für 2 min auf Eis inkubiert und dann pro Ansatz 100  $\mu$ l SOC-

---

Medium (Invitrogen) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C unter Schütteln (350 rpm, Thermomixer) wurden die transformierten Bakterien auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Binder) oder in 20 ml antibiotikahaltigem LB-Medium in einem 50 ml Röhrchen im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der sense-Orientierung oder auch der Korrektheit des Inserts in den Expressionsplasmiden wurden einzelne Klone von den Agarplatten gepickt und mittels „Colony“-PCR untersucht (siehe Kap. 3.5.3).

### 3.5.3 „Colony“-PCR

Zur Überprüfung der Klonierung (Orientierung und Größe des Inserts) fand die Methode der „Colony“-PCR Verwendung. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien von LB-Platten abgenommen, in 200 µl sterilem Wasser suspendiert und 10 min bei 100°C aufgeköcht, um die Plasmide der PCR zugänglich zu machen. Danach erfolgte eine Standard-„touch-down“-PCR (siehe Kap. 3.3.3) mit verschiedenen Kombinationen von den entsprechenden Primern des im Plasmid eingefügten Genes und Plasmid-internen Primern (z.B. Primer für die T7-oder Sp6-Bereiche in pcDNA3). Die PCR wurde mit Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6) ausgewertet.

### 3.5.4 Plasmidpräparation mit dem Qiagen Miniprep Kit (QIAprep Spin Miniprep)

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und ein Restriktionsverdau (siehe Kap. 3.4.1) mit den für das konstruierte Plasmid spezifischen Restriktionsenzymen durchgeführt. Mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Kap. 3.3.6) fand eine Kontrolle der Größe der Fragmente statt.

## 3.6 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden erfolgte mit Hilfe von kationischen Lipiden (Lipofectamine<sup>TM</sup> Plus). Diese Lipide bilden mit der DNA einen Komplex, wodurch deren negative Ladung maskiert wird. Die so entstandenen DNA-Liposomen-Komplexe werden auf die Zellen aufgebracht und fusionieren mit der Zellmembran. Der Inhalt der Komplexe gelangt durch Endozytose ins Zellinnere.

---

Für transiente Transfektionen mit anschließender Immunpräzipitation (siehe Kap. 3.2.4) wurden im Falle von Panc-1  $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 10 cm Schalen, für Luziferase-Assays (siehe Kap. 3.7)  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 96-well-Platte ausgesät. Nach 24 h (die Zelldichte betrug 60-80%) wurden die Zellen serumfrei mit verschiedenen Vektoren mittels Lipofectamine Plus (Invitrogen) co-transfiziert. Die Transfektionsansätze wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers angesetzt.

**Transfektion mittels Lipofectamine Plus:**

Ansatz I: 0,2 µg DNA/cm<sup>2</sup>, 0,5 µl Plus/cm<sup>2</sup> und 10 µl RPMI (pur)/cm<sup>2</sup>.

Ansatz II: 10 µl RPMI (pur)/cm<sup>2</sup>, 0,75 µl/cm<sup>2</sup> Lipofectamine

Die Ansätze I und II wurden jeweils gut gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Vereinigung der beiden Ansätze, welche nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min bei RT auf 5,6 ml (96-Well: 50 µl) mit RPMI (pur) aufgefüllt wurden. Währenddessen wurden die Zellen mit serumfreiem RPMI gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Transfektionsansätze zu den Zellen. Nach einer Inkubation von 3-5 h im Brutschrank wurden die Ansätze entfernt und die Zellen für 24 h mit normalem Wachstumsmedium weiter inkubiert. Die transfizierten Zellen für die Immunpräzipitationen sollten anschließend mit TGF-β1 behandelt werden. Aus diesem Grund erfolgte eine Inkubation für 16 h mit serumreduziertem RPMI (0,5% FCS) im Brutschrank. Nach der Stimulation mit TGF-β1 für 1 h wurden die Zellen mittels IP-Puffer lysiert (siehe Kap. 3.2.3), die Konzentration bestimmt (siehe Kap. 3.2.4) und nach anti-Myc oder anti-FLAG-Immunpräzipitation (siehe Kap. 3.2.5) mittels Westernblot-Analyse (siehe Kap. 3.2.7) untersucht. Sollten stabil exprimierende Zellen hergestellt werden, erfolgte 48 h nach der Transfektion die Zugabe des jeweiligen Selektionsmarkers (im Fall von Panc-1-Rac1-Q61L-pcDNA3 handelte es sich um Geneticin (G-418)).

### **3.7 Luziferase-Assay**

Zur luminometrischen Quantifizierung der Luziferase-Aktivität von transfizierten Promotor-Luziferase-Fusionsgenen wurde der Dual-Luciferase™ Reporter Assay von Promega Heidelberg verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Messung der Photonen, die durch katalytische Oxidation des Luziferins entstehen. Es finden zwei verschiedene

Luziferasen Anwendung: die Firefly Luziferase (*Photinus pyralis*), die als Reporter im verwendeten Promotor vorhanden ist, und die Renilla Luziferase (*Renilla reniformis*), die als Kontrollreporter cotransfiziert wird.

Der Versuchsreporter spiegelt die spezifische Wirkung im Bereich der Genexpression unter den jeweiligen Bedingungen wieder. Die Aktivität des cotransfizierten Kontrollreporters stellt eine interne Kontrolle dar, durch welche die Werte normalisiert werden können. Der Luziferase-Assay wurde gemäß der Gebrauchsanweisung der Firma Promega durchgeführt.

Für die Luziferase-Assays wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät ( $1 \times 10^4$  Zellen/Well) und am nächsten Tag serum-frei mit Lipofectamine Plus (Panc-1) (siehe Kap. 3.6) nach Anweisungen des Herstellers mit verschiedenen cDNAs transfiziert (meistens in pcDNA3). Es wurden gleiche molare Mengen an p6SBE-Luc, pMyc-TA-Luc oder pSmad7-Luc und dem Renilla Luziferase kodierendem Vektor pRL-TK (Promega) verwendet (siehe Kap. 2.12.1). Jedes Well bekam die gleiche Menge an DNA (100 ng). In allen Reportergen-Assays wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt (6-8 Wells).

In einigen Experimenten erfolgte 24 h nach der Transfektion eine Stimulation mit TGF- $\beta$ 1. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mittels 20  $\mu$ l „Passive-Lysis-Buffer“ lysiert. Als erstes wurde zu den Lysaten 100  $\mu$ l Reagent II dazugegeben, um die Lumineszenz der Firefly-Luziferase messen zu können. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l „Stop-and-Glo“-Puffer zu den Lysaten, welcher die Luziferase hemmte und gleichzeitig die Renilla-Luziferase aktivierte. Die Messungen erfolgten mit dem Luminometer der Firma Promega.

### **3.8 Konstruktion der verwendeten Vektoren**

Für Experimente, in denen Zellen verschiedene Rac1-Konstrukte stabil-exprimieren sollten, mussten zunächst die Vektoren konstruiert werden. Von Rac1-WT wurde der gesamte offene Leserahmen mittels RT-PCR (siehe Kap. 3.3.2, 3.3.3) amplifiziert und in den Vektor pcDNA3 ligiert (siehe Kap. 3.4.2). Für die retrovirale Transduktion (siehe Kap. 3.9) wurde das Insert Rac1-WT aus diesem Vektor mittels Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI/*Xho*I) wieder herausgeschnitten und über eine „sticky-end“-Klonierung in den Vektor pBABE-puro ligiert, der zuvor einem

---

Restriktionsverdau (siehe Kap. 3.4.1) mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I unterzogen wurde. Das cDNA Insert mit Myc-Tag von dnRac1 (Rac1-T17N) wurde aus dem Vektor pMyc-Rac1-T17N-cDNA 3.1 herausgeschnitten (mit *Bam*HI und *Xho*I) und in den Vektor pBABE-puro (Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Sal*I) subkloniert.

Für das Insert caRac1 (Rac1-Q61L) diente der Vektor pRK5F-Myc-Rac1-Q61L als Template in der Amplifikationsreaktion (siehe Kap. 3.3.3). Das Insert wurde mittels „blunt-end“-Klonierung in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pcDNA3 eingefügt. Nach Transformation von *E. coli* Top10 mit diesen Konstrukten (siehe Kap. 3.5.2) erfolgte mittels Colony-PCR (siehe Kap. 3.5.3) und Restriktionsverdau eine Überprüfung auf positive Klone, welche dann für eine retrovirale Transduktion oder, im Fall von Rac1-QL, für eine stabile Transfektion mittels Lipofectamine plus (siehe Kap. 3.6) verwendet wurden.

### 3.9 Retrovirale Transduktion

Zur Herstellung stabil exprimierender Zellen/Klone wurden Panc-1 Zellen mit verschiedenen Rac1-Konstrukten retroviral transduziert. Als Negativkontrolle wurde der jeweilige leere Vektor (pcDNA3-HA-SL, pBABE-puro) transduziert. Um die Vektorkonstrukte (pRac1-WT BABE-puro, pMyc-Rac1-T17N-BABE-puro) in einen Retrovirus (VSV-G = “vesicular stomatitis virus G“) zu verpacken, wurden 293T-Zellen mit dem jeweiligen Vektorkonstrukt bzw. dem leeren Vektor, einem „Verpackungsplasmid“ (pKAT 1.gag/polATG), und dem pCMV-VSV-G Plasmid cotransfiziert. Am Tag nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und der Überstand aufbewahrt. Weitere 24 h später konnte der Überstand mit den Retroviren geerntet und gefiltert (Filter: low protein binding; Porengröße: 0,45 µm) werden.

Für die Transduktion wurden die Panc-1-Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/6-Well ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 2 ml Virusüberstand + 3,5 µl Polybren pro Ansatz. 48 h später wurden die Überstände abgenommen und durch Selektionsmedium ersetzt (RPMI + G418 oder Puromycin). Nach der Selektion zur Herstellung von Einzelklonen oder Zellpools konnten die transduzierten Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

### 3.10 Orthotopes Tumormodell

Die Versuche zu dieser Arbeit wurden vom zuständigen Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein unter dem Titel „Untersuchung der Wirkung von konstitutiv aktiven TGF- $\beta$ 1 Rezeptoren auf Desmoplasie-Induktion und Metastasierung von humanen Pankreaskarzinomzellen“ mit dem Aktenzeichen V742-72241.121-7 (86-10/04) genehmigt. Die operativen Schritte des Tierversuches sowie die immunhistochemischen Färbungen führten Dr. Bodo Schniewind und B. Körtge durch.

**Tabelle 9: Einteilung der Versuchstiere**

Gruppierung der Versuchstiere		
18 BALBc SCID Mäuse		
Tiergruppe Panc-1-WT (6 Tiere)	Tiergruppe Panc-1-caALK5 (6 Tiere)	Tiergruppe Panc-1-caRImL45 (6 Tiere)

Die 18 für den Tierversuch verwendeten BALBc-SCID Mäuse waren alle weiblichen Geschlechts und wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Alle Futtermittel, das Wasser sowie das im Käfig ausgestreute Sägemehl wurden vor der Verwendung sterilisiert. Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte unter Anästhesie. Es wurden 30  $\mu$ l einer auf 4 °C gekühlten Suspension von  $10^6$  Tumorzellen (von jeweils acht verschiedenen Klonen) in Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, U.S.A.) in das Pankreas inokuliert. Zur Vermeidung von Abtropfmetastasen wurden die Inokulationskanülen erst nach Aushärten des Matrigels bei Körpertemperatur aus dem Pankreas retrahiert.

Vier Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> eingeschläfert, seziiert, der Op-situs fotografisch dokumentiert und die Tumore entnommen. Zunächst erfolgte eine Bestimmung von Gewicht und Volumen der Tumore nach der Formel einer rationalen Ellipse ( $V = \text{Länge} \times \text{Höhe} \times \text{Breite} \times 0,5236$ ). Für weitere immunhistochemische Untersuchungen (Proliferationsindex, Kapillarendichte) wurden die Primärtumore sowohl kryokonserviert als auch formalinfixiert.

Die Daten wurden mit Hilfe von SPSS für Windows (V 11.0, Chicago, IL) analysiert.

Die Analyse von Unterschieden im Tumolvolumen zwischen relevanten Untergruppen/Subgruppen erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und des Whitney-

U-Tests. Die errechneten p-Werte wurden grafisch dargestellt. Ein allgemeiner p-Wert von 0,05 galt als statistisch signifikant.

### 3.10.1 Routine Histologie und Immunhistochemie

Nach Resektion wurden die orthotop gewachsenen Tumore sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (Kryokonservierung). Mittels Gefrierkryotom wurden 5 µm dicke Schnitte angelegt und anschließend mit Aceton für 10 min bei RT auf Objektträgern fixiert.

Es erfolgte eine Färbung der Gewebeschnitte mittels eines ALK5-Antikörpers (Santa Cruz; Verdünnung 1:100, siehe Tabelle 2), um die Expression dieses Rezeptors in den Tumoren nachzuweisen. Der Proliferationsindex der Tumore wurde mittels Färbung des Ki-67 Antigens (Antikörper MIB-1; Verdünnung 1:50) ermittelt, wodurch die Zellkerne von proliferierenden Zellen angefärbt wurden. Um die Mikrogefäßdichte (microvascular density, MVD) der Tumore zu bestimmen, erfolgte die Anfärbung der Gefäße mit dem endothelspezifischen Marker CD31 (PECAM-1; anti-CD31/PECAM-1, Verdünnung: 1:50). Die Färbungen erfolgten nach der „APAAP“ Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase). Sie wurden mit dem Autostainer<sup>TM</sup> und dem ChemMate<sup>TM</sup> Detection Kit (APAAP, mouse) der Firma Dako nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem Substrat Neufuchsin (Dako), die Gegenfärbung mit Haematoxylin (Dako).

Die lichtmikroskopische Bestimmung des Proliferationsindex erfolgte durch Auszählen von 200 Tumorzellen in drei sog. „hot spots“ jedes Kryoschnittes durch zwei verschiedene Betrachter bei einer 400-fachen Vergrößerung. Die Angabe der positiven Zellen erfolgte in Prozent. Insgesamt wurden je drei Gefrierschnitte von drei Tieren mit Tumoren aus jeder Gruppe untersucht.

Die MDV der Tumore wurde nach Weidner *et al.* ermittelt. In den Schnitten wurden Areale erhöhter Gefäßdichte identifiziert und die Anzahl der Mikrogefäße pro Gesichtsfeld (0,19 mm<sup>2</sup>; 400 fache Vergrößerung) in fünf verschiedenen Arealen jedes Tumors bestimmt.

## 4. Ergebnisse

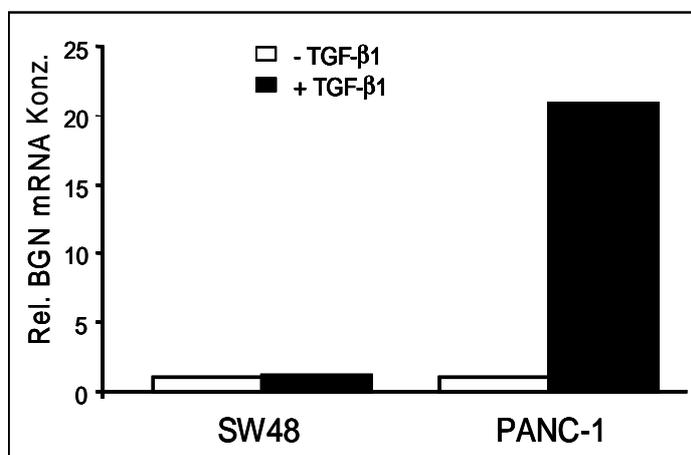
### 4.1 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)

#### 4.1.1 Die Rolle von T $\beta$ RII bei der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten BGN-Expression

Zunächst sollte die Funktion des TGF- $\beta$  Typ-II-Rezeptors (T $\beta$ RII) für die Signalweiterleitung des TGF- $\beta$ 1-Signals überprüft werden. Dazu wurde die TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN in der Kolon-Karzinomzelllinie SW48 untersucht, welche eine „Loss-of-function“-Mutation (Mikrosatelliten Instabilität) in *T $\beta$ RII* besitzt (Vincent *et al.*, 1997). Es konnte mittels semiquantitativer kompetitiver RT-PCR gezeigt werden, dass diese Zellen auf eine 24-stündige TGF- $\beta$ 1-Behandlung (5 ng/ml) nicht mit einer Hochregulation der BGN-mRNA reagieren (siehe Abb. 8). Als Kontrolle wurden TGF- $\beta$ -responsive Panc-1-WT-Zellen verwendet, in denen es nach der Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 zu einer 20-fachen Induktion der BGN-mRNA relativ zur Basalexpression kam (siehe Abb. 8).

**Abb. 8: Ein funktioneller T $\beta$ RII ist wichtig für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression.** Eine natürlich vorkommende Mutante des T $\beta$ RII in SW48 Kolon-Karzinomzellen blockiert den Effekt von TGF- $\beta$  auf die Expression von BGN. SW48-Zellen und Panc-1-WT-Zellen (Pankreaskarzinomzellen) wurden für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) behandelt. Anschließend erfolgte eine RNA-Isolierung mit darauf folgender semiquantitativer RT-PCR für BGN mit den entsprechenden Primern (Kap. 2.10).

Die Daten für die beiden Zelllinien wurden als relative BGN-mRNA-Konzentrationen (Konz.) angegeben, wobei die Konzentration in den jeweiligen unbehandelten Zellen =1 gesetzt wurde.



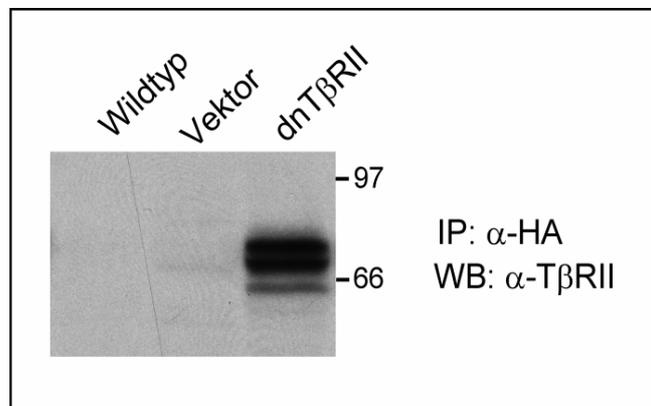
Die Experimente mit der SW48-Zelllinie lassen vermuten, dass der T $\beta$ RII essentiell für die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN ist.

Den funktionellen Nachweis der Bedeutung des T $\beta$ RII für die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN lieferten Experimente mit Panc-1-Zellen, welche retroviral mit einer dominant-

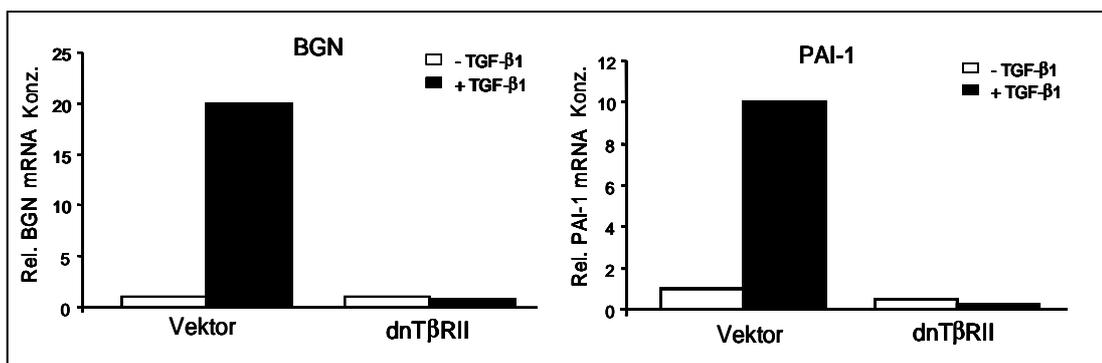
negativen (dn)Mutante (T $\beta$ RII-D404G; als HA-Fusionsprotein, Knaus *et al.*, 1996) des Rezeptors transduziert waren.

Für die Experimente wurde ein Klon-„Pool“ verwendet, bei dem es sich um eine heterogene Mischung aus verschiedenen G-418 resistenten Klonen handelte, die sich durch den Integrationsort des Retrovirus und als Folge davon in der Expressionsstärke des T $\beta$ RII unterschieden. In diesem Klon-„Pool“ konnte auf Proteinebene eine starke Expression der dn Mutante mittels anti-HA-Immunpräzipitation (IP) und anschließender Westernblot(WB)-Analyse im Vergleich zu der Vektorkontrolle (TJM) und den Panc-1-WT-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

**Abb. 9: Detektion der ektopen Expression der dn Mutante des T $\beta$ RII in Panc-1-Zellen.** Zelllysate von Panc-1-WT-Zellen und Panc-1-Zellen, die stabil mit einem leeren retroviralen Vektor (Vektor; TJM) oder einem retroviralen Vektor, der eine dominant-negative Mutante des T $\beta$ RII (dnT $\beta$ RII) mit HA-Tag kodiert, transduziert waren, wurden mittels anti-HA-Immunpräzipitation (IP) und anschließender Westernblot-Analyse (WB) mit einem T $\beta$ RII-Antikörper auf die Expression der dn Mutante untersucht. Die Zahlen an der rechten Seite geben das Molekulargewicht des Proteinstandards in Kilodalton an.



In diesem Klon-„Pool“ wurde die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN und PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1) im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Panc-1-Zellen mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR untersucht. Bei PAI-1 handelt es sich um ein TGF- $\beta$ 1 responsives Gen, dessen Aktivierung Smad-abhängig verläuft und in Panc-1-Zellen unabhängig von der Aktivierung der p38-MAPK ist (Chen *et al.*, 2002). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression beider Gene in den Panc-1-Zellen, welche die dominant-negative Mutante des Rezeptors stabil exprimieren, komplett unterdrückt war (siehe Abb. 10).



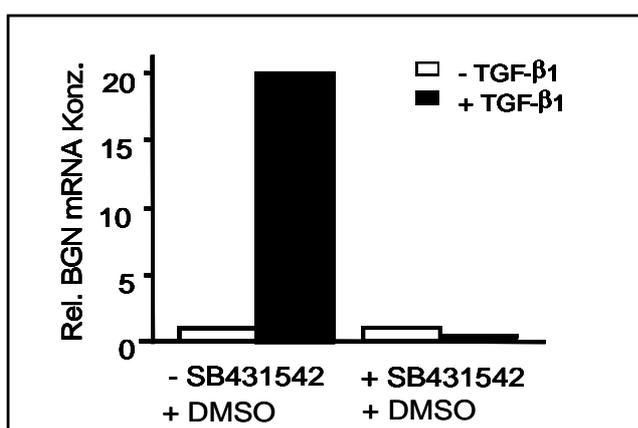
**Abb. 10: Die ektope Expression der dnTβRII-Mutante unterdrückt die durch TGF-β1-induzierte Hochregulation der BGN- und PAI-1-Expression.** Panc-1-Zellen, die stabil den retroviralen Leervektor oder die dnTβRII-Mutante exprimierten, wurden 24 h lang mit oder ohne TGF-β1 (5 ng/ml) inkubiert. Nach anschließender RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurde mittels quantitativer PCR der Einfluss von TGF-β1 auf die BGN- und die PAI-1-Expression untersucht. Die Daten wurden als relative BGN- oder PAI-1-mRNA Konzentrationen dargestellt, wobei den unbehandelten Vektorkontrollen der Wert 1 zugeordnet wurde.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der TβRII für die Induktion von BGN durch TGF-β1 in pankreatischen Zellen notwendig ist.

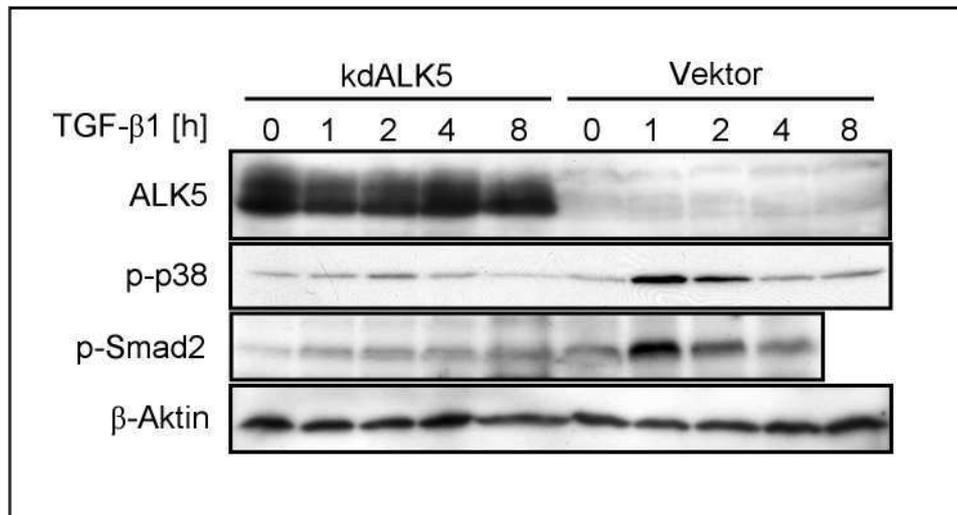
#### 4.1.2 Die Bedeutung der ALK5-Kinase-Aktivität für die Aktivierung von p38-MAPK und die Induktion der BGN-Expression

Als nächstes sollte untersucht werden, ob ALK5 auch an der durch TGF-β1-induzierten Expression von BGN beteiligt ist. Dazu wurden Panc-1-WT-Zellen zunächst mit SB431542 behandelt, einem Inhibitor, der selektiv die Kinase-Aktivitäten von ALK5, ALK4 und ALK7 blockiert (Inman *et al.*, 2002). Nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit diesem Inhibitor erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit TGF-β1 (+/- TGF-β1). Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor die TGF-β1-induzierte BGN-Expression in den Zellen unterdrückt. Als Kontrolle dienten Panc-1-Zellen, die mit DMSO (Lösungsmittel) statt mit SB431542 behandelt wurden (siehe Abb. 11).

**Abb. 11: Die pharmakologische Inhibition der ALK5-Kinase unterdrückt die durch TGF-β1-induzierte BGN-Expression.** Panc-1-WT-Zellen wurden nach der Behandlung mit dem Inhibitor SB431542 (2 μM in DMSO) oder dem Lösungsmittel (DMSO) mit TGF-β1 (+/-) für 24 h inkubiert. Nach anschließender RNA-Isolierung wurde die BGN-Expression mittels semiquantitativer kompetitiver RT-PCR untersucht.



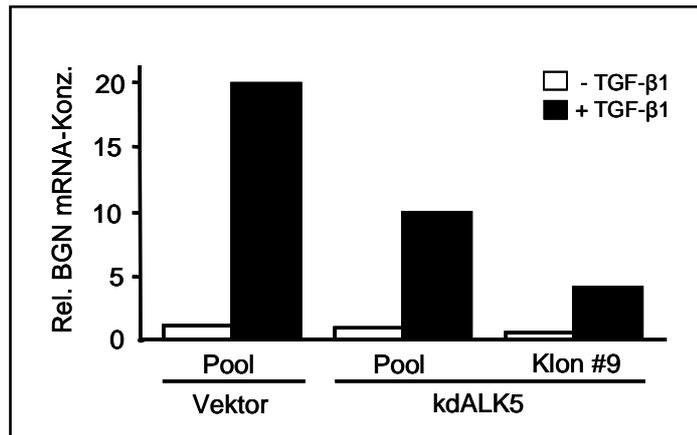
Um herauszufinden, welchen Effekt eine spezifische Hemmung von ALK5 auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression hat, wurden Zellklone verwendet, die eine kinase-defiziente (kd) ALK5-Mutante (ALK5-K232R) stabil exprimieren. Mittels WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass die kd ALK5-Mutante in den transduzierten Zellen im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Panc-1-Zellen exprimiert wird (siehe Abb. 12). Auch die Funktionalität der Mutante konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden, da die Phosphorylierung von Smad2 und p38-MAPK (Aktivierung von p38, Takekawa *et al.*, 2002) nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation in den kdALK5-exprimierenden Panc-1-Zellen im Gegensatz zu den Leervektor-exprimierenden Zellen stark reduziert war (besonders deutlich nach 1 h; siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 und p38-MAPK wird durch kdALK5 unterdrückt.** Die den Leervektor stabil exprimierenden Panc-1 Zellen (Pool) und ein Klon (#9), der die Mutante kdALK5 stabil exprimiert, wurden für verschiedene Zeitpunkte mit TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) stimuliert und mittels WB-Analysen auf die Expression von ALK5 (anti-ALK5) und die phosphorylierten Formen von Smad2 (p-Smad2) und p38-MAPK (p-p38) untersucht. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Mittels semiquantitativer kompetitiver RT-PCR konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der pharmakologischen Inhibition gezeigt werden, dass die BGN-mRNA nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 in den kdALK5-exprimierenden Panc-1 Zellen im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Panc-1-Zellen merklich reduziert war (siehe Abb. 13).

**Abb. 13: Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN wird durch die ektopye Expression von kdALK5 inhibiert.** Panc-1-Zellen, die entweder stabil die Mutante kdALK5 (Pool, Klon #9) oder den Leervektor (Vektor) exprimierten, wurden für 24 h sowohl mit als auch ohne TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die relative BGN-mRNA-Konzentration mittels semiquantitativer PCR bestimmt

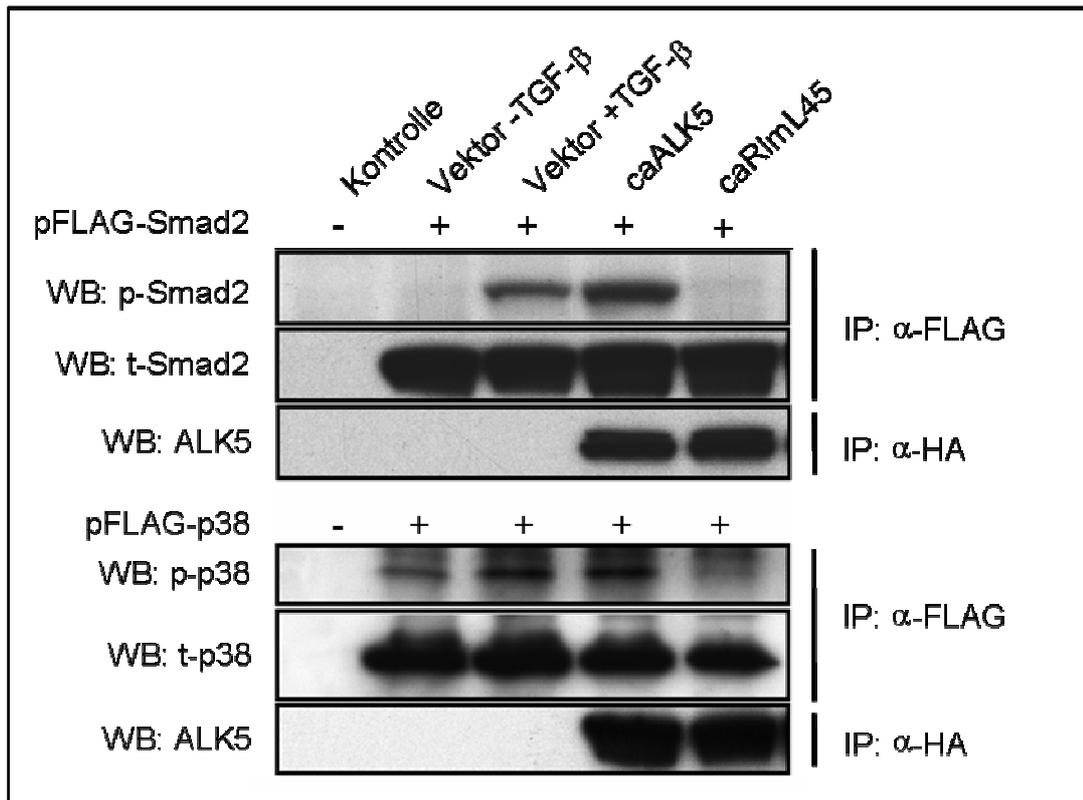


Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch die ALK5-Kinase-Aktivität wichtig für die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN in pankreatischen Zellen ist.

#### **4.1.3 Die Smad-aktivierende Funktion der ALK5-Kinase ist sowohl für die Aktivierung von p38-MAPK als auch für die Hochregulation der BGN-mRNA notwendig**

Die bisher gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die frühe Aktivierung des Smad-Signalwegs sowohl für die Aktivierung von p38 als auch für die nachfolgende Expression von BGN durch TGF- $\beta$ 1 notwendig ist (Takekawa *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Ungefroren *et al.*, 2003). Dadurch wird deutlich, dass neben der Kinase-Aktivität auch die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 eine bedeutende Rolle bei der TGF- $\beta$ -Signalweiterleitung spielt.

Um dieses direkt auf Rezeptorebene zu bestätigen, wurde eine von ALK5-abgeleitete Mutante (RImL45) erworben, die eine funktionale Kinasedomäne besitzt, aber aufgrund einer Mutation in der L45-Schleife nicht in der Lage ist, Smads zu aktivieren (Yu *et al.*, 2002). Da die Aktivierung der endogenen Rezeptoren verhindert werden sollte, wurden die Panc-1-Zellen mit den konstitutiv-aktiven (ca) ALK5-Mutanten ALK5-TD (Wieser *et al.*, 1995) und RImL45-TD (Yu *et al.*, 2002) transient transfiziert oder für andere Experimente nach retroviraler Transduktion Zell-„Pools“ bzw. Klone selektiert, die diese Mutanten stabil exprimierten.



**Abb. 14: Die Fähigkeit der ALK5-Kinase, Smad2 und p38-MAPK zu phosphorylieren, beruht auf ihrer Smad-aktivierenden Funktion.** Panc-1-Zellen wurden transient entweder mit 10 µg pFLAG-Smad2 oder mit pFLAG-p38 zusammen mit dem Leervektor, caALK5 oder caRimL45 mit HA-Tag mittels Lipofectamine Plus co-transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen 2 h lang sowohl mit als auch ohne TGF-β1 inkubiert, anschließend lysiert und die FLAG- oder HA-markierten Proteine immunpräzipitiert (IP). Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analyse auf die phosphorylierten Formen von Smad2 (p-Smad2) und p38 (p-p38-MAPK), gesamt-Smad2 (t-Smad2) und p38-MAPK (t-p38) oder auch ALK5 untersucht. Als Kontrolle diente Lysat aus untransfizierten Panc-1-Zellen. Genaue Angaben zu den Antikörpern (siehe Tabelle 2).

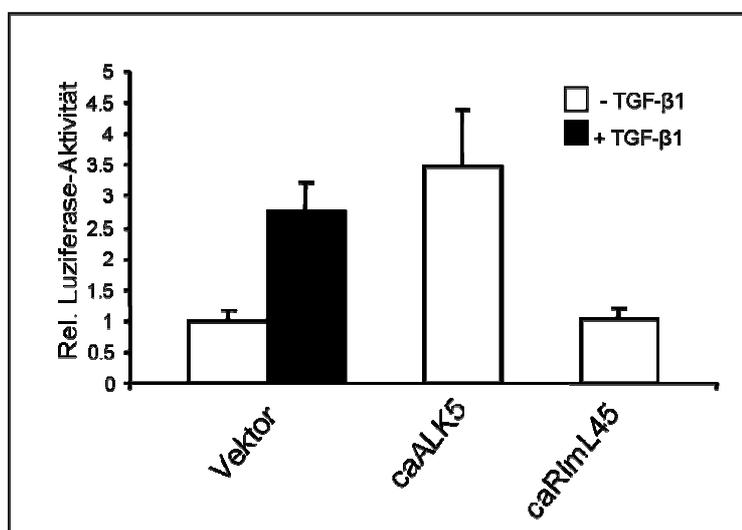
Dazu erfolgten Co-Transfektionen von Panc-1-Zellen mit HA-markiertem caALK5 oder HA-markiertem caRimL45 zusammen mit FLAG-markiertem Smad2 oder FLAG-markiertem p38. Anschließend wurden eine TGF-β1-Behandlung, eine anti-FLAG-IP und eine anti-Smad2 oder anti-p38 WB-Analyse durchgeführt. Wie vermutet konnte bewiesen werden, dass caALK5 im Gegensatz zu caRimL45 den Effekt von TGF-β1, und zwar die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Smad2 und p38-MAPK, imitieren kann (siehe Abb. 14). Der Nachweis der Expression der ALK5-Mutanten erfolgte mittels einer anti-HA-IP gefolgt von einer WB-Analyse mit einem anti-ALK5-Antikörper. Für die IPs wurden jeweils 100 µg Gesamt-Protein verwendet (siehe Abb. 14).

Außerdem sollte demonstriert werden, dass die ALK5-Mutante caRimL45 aufgrund ihrer Mutation nicht in der Lage ist, den Smad-Signalweg zu aktivieren.

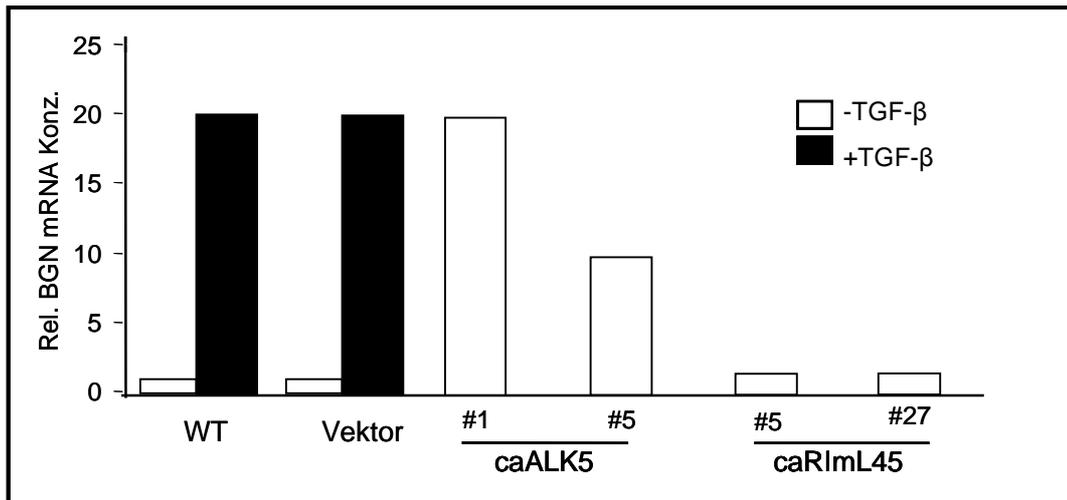
Hierzu erfolgte die Durchführung eines transkriptionellen Reporteragen-Assays, in dem ein Promotor-Reporterplasmid Verwendung fand (p6SBE-Luc), das Smad-responsiv ist. Dieses Promotor-Luziferase-Fusionsgen besteht aus sechs Kopien des palindromischen SBE (Smad-bindendes Element) mit der Basenfolge GTCTAGAC (Zawel *et al.*, 1998). Es wurde eine Co-Transfektion von Panc-1-Zellen mit caRimL45, caALK5 bzw. dem dazugehörigen Leervektor und den Plasmiden p6SBE-Luc und pRL-TK durchgeführt. Nach Expression der Proteine erfolgte eine Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 und anschließend die Bestimmung der Luziferaseaktivität (Lumineszenz) im Luminometer. Wie Abb. 15 zu entnehmen ist, kam es in den mit caRimL45 transfizierten Zellen relativ zur Kontrolle (Vektor) zu keiner transkriptionellen Induktion von p6SBE-Luc.

**Abb. 15: Die Mutante caRimL45 kann das Smad-responsive Reporterplasmid p6SBE-Luc nicht aktivieren.** Panc-1-Zellen wurden transient mit dem Leervektor, caALK5 oder caRimL45 zusammen mit p6SBE-Luc und pRL-TK co-transfiziert (siehe Kap. 3.6) und anschließend mit TGF- $\beta$ 1 behandelt oder unbehandelt belassen. Die Reporteragen-Aktivität wurde 24 h nach der Transfektion gemessen. Die Daten wurden aus einem repräsentativen Experiment von drei Experimenten ausgewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von

Zellen aus sechs Wells, die gleichzeitig behandelt und prozessiert wurden, relativ zu den Werten aus den unbehandelten Vektorkontrollen, die =1 gesetzt wurden.



Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der BGN-mRNA-Spiegel in den caALK5- und caRimL45-stabil exprimierenden Panc-1-Zellen (jeweils zwei beliebige Klone) mittels semiquantitativer kompetitiver RT-PCR. Als Kontrollen dienten mit TGF- $\beta$ 1 behandelte WT- und Leervektor-exprimierende Panc-1-Zellen. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, nähert sich die BGN-Expression der caALK5-exprimierenden Klone (sehr deutlich in Klon #1, nicht ganz so stark in Klon #5) der BGN-Expression von den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Kontrollen an. Die caRimL45-exprimierenden Zellen sind nicht in der Lage, den TGF- $\beta$ 1-Effekt auf die BGN-Expression nachzuahmen.



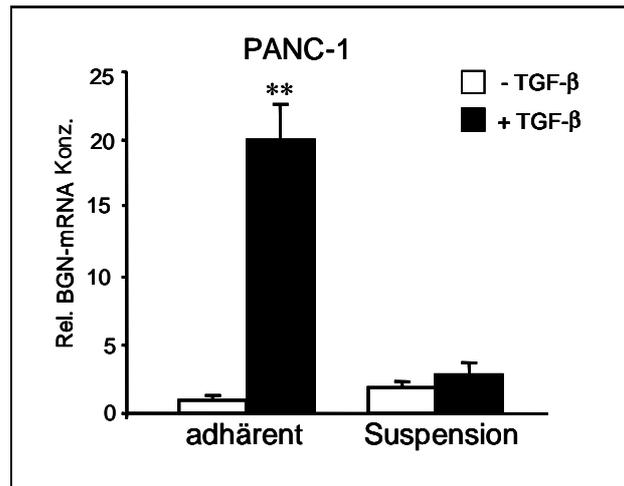
**Abb. 16: Die Mutante caRImL45 ist nicht fähig, den TGF-β1-Effekt auf die BGN-Expression nachzuahmen.** Mittels semiquantitativer kompetitiver RT-PCR wurde die RNA aus caALK5- und caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen auf die Expression von BGN untersucht. Für 24 h mit TGF-β1 behandelte Panc-1-Zellen (WT) und Leervektor-exprimierende Panc-1-Zellen (Vektor) dienten als Kontrollen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 für einen Großteil der p38-MAPK-Aktivität verantwortlich ist.

#### 4.1.4 Die durch TGF-β1 induzierte Aktivierung von p38-MAPK und die Hochregulation von BGN sind abhängig von der Zelladhäsion

Um zu klären, ob die Zelladhäsion die durch TGF-β1 induzierte Hochregulation von BGN moduliert, wurde der Effekt von TGF-β1 in Zellen untersucht, die unter nicht-adhärenenten Bedingungen kultiviert wurden. Dazu erfolgte die Aussaat von Panc-1-Zellen auf Zellkulturplastik und in Wells, die mit Agarose beschichtet waren. Als Kontrolle wurden die Zellen am nächsten Tag für 24 h mit TGF-β1 behandelt. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Effekt von TGF-β1 auf die BGN-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Wie Abb. 17 zeigt, kam es in den adhärenenten Zellen nach Stimulation mit TGF-β1 zu einem 20- bis 30-fachen Anstieg der BGN-mRNA. Im Gegensatz dazu konnte nach TGF-β1-Behandlung in den Suspensionszellen keine Induktion der BGN-mRNA beobachtet werden.

**Abb. 17: Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Hochregulation von BGN ist abhängig von der Zelladhäsion.** Panc-1-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, entweder auf Zellkulturplastik (adhärent) oder auf Platten, die mit Agarose beschichtet waren (Suspension). 24 h später erfolgte die Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) in normalem Kulturmedium für weitere 24 h. Im Anschluss daran wurde die RNA isoliert und die BGN-Expression mittels real-time PCR gemessen. Es wurden insgesamt drei Experimente durchgeführt und die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment dargestellt.

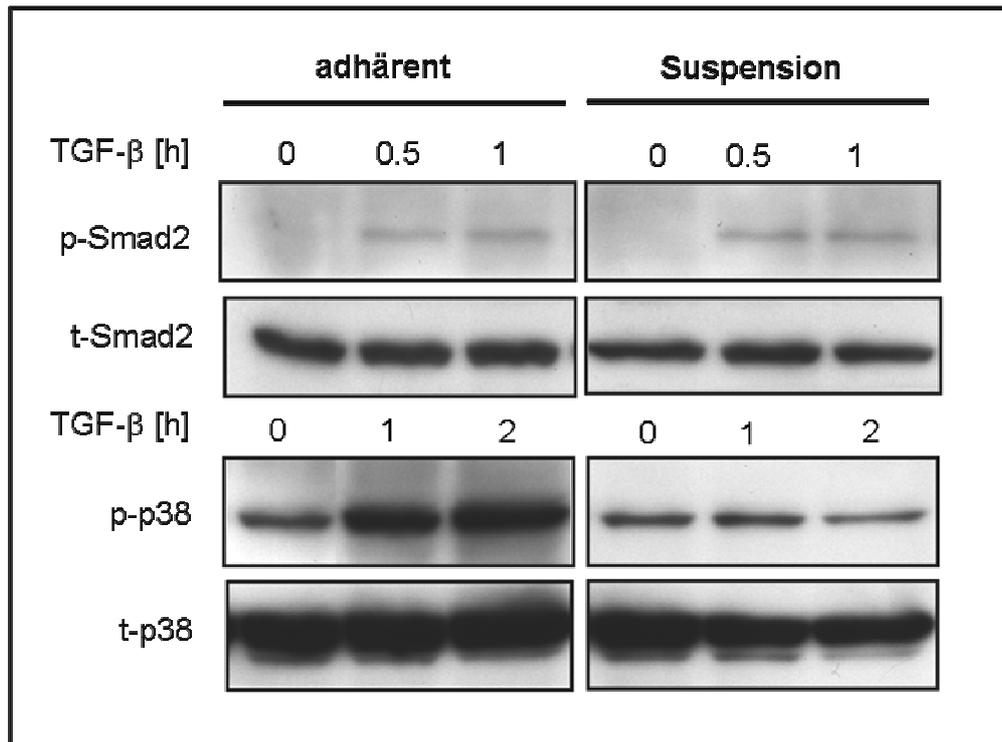


Die Werte wurden als relative (Rel.) mRNA Konzentration (Konz.) angegeben, wobei die mRNA-Konz. in den adhärennten unbehandelten Zellen gleich eins gesetzt wurde. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. \*\*:  $p < 0,001$ .

In den Suspensionszellen kommt es nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation nicht zu einer Hochregulation der BGN-Expression. Dieser Effekt ist nicht auf den Verlust von Zellvitalität zurückzuführen, da sich die Zellen, wenn man sie wieder auf Plastik aussät, erneut absetzen. Die Ergebnisse zeigen, dass adhäsions-abhängige Signale darüber entscheiden, ob TGF- $\beta$ 1 Auswirkungen auf die BGN-Expression hat.

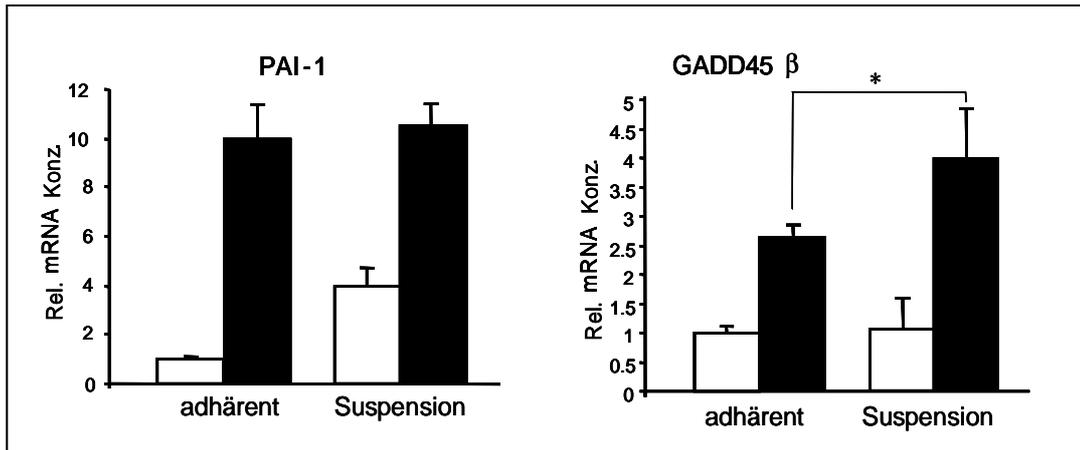
Da die Aktivierung von p38-MAPK ein wichtiger Zwischenschritt in der TGF- $\beta$ 1-Induktion der BGN-mRNA ist, war es von Interesse herauszufinden, ob auch die Aktivierung von p38 adhäsions-abhängig ist. Dazu wurden adhärent wachsende und in Suspension gehaltene Panc-1-Zellen unterschiedlich lange mit TGF- $\beta$ 1 behandelt, lysiert und mittels WB-Analyse mit einem phospho-p38-Antikörper auf den Aktivierungszustand von p38-MAPK untersucht (siehe Abb. 18). Der Nachweis von gesamt-p38 diente als Kontrolle für die eingesetzten Proteinmengen. Wie Abb. 18 zeigt, kam es in den Suspensionszellen nicht zu einer Phosphorylierung von p38.

Da die Aktivierung der p38-MAPK und die Induktion der BGN-mRNA durch GADD45 $\beta$  ausgelöst werden, welches selbst wiederum durch TGF- $\beta$ 1 über den Smad-Signalweg aktiviert wird, sollte überprüft werden, ob auch die frühe Smad-vermittelte Signalweiterleitung adhäsions-abhängig ist. Aus diesem Grund wurde die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 in adhärennten und nicht-adhärennten Zellen untersucht. Die Stimulierung der Panc-1-Zellen mit TGF- $\beta$ 1 erfolgte zu den angegebenen Zeiten (siehe Abb. 18).



**Abb. 18: Die durch TGF-β1-induzierte Aktivierung von p38-MAPK ist abhängig von der Zelladhäsion.** Panc-1-Zellen, deren Kultivierung unter adhären und nicht-adhären Bedingungen erfolgte, wurden zu den angegebenen Zeiten mit TGF-β1 behandelt, anschließend lysiert und die Proteinlysate mittels Westernblot-Analyse auf die Expression von p-Smad2, gesamt-Smad2 bzw. auf die Expression von p-p38 oder gesamt-p38 untersucht.

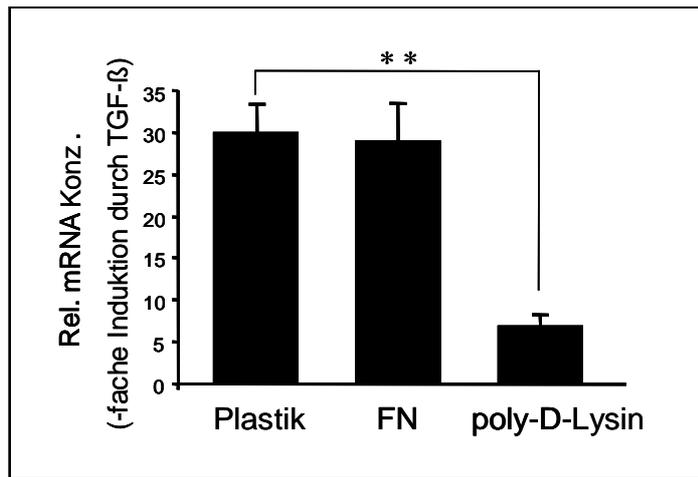
Nach Behandlung und anschließender Lyse der Zellen wurden die Proteinlysate mittels WB-Analyse mit einem phospho-Smad2-Antikörper auf die Phosphorylierung von Smad2 untersucht. Wie Abb. 18 zeigt, kommt es zu keinem Unterschied in der phospho-Smad2-Expression zwischen adhären und nicht-adhären kultivierten Zellen, was darauf hindeutet, dass die TGF-β1-induzierte Aktivierung der Kinase-Aktivität von ALK5 nicht abhängig von der Zelladhäsion ist (siehe Abb. 18). Zusätzlich lässt dieses Ergebnis vermuten, dass es stromaufwärts von Smad2 durch den Verlust der Zelladhäsion nicht zu Veränderungen im Signalweg kommt. Dieses spricht gegen eine unterschiedliche Rezeptorausstattung unter den gewählten Kultivierungsbedingungen. Weiterhin konnte für die durch TGF-β1-induzierte PAI-1-Expression, die in Panc-1-Zellen unabhängig von der p38-Aktivierung ist (Ungefroren *et al.*, 2003), gezeigt werden, dass sie in den adhären und den Suspensionszellen gleich stark war (siehe Abb. 19). Demgegenüber konnte mittels quantitativer RT-PCR festgestellt werden, dass die Expression von GADD45β in den in Suspension kultivierten Panc-1-Zellen nach TGF-β1-Stimulation sogar signifikant gesteigert war (Abb. 19).



**Abb. 19: Die Expression von PAI-1 ist nicht abhängig von der Zelladhäsion.** Mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA aus Panc-1-Zellen, deren Kultivierung, wie unter Abb. 17 beschrieben, unter adhären oder nicht-adhären Bedingungen erfolgte, auf die Expression von PAI-1 und GADD45 $\beta$  untersucht. Zuvor wurden die Zellen für 24 h bzw. 1 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen. \*:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant).

Zell-Matrix-Interaktionen werden hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Um herauszufinden, ob Integrine in den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression von BGN involviert sind, wurden Panc1-Zellen auf 6-Well-Platten aus Plastik oder auf 6-Well-Platten, die mit Fibronectin (Ligand für  $\beta$ 1-Integrine) oder mit poly-D-Lysin (Polypeptid, kein Ligand für Integrine) beschichtet waren, ausgesät. Nach 2-stündiger Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 und anschließender RNA-Isolierung konnte mittels quantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass die Beschichtung mit Fibronectin im gleichen Ausmaß wie eine Plastikbeschichtung zur Induktion der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1 führt (siehe Abb. 20). Im Gegensatz dazu war der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression in den Zellen, die auf Platten mit der poly-D-Lysin-Beschichtung gewachsen waren, gegenüber den Kontroll-Zellen, die auf Plastik gewachsen waren, um 79% reduziert.

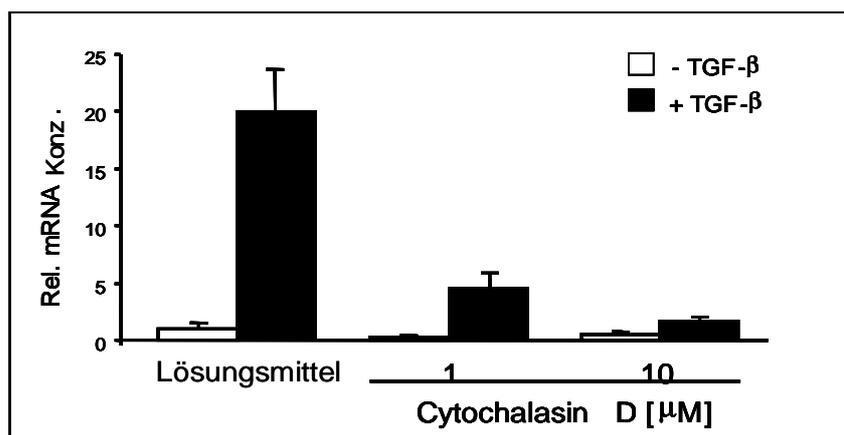
**Abb. 20: Integrine sind an der durch TGF- $\beta$ 1 vermittelten Induktion der Expression von BGN beteiligt.** Panc-1-Zellen wurden in 6-Well-Schalen aus Zellkulturplastik oder in Wells, die mit Fibronectin (FN) oder poly-D-Lysin beschichtet waren, ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen ü.N. in serum-reduziertem Medium (0,5 % FCS) kultiviert. Im Anschluss daran erfolgte eine Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 für 24 h (auch serum-reduziert). Die Spiegel der BGN-mRNA wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.



Die Werte sind als x-fache Induktion der mRNA-Konzentration durch TGF- $\beta$ 1 dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. \*\*:  $p < 0,001$ .

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der Zelladhäsion zwar die Aktivierung von p38 und die Induktion der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1 verhindert, aber keine Auswirkung auf die Fähigkeit von TGF- $\beta$ 1 hat, an seine Rezeptoren zu binden, sie zu aktivieren und die frühe Smad-abhängige Signalwirkung zu vermitteln. Außerdem kam es in den Suspensionszellen zu keiner Reduktion der transkriptionellen Aktivität von Genen, die Smad-abhängig reguliert werden (PAI-1, GADD45 $\beta$ ).

Der Übergang vom adhärennten zum nicht-adhärennten-Zustand und umgekehrt ist mit Umbauprozessen im Aktin-Zytoskelett der Zelle verbunden, was wiederum einige Aspekte der TGF- $\beta$ -Signalwirkung beeinflussen kann. Für die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN wurden deshalb die Auswirkungen der Zerstörung des Zytoskeletts mittels Cytochalasin D untersucht, einem Pilztoxin, das spezifisch Aktinfilamente depolymerisiert. Auf Zellkulturplastik ausgesäte Panc-1-Zellen wurden mit Cytochalasin D (1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) oder dem dazugehörigem Lösungsmittel DMSO versetzt und eine Stunde später für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt. Nach Isolierung der RNA erfolgte die Bestimmung der Expression von BGN mittels quantitativer RT-PCR (siehe Abb. 21).



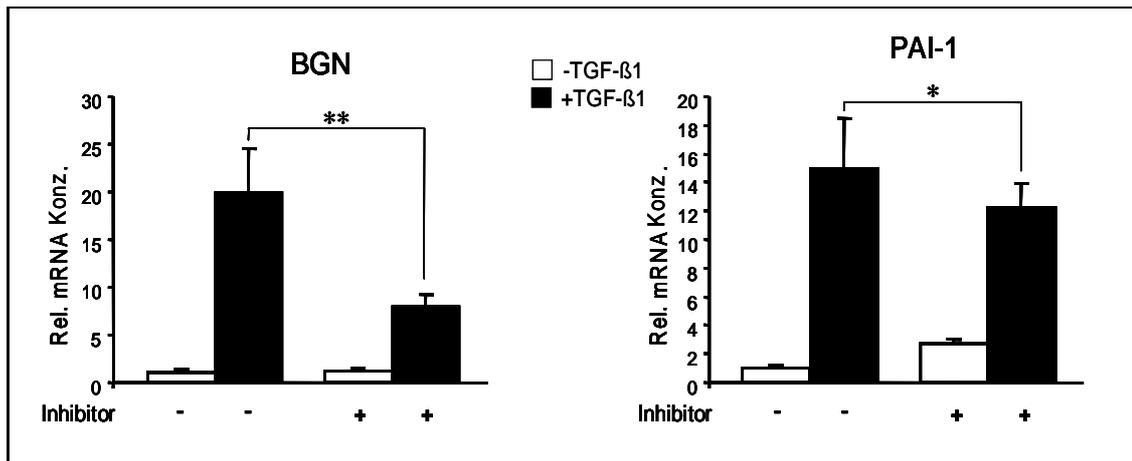
**Abb. 21: Cytochalasin D reduziert sowohl die basale als auch die durch TGF-β1-induzierte BGN-Expression.** Panc-1-Zellen wurden in 6-Well-Schalen (Zellkulturplastik) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von Cytochalasin D oder seinem Lösungsmittel DMSO 1 h vor der 24-stündigen Stimulation mit TGF-β1. Die Expression von BGN wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Der Abbau der Aktin-Stress-Fasern durch Cytochalasin D reduzierte dosis-abhängig sowohl die basale als auch die TGF-β1-induzierte BGN-Expression (siehe Abb. 21). Dieses deutet darauf hin, dass ein intaktes Zytoskelett zumindest für den Teil der TGF-β-Signaltransduktion wichtig ist, der speziell zur BGN Expression führt.

#### **4.1.5 Dominant-negatives Rac1 blockiert die durch TGF-β1-induzierte Expression von BGN durch die Inhibition der p38-Aktivierung**

Rac1 ist ein Mitglied aus der Familie der Rho-GTPasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts und bei Adhäsionsvorgängen. Es sollte untersucht werden, ob Rac1 auch an der adhäsions-abhängigen TGF-β1-Regulation von BGN beteiligt ist. Zunächst erfolgte die Hemmung der Funktion von Rac1 durch einen chemischen Inhibitor (Rac1-Inhibitor), der den Rac1 GDP/GTP-Austausch verhindert, indem er die Interaktion zwischen Rac1 und den Rac1-spezifischen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) stört.

Die Panc-1-Zellen wurden mit dem Rac1-Inhibitor (50 µM) für eine halbe Stunde vorinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Behandlung mit TGF-β1 (+/- TGF-β1). Mittels quantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor den Effekt von TGF-β1 auf die BGN-Expression signifikant reduziert. Die PAI-1-Expression wurde dagegen nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 22).



**Abb. 22: Die pharmakologische Inhibition von Rac1 reduziert die durch TGF-β1-induzierte BGN-Expression.** Panc-1-Zellen wurden nach Zugabe des Rac-1-Inhibitors (+/- Inhibitor, 50 μM) für 24 h sowohl mit als auch ohne TGF-β1 kultiviert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung und die Bestimmung der Expression von BGN und PAI-1 mittels quantitativer RT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von Dreifachwerten. \*\*:  $p < 0,05$ ; \*:  $p = 0,28$  (nicht signifikant).

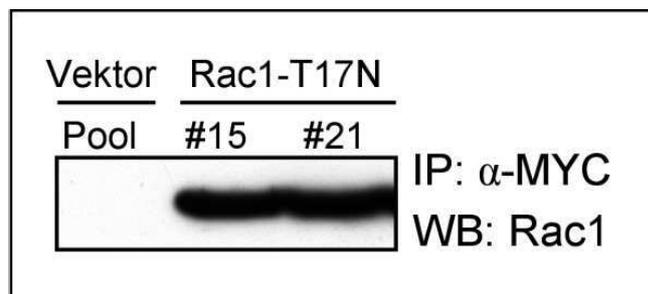
Als nächstes wurden Panc-1-Zellen mit einem Retrovirus infiziert, der für eine Myc-markierte dominant-negative Mutante von Rac1 (dnRac1-T17N in pBABE-puro, Konstruktion, siehe Kap. 3.8) kodierte. Kontrollzellen erhielten Retroviren mit dem entsprechenden Leervektor (pBABE-puro); die Selektion von Einzelklonen oder Zellpools erfolgte durch die Zugabe von Puromycin.

Nach dem Screening der Einzelklone auf die Expression von dnRac1 auf Proteinebene mittels anti-Myc-IP und Rac1-WB-Analyse erfolgte die Auswahl von zwei Klonen mit starker Expression für weitere Analysen (siehe Abb. 23).

**Abb. 23: Überprüfung des Erfolgs der retroviralen Transduktion von Panc-1-Zellen mit einer dnRac1-Mutante.**

Panc-1-Zellen wurden mit einem retroviralen Leervektor (Vektor: pBABE-puro) oder einem Retrovirus, der eine mit Myc-Tag versehene dn Mutante von Rac1 (Rac1-T17N) kodierte, transduziert. Anschließend wurden Einzelklone oder Pools mittels

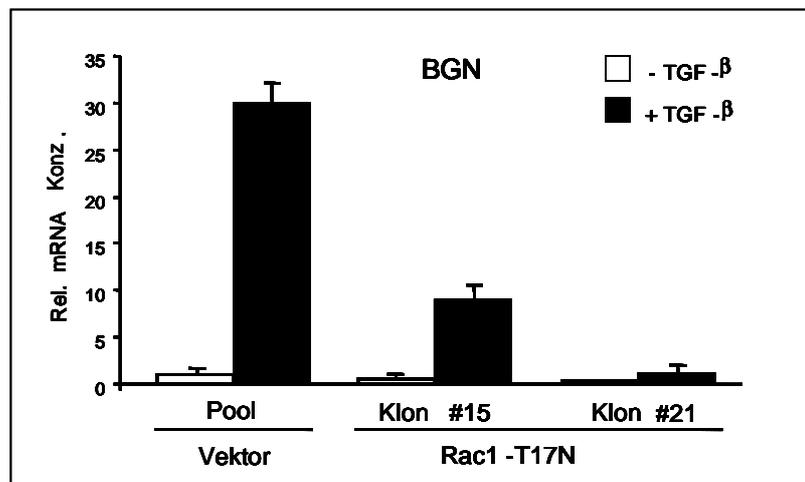
Puromycin selektioniert. Die Expression des Transgens konnte in zwei Klonen (#15 und #21) mittels anti-Myc ( $\alpha$ -Myc) Immunpräzipitation und Westernblot-Analyse (anti-Rac1) nachgewiesen werden.



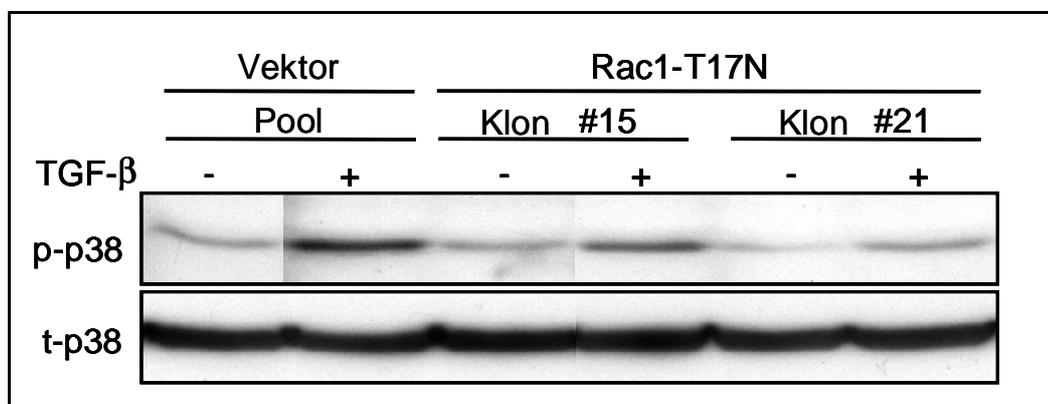
Diese beiden Klone (Klon #15 und #21) und die den Leervektor-exprimierenden Panc-1-Zellen wurde nach TGF-β1-Stimulation für 24 h auf die Expression der BGN-mRNA untersucht. Die Klone wiesen eine starke Verringerung der durch TGF-β1-induzierten Expression von BGN im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (siehe Abb. 24). Am

deutlichsten zeigte sich der Effekt der dn Mutante in Klon 21, der die höchste Transgen-Expression besaß.

**Abb. 24: Die Inhibition (Knock-out) von Rac-1 durch ektope Expression der dn Mutante Rac1-T17N reduziert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression.** Die dn Rac1-exprimierenden Klone #15 und #21 und die Leervektor-transduzierten Kontrollzellen wurden für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 inkubiert. Die Expression von BGN wurde untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment, das einer Serie von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen entnommen wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen.



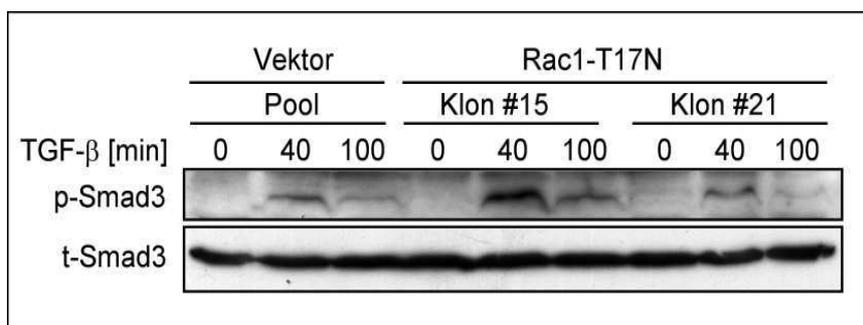
Weiterhin wurde der Phosphorylierungszustand von p38 in den Klonen untersucht, um zu analysieren, ob die Expression von Rac1-T17N auch die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38 inhibiert. Nach einstündiger Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 wurden Zelllysate aus den Klonen #15 und #21 und den Kontrollzellen hergestellt und mittels WB-Analyse auf die Expression von phospho-p38 (phospho-p38-Antikörper, siehe Tabelle 2) untersucht. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, unterdrückt dnRac1 die Aktivierung von p38 durch TGF- $\beta$ 1. Das Ausmaß dieser Suppression in den verschiedenen Zellpopulationen korreliert mit der von BGN (siehe Abb. 24).



**Abb. 25: Dominant-negatives Rac1 verhindert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38 MAPK.** Die beiden Rac1-T17N stabil exprimierenden Einzelklone (#15 und #21) und die Kontrollzellen (Leervektor) wurden für 1 h mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert, lysiert und mittels Westernblot-Analyse auf die Expression von phospho-p38 MAPK (p-p38) und gesamt-p38 (t-p38) MAPK als Beladungskontrolle untersucht.

Zuvor war gezeigt worden, dass es sich bei dem ersten Schritt der Signalwirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression um die durch ALK5 ausgelöste Aktivierung von Smad2/3 und der anschließenden Smad-abhängigen transkriptionellen Induktion von *MyD118* handelt. Da die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38 durch die Rac1-Inhibition unterdrückt wird, wurde untersucht, ob dnRac1 auch Signalvorgänge oberhalb der p38-Aktivierung blockiert. Insbesondere sollte geklärt werden, ob Rac1 für die Smad2/3-Aktivierung und die Induktion von *MyD118* notwendig ist. Da das *MyD118*-Gen durch TGF- $\beta$ 1 in erster Linie über Smad3 induziert wird (Major und Jones, 2004), erfolgte die Untersuchung der GADD45 $\beta$ -Expression und der Smad3-Aktivierung in dnRac1-stabil exprimierenden Panc-1 Zellen nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1. Klon #15, Klon #21 und die Kontrollzellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit TGF- $\beta$  behandelt, lysiert und mittels WB-Analyse auf das Vorhandensein von phospho-Smad3 untersucht. Abb. 26 zeigt, dass die Aktivierung von Smad3 nicht reduziert ist, sondern im Gegenteil in Klon #15 sogar erhöht zu sein scheint.

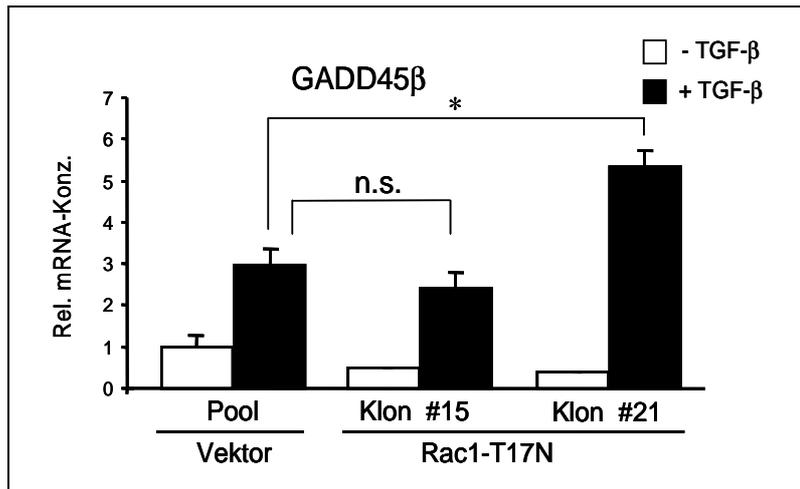
**Abb. 26: Die ektopische Expression von dnRac1 führt in Panc-1-Zellen nicht zu einer Reduktion der Aktivierung von Smad3 durch TGF- $\beta$ 1. Die beiden Rac1-T17N stabil exprimierenden Einzelklone (#15 und**



#21) und die Kontrollzellen (Leervektor) wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit TGF- $\beta$ 1 behandelt und anschließend durch eine Westernblot-Analyse auf die Aktivierung von Smad3 mittels eines phospho-Smad3 spezifischen Antikörpers (siehe Tab. 2) untersucht.

Ein ähnliches Ergebnis konnte für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von GADD45 $\beta$  in den dnRac1-exprimierenden Klonen gezeigt werden. Nach einer einstündigen Inkubation mit bzw. ohne TGF- $\beta$ 1 wurde nach einer quantitativen RT-PCR-Analyse festgestellt, dass es durch die Inhibition von Rac1 zu keiner Reduktion der GADD45 $\beta$ -mRNA-Level kam (siehe Abb. 27). In Klon #21 konnte sogar eine leichte Steigerung der GADD45 $\beta$ -Expression nachweisen werden (siehe Abb. 27).

**Abb. 27: Die Inhibition von Rac-1 durch eine dn Mutante führt nicht zu einer Reduktion des TGF- $\beta$ 1-Effektes auf die GADD45 $\beta$ -Expression.** Die dnRac1-exprimierenden Klone #15 und #21 und die Leervektor-exprimierenden Kontroll-zellen wurden für 1 h mit TGF- $\beta$ 1 inkubiert, die RNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von GADD45 $\beta$  untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment aus einer Serie von drei Experimenten. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. (\*:  $p = 0,004$ ; n.s.: nicht signifikant).

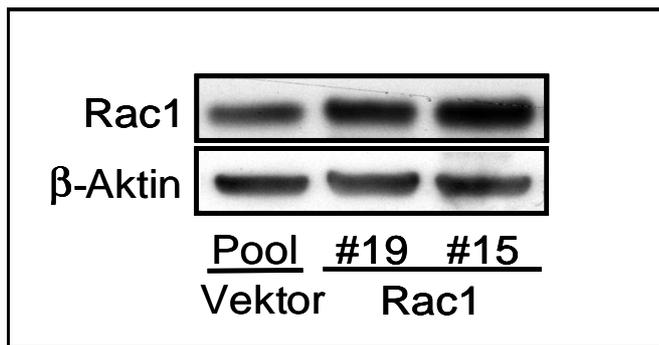


Rac1-T17N blockiert also die Induktion der BGN-Expression auf Ebene von p38, ohne die Aktivierung von Smad3 oder die transkriptionelle Induktion von GADD45 $\beta$  negativ zu beeinflussen.

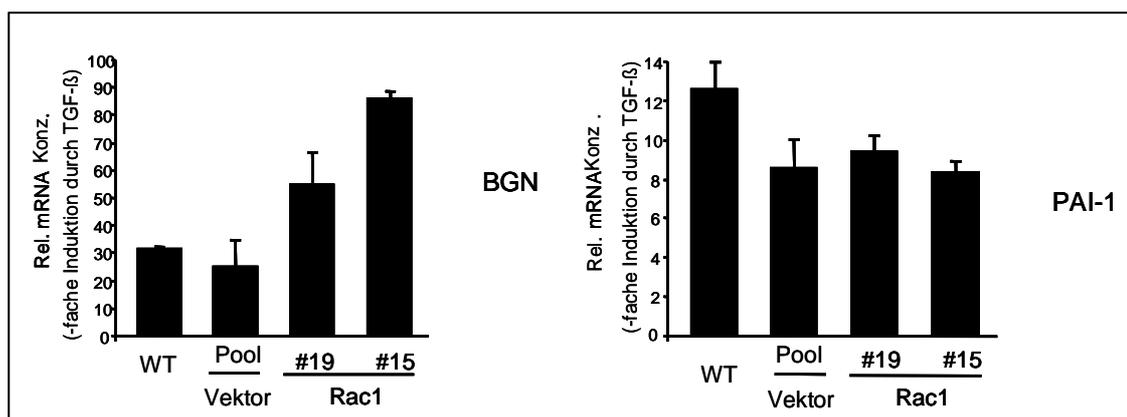
#### 4.1.6 Die ektope Überexpression von Rac1 steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob die ektope Überexpression von Rac1 die Induktion von BGN durch TGF- $\beta$ 1 weiter verstärken kann. Dazu wurden Panc-1-Zellen retroviral mit einem Vektor, der für Rac1 kodierte (Konstruktion, siehe Kap. 3.8), oder mit dem Leervektor (pBABE-puro) transduziert. Im Anschluss an die Transduktion erfolgte eine Selektion von Einzelklonen oder Pools mittels Puromycin. Durch eine WB-Analyse erfolgte ein Screening der Einzelklone auf eine ektope Expression von Rac1 im Vergleich zu den Kontrollzellen (pBABE-puro-exprimierender Zellpool). Wie auf Abb. 28 zu erkennen ist, weisen die Klone eine leicht erhöhte Expression von Rac1 auf. Die Expressionsunterschiede zwischen den Einzelklonen und der Vektorkontrolle waren nicht sehr prägnant, da die Spiegel des endogenen Rac1-Proteins in den Panc-1-Zellen sehr hoch sind (Crnogorac-Jurcevic *et.al.*, 2001). Zwei Klone (#19 und #15) wurden für weitere Analysen ausgewählt (siehe Abb. 28).

**Abb. 28: Nachweis der ectopen Expression von Rac1 in Einzelklonen nach einer retroviralen Transduktion.** Panc-1-Zellen wurden mit einem leeren Retrovirus (Vektor) oder einem rekombinanten Retrovirus infiziert, der für Rac-1 (ohne Tag) kodiert. Nach der Selektion mit Puromycin wurden Einzelklone (#19, #15) isoliert und nach Lyse der Zellen mittels WB-Analyse auf die Expression von Rac1 untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle.



Die mRNA-Expression wurde mit den relativen mRNA-Expressionen der Panc-1-WT-Zellen und den Leervektor-exprimierenden Kontrollzellen nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation verglichen (siehe Abb. 29).

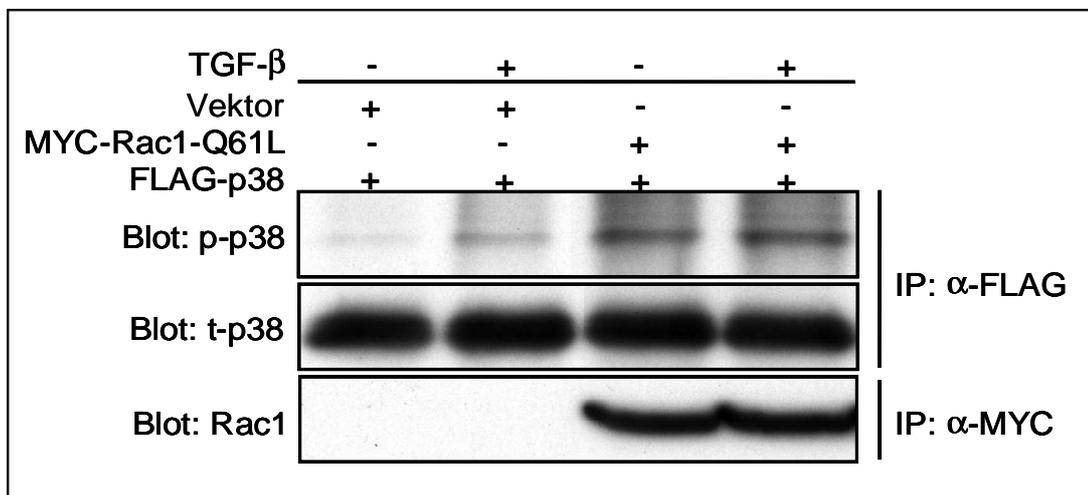


**Abb. 29: Die Überexpression von Rac1 steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression.** Die beiden Rac1-WT exprimierenden Klone #19 und #15 (siehe auch Abb. 28), sowie Panc-1-WT-Zellen und die Vektorkontrolle (Pool) wurden für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt und anschließend, nach der Isolierung der RNA, mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von BGN und PAI-1 untersucht. Die Ergebnisse wurden als x-fache Induktion der rel. mRNA Konzentration durch TGF- $\beta$  dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Wie Abb. 29 zeigt, beeinflusst die ectope Expression von Rac1 nicht die durch TGF- $\beta$ 1-induzierten PAI-1-mRNA Spiegel, was wiederum die Spezifität des Effektes von Rac1 auf die BGN-Expression verdeutlicht.

#### 4.1.7 Konstitutiv-aktives Rac1 kann den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression in nicht-adhärenenten Zellen nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation retten

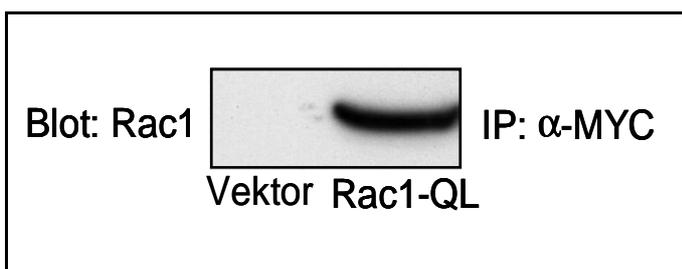
Zuvor wurde gezeigt, dass dnRac1 die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte p38-MAPK-Aktivierung und die Expression von BGN verhindert. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die Effekte von TGF- $\beta$ 1 durch die ektope Expression einer caRac1-Mutante (Rac1-Q61L) imitiert werden können. Aus diesem Grund erfolgte eine Co-Transfektion von Panc-1-Zellen mit Myc-markiertem Rac1-Q61L oder dem Leervektor (pcDNA3) zusammen mit FLAG-markiertem p38. Nach Expression der Proteine wurden die transfizierten Zellen für 1 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt und mittels anti-FLAG-IP und anti-p38-WB-Analyse auf den Phosphorylierungsstatus von p38-MAPK untersucht.



**Abb. 30: Konstitutiv-aktives Rac1 aktiviert p38 MAPK in Panc-1-Zellen ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1.** Panc-1-Zellen wurden transient mit pFLAG-p38 zusammen mit dem Leervektor oder mit Myc-markiertem Rac1-Q61L, einer konstitutiv-aktiven Rac-1 Mutante, co-transfiziert. Nach 24 h erfolgte eine Behandlung der transfizierten Zellen mit TGF- $\beta$ 1 für 1 h, gefolgt von der Lyse der Zellen und einer IP von FLAG- und Myc-markierten Proteinen. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analyse auf die Expression von p-p38 MAPK (p-p38), gesamt-p38 (t-p38) und Rac1 mit den jeweiligen Antikörpern (siehe Tab. 2) untersucht. Der Nachweis von gesamt-p38 diente als Beladungskontrolle.

Wie Abb. 30. zeigt induziert die Expression von caRac1 ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation die Aktivierung von p38. Mittels anti-Myc-IP und anti-Rac1-WB-Analyse wurde die Expression der Mutante auf Proteinebene nachgewiesen. Für weitere Analysen wurden Panc-1-Zellen mit Rac1-Q61L (Konstruktion, siehe Kap. 3.8) und dem dazugehörigen Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Über die Antibiotikum-Resistenz (G-418-resistent) erfolgte die Selektion von Zellpools (siehe Abb. 31).

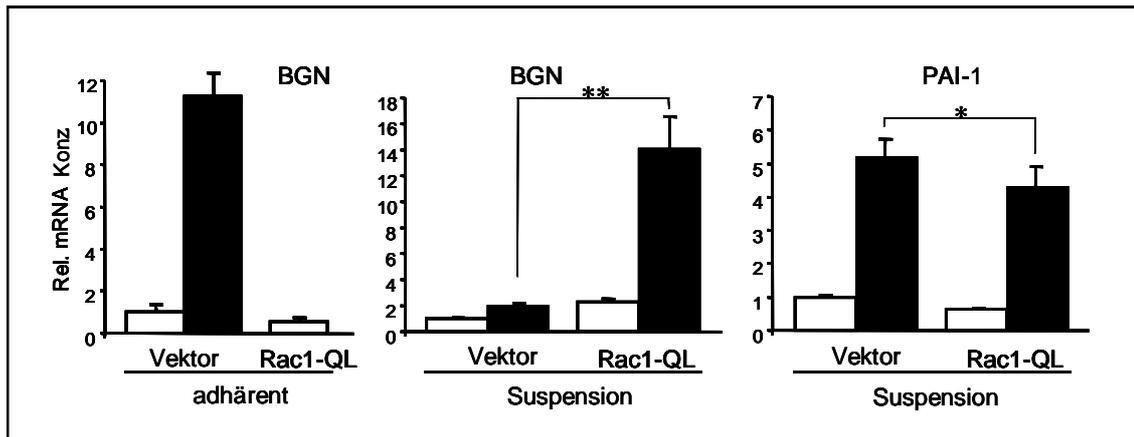
**Abb. 31: Überprüfung der stabilen Transfektion von Panc-1-Zellen mit einer caRac1-Mutante.** Panc-1-Zellen wurden stabil mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3 (Vektor) oder dem rekombinanten Plasmid pcDNA3/Myc-Rac1-Q61L (Rac1-QL) transfiziert. Nach erfolgter Geneticin-Selektion wurden Klon-„Pools“ auf Expression von Rac1-Q61L mittels  $\alpha$ -Myc-IP und  $\alpha$ -Rac1-WB-Analyse untersucht.



Wie auf Abb. 32 zu erkennen ist, konnte mittels quantitativer RT-PCR deutlich gemacht werden, dass die Expression von Rac1-Q61L bei einem Vergleich mit den Kontrollzellen (Leervektor) nicht ausreicht, um die BGN-Expression zu steigern. Dieses lässt vermuten, dass die Signale, die über ALK5 und den Smad-Signalweg geliefert werden, sehr wichtig für den TGF- $\beta$ 1-Effekt sind und zusammen mit aktivem Rac1 die Induktion von BGN vermitteln.

Wenn Rac1 in diesem Prozess die Aufgabe besitzt, p38 zu aktivieren, dann sollten caRac1 und TGF- $\beta$ 1 zusammen in der Lage sein, die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN in nicht-adhären Zellen wiederherzustellen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden caRac1- und Vektor-stabil exprimierende Panc-1-Zellen für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 in Suspension kultiviert.

Tatsächlich konnte durch eine quantitative RT-PCR-Analyse gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Kontrollzellen der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Induktion der BGN-mRNA in den caRac1-stabil exprimierenden Zellen wiederhergestellt war (siehe Abb. 32). Auch in diesem Fall konnte die Spezifität des Effektes für BGN gezeigt werden, da es in der Expression der PAI-1-mRNA zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen kam. Die Expression von PAI-1 war in den caRac1-stabil exprimierenden Zellen bisweilen sogar geringer als in den Kontrollzellen, wobei dieser Effekt allerdings nicht statistisch signifikant war (siehe Abb. 32).



**Abb. 32: caRac1 stellt den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf BGN in nicht-adhärenen Zellen wieder her.** Die Kultivierung von Panc-1-Zellen, die entweder den Leervektor pcDNA3 (Vektor) oder Rac1-Q61L stabil exprimieren, erfolgte unter adhärenen (links) und nicht-adhärenen Bedingungen (Mitte, rechts). Nach Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ 1 für 24 h und anschließender RNA-Isolierung wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression von BGN (links und Mitte) und PAI-1 (rechts) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen. \*\*:p<0,01; \*: p = 0,137

Diese Daten bestätigen das Konzept einer funktionellen Trennung des TGF- $\beta$ /Smad und des Rac1/p38 Signalweges, die beide notwendig für die BGN-Expression sind. Sie zeigen, dass bei gleichzeitiger Aktivierung des Smad-Signalweges die Expression von caRac1 die adhäsions-induzierten Signale ersetzen kann.

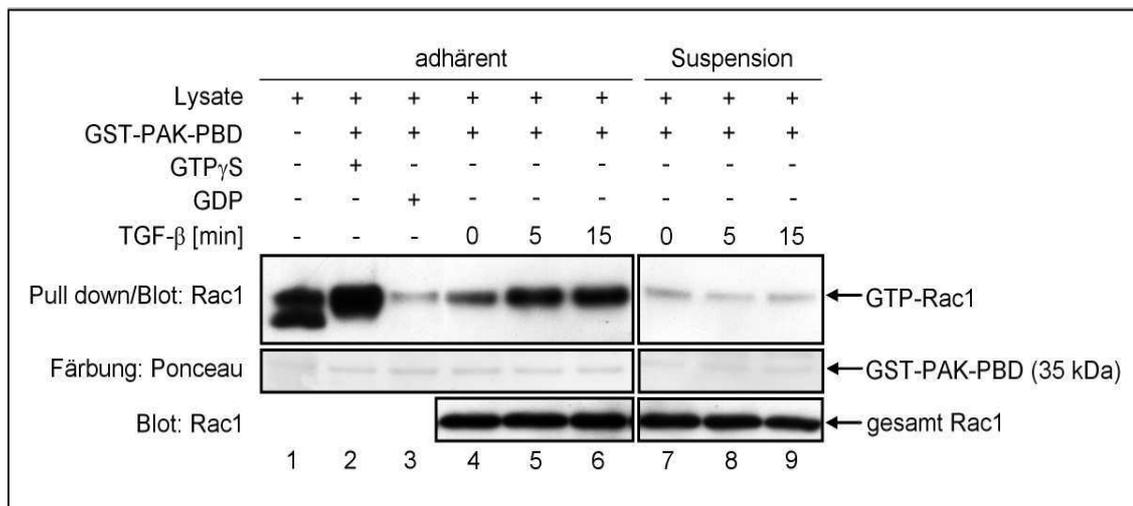
#### 4.1.8 Rac1 wird durch TGF- $\beta$ 1 in adhärenen Zellen, aber nicht in Suspensionszellen aktiviert

Rac1 entfaltet seine biologische Wirkung nach GTP-Beladung, die durch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) katalysiert wird.

Um die Frage zu klären, ob Rac1 in adhärenen Zellen durch Zugabe von TGF- $\beta$ 1 aktiviert wird und ob es an einer fehlenden Rac1-Aktivierung liegt, dass TGF- $\beta$ 1 die Hochregulation der BGN-Expression (und die Aktivierung von p38) in Suspensionszellen nicht auslösen kann, wurde ein Affinitäts-Präzipitations-Assay durchgeführt. In diesem Assay wird ein Fusionsprotein aus der GTPase-bindenden Domäne von humanem PAK1 (PBD) und GST verwendet, das spezifisch an aktives Rac1-GTP bindet. Die am besten charakterisierten Effektorproteine von Rac1 und Cdc42 gehören zur PAK-Familie von Serin/Threonin-Kinasen mit einer Größe von 62-68 kDa, für die gezeigt wurde, dass sie bevorzugt an die GTP-beladene Form dieser Proteine binden (Zhang *et al.*, 1995; Benard *et al.*, 1999).

Adhärente (Spuren 1-6) oder nicht-adhärente Panc-1-Zellen (Spuren 7-9) wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert (siehe Abb. 33), anschließend in dem im Kit mitgelieferten Lysispuffer lysiert und die Lysate wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben weiter prozessiert. Aktiviertes (GTP-beladenes) Rac1 konnte aufgrund seiner Bindungsaffinität für GST-PAK-PBD detektiert werden. Als Kontrolle diente Zelllysat aus unbehandelten adhärennten Panc-1-Zellen und Lysat, das *in-vitro* mit GTP $\gamma$ S (Spur 2) oder GDP (Spur 3) vorbehandelt wurde, um Rac1 vor der Bindung an GST-PAK-PBD zu aktivieren bzw. zu deaktivieren.

In den adhärennt gewachsenen Panc-1-Zellen führte die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 innerhalb von 5 min zu einer Erhöhung der Rac1-Bindung an das GST-PAK-PBD-Fusionsprotein, was bedeutet, dass Rac1 aktiviert wurde (siehe Abb. 33). In den unter nicht-adhärennten Bedingungen kultivierten Panc-1-Zellen konnte weder eine basale noch eine durch TGF- $\beta$ 1-Stimulierung ausgelöste Aktivierung (GTP-Beladung) von Rac1 beobachtet werden (siehe Abb. 33). Die Rac1-Aktivität war hier also inhibiert.



**Abb. 33: Die Beladung von Rac1 mit GTP wird durch TGF- $\beta$ 1 in adhärennten-, aber nicht in Suspensions-Zellen induziert.** *Oben:* 40  $\mu$ g Lysat in Spur 1 und die Hälfte des Volumens der eluierten Proben (Spuren 2-9; adhärennt: Spuren 1-6; nicht-adhärennt: Spuren 7-9) wurden mittels SDS-PAGE und WB-Analyse (Rac1-Antikörper, siehe Tabelle 2) untersucht. *Mitte:* Um zu dokumentieren, dass gleiche Mengen an GST-PAK-PDB (~ 35 kD) geladen wurden, erfolgte eine Ponceau-Färbung der GST-PAK-PBD-gebundenen Proteine. *Unten:* Rac1-WB-Analyse der Gesamtprotein-Lysate. Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 führt nicht zu einer Änderung der gesamt-Rac1-Spiegel.

Durch Verwendung eines Rac1-Antikörpers konnte demonstriert werden, dass die Spiegel an gesamt-Rac1 in den mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten adhärennten und nicht-adhärennten Zellen unverändert waren.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass es in Abwesenheit von Adhäsions-/Integrin-Signalen in nicht-adhärennten Zellen zu keiner GTP-Beladung von Rac1 durch TGF- $\beta$ 1

kommt, so dass es auch zu keiner Induktion der Expression von BGN (und der Aktivierung von p38) kommen kann.

#### 4.1.9 DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression und die p38-Aktivierung

Rac1 wirkt über Protein/Protein-Interaktionen (PAK1) oder als eine der Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase. Es ist wichtig für deren Enzymaktivität und somit auch für die Produktion von ROS („reactive oxygen species“; reaktive Sauerstoffspezies) (Bokoch und Diebold, 2002). ROS können p38-MAPK z.B. in Keratinocyten aktivieren (Chiu, *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob Rac1 als Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zunächst p38-MAPK und als Folge davon BGN aktiviert, wurde die NAD(P)H-Oxidaseaktivität mittels DPI (Diphenyleniodoniumchlorid), einem pharmakologischem Inhibitor der NAD(P)H-Oxidasen, gehemmt. Nach halbstündiger Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen an DPI wurden Panc-1-Zellen für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 stimuliert. Wie oben beschrieben wurde der DPI-Effekt mittels RT-PCR für BGN und PAI-1 ausgelesen.

Wie Abb. 34 zeigt, reduziert dieses Agens dosisabhängig die durch TGF- $\beta$ 1 vermittelte Induktion der BGN-Expression. Dieser Effekt ist spezifisch für BGN, da es bei PAI-1 zu keiner Reduktion kam und eine Konzentration von 10  $\mu$ M sogar den umgekehrten Effekt hatte.

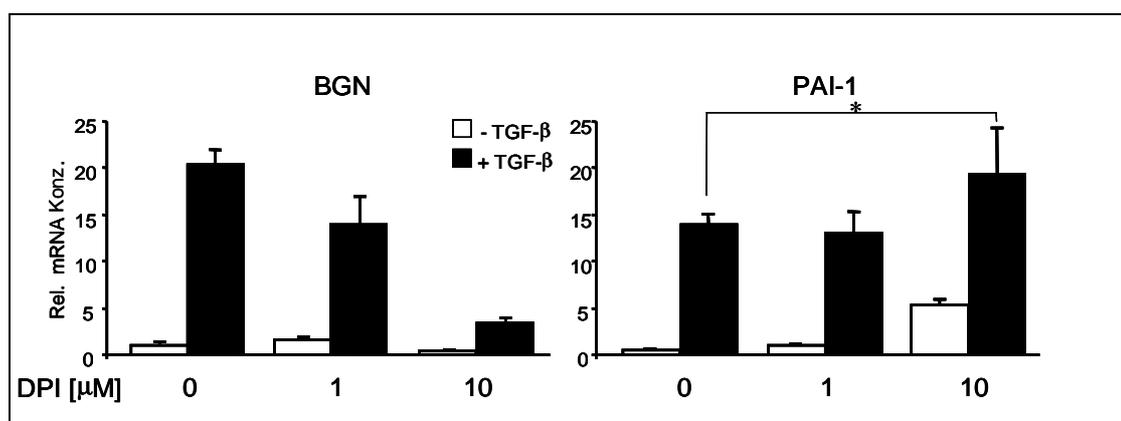
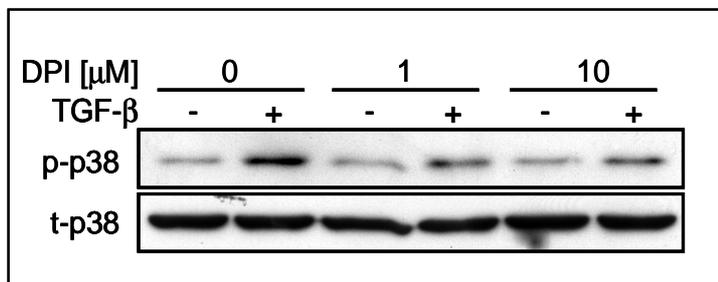


Abb. 34: Der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN. Panc-1-Zellen wurden eine halbe Stunde vor der 24-stündigen Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, mit 1 oder 10  $\mu$ M DPI behandelt. Nach der RNA-Isolierung wurde die Expression von BGN und PAI-1 mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Dieses Experiment wurde zweimal mit nahezu identischen Ergebnissen durchgeführt. In jedem Experiment erfolgten Dreifachbestimmungen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen (\*:  $p = 0,045$ ).

Als nächstes wurden mit DPI versetzte Panc-1-Zellen für 1 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt. Mittels WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass es auch hier durch DPI zu einer Reduktion von phospho-38 kam (siehe Abb. 35).

**Abb. 35: DPI reduziert die Aktivierung von p38-MAPK.**

Panc-1-Zellen wurden nach einer halbstündigen DPI-Behandlung (Konzentrationen: 1 oder 10  $\mu$ M) für 1 h mit TGF- $\beta$ 1 behandelt oder unstimuliert belassen. Nach Lyse der Zellen wurde die Lysate mittels WB-Analyse auf die Phosphorylierung von p38-MAPK

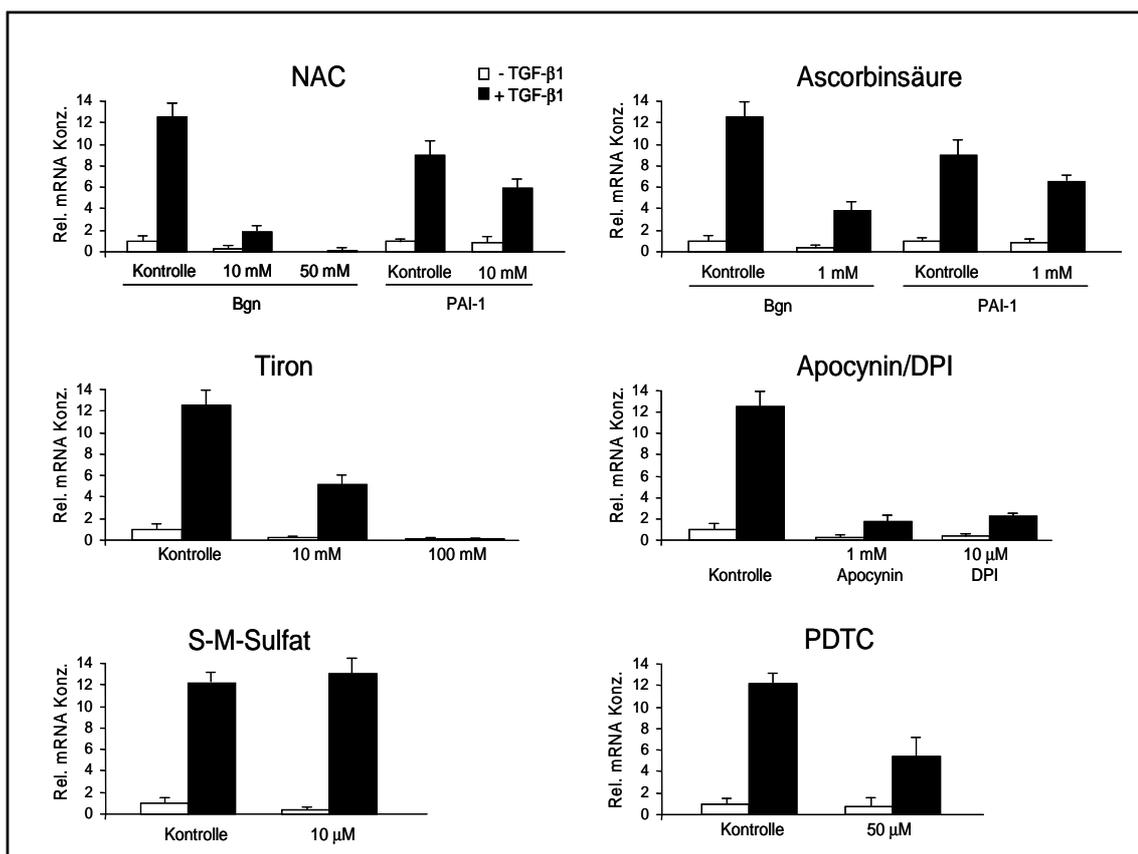


(p-p38) untersucht. Der Nachweis von gesamt-p38 (t-p38) diente als Beladungskontrolle.

#### 4.1.10 Effekte verschiedener Agonisten und Antagonisten der ROS-Produktion auf die TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN

Zur weiteren Klärung der Rolle der ROS-Produktion für die TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression wurden Experimente mit verschiedenen ROS Radikalfängern, Antioxidantien bzw. anderen Chemikalien durchgeführt, die dafür bekannt sind, dass sie die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase direkt oder indirekt beeinflussen. Mittels quantitativer „real-time“-RT-PCR-Analysen wurden nach Behandlung der Zellen die relativen Konzentrationen der BGN- und PAI-1-mRNA bestimmt. Das Antioxidationsmittel N-Acetyl-L-Cystein (NAC) reduziert bei der hier verwendeten Konzentration von 10 mM die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression der BGN-mRNA um 85 %. Bei einer NAC-Endkonzentration von 50 mM ist der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-mRNA-Expression komplett aufgehoben (siehe Abb. 36). Ein ähnlich drastischer Effekt (die Reduktion der TGF- $\beta$ 1 vermittelten BGN-mRNA-Expression) konnte durch die Verwendung von Ascorbinsäure (1 mM) erzielt werden. Der Effekt der beiden Antioxidationsmittel auf die BGN-Expression war in den gleichen Proben deutlich stärker als der Effekt auf die PAI-1-Expression. Auch der Radikalfänger Tiron reduzierte bei einer Konzentration von 10 mM deutlich die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression (siehe Abb. 36). Die mikroskopische Analyse zeigte, dass keine der verwendeten Inhibitorkonzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen hatte. Apocynin, ein Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase, inhibierte bei einer Konzentration von 1 mM die TGF- $\beta$ 1-Induktion der BGN-mRNA im gleichen Ausmaß (86%) wie DPI (10  $\mu$ M), welches als Positivkontrolle verwendet wurde.

Für das BGN-Gen ist bekannt, dass es durch NO („nitric oxide“, Stickstoffoxid) reguliert werden kann (Schaefer *et al.*, 2003). Da einige Effekte von Superoxid an der Inaktivierung des Signalmoleküls Stickstoffoxid beteiligt sind und so zu einer reduzierten NO-Verfügbarkeit führen könnten, wurde der Effekt des iNOS-Inhibitors S-M-Sulfat (10  $\mu$ M) auf die BGN-mRNA-Expression untersucht. Dieser Wirkstoff besaß keinen Effekt auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN. Neben p38-MAPK ist auch NF $\kappa$ B ein weiteres potenzielles redox-sensitives Protein, das durch die von der NAD(P)H-Oxidase gebildeten ROS aktiviert wird (Kamata und Hirata, 1999; Strozyk und Kulms, 2005). Aus diesem Grund wurde der Effekt der Hemmung von NF $\kappa$ B untersucht. Interessant ist, dass der NF $\kappa$ B-Inhibitor Pyrrolidondithiocarbamat (PDTC) bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M teilweise die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-mRNA-Expression hemmt (siehe Abb. 36).

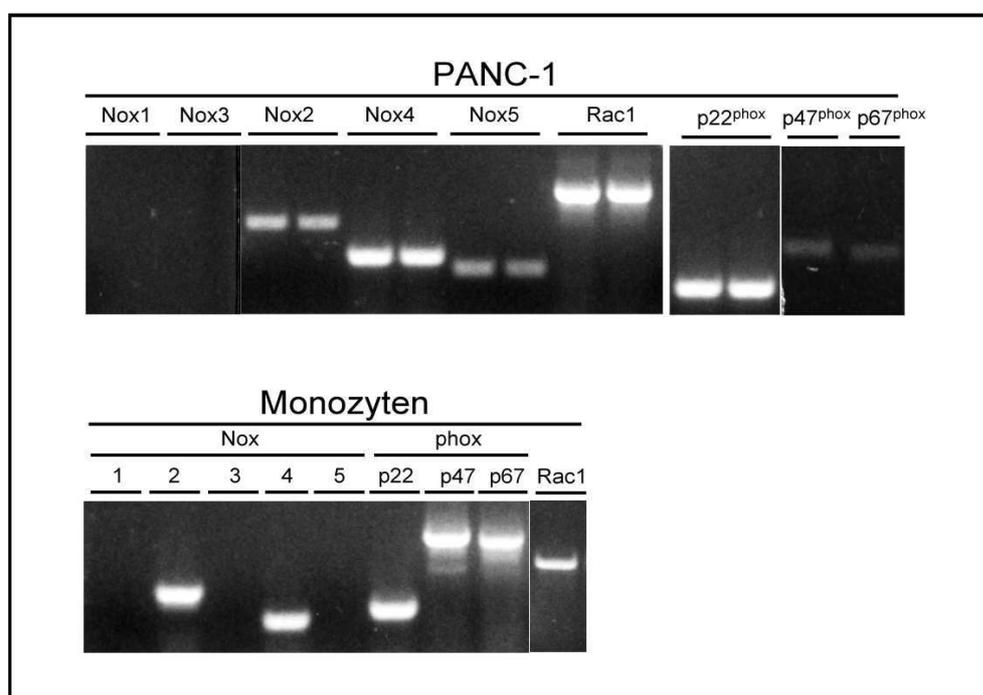


**Abb. 36: Effekte von verschiedenen Antioxidationsmitteln und Inhibitoren der NADPH-Oxidase bzw. redox-sensitiver Proteine auf die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion der BGN-mRNA.** Panc-1-Zellen wurden für 24 h mit TGF- $\beta$ 1 und den angegebenen Substanzen behandelt. Nach Lyse der Zellen und RNA-Isolierung wurden die Proben mittels quantitativer „real-time“-RT-PCR auf die Expression der BGN-mRNA untersucht. Im Fall der Behandlung der Zellen mit NAC und Ascorbinsäure wurde als Positivkontrolle auch die PAI-1-mRNA amplifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA-Konzentrationen und die Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Dieser Befund lässt vermuten, dass NF $\kappa$ B an der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN beteiligt ist. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ROS und das ROS-produzierende Enzym NAD(P)H-Oxidase eine wichtige Rolle in der Regulation der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1 spielen, während NO in den hier untersuchten Zellen keinen Einfluss auf die BGN-Expression besitzt.

#### 4.1.11 Expression von Nox- und phox-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Panc-1-Zellen

Bis jetzt wurden verschiedene nichtphagozytische NAD(P)H-Oxidasen identifiziert, die sich hauptsächlich durch verschiedene Nox-Isoformen unterscheiden. Mittels RT-PCR wurde zunächst untersucht, welche Nox-Isoformen in Panc-1-Zellen exprimiert werden. Interessanterweise exprimieren Panc-1-Zellen alle essentiellen Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase wie Nox2, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> sowie auch Nox4, Nox5 und Rac1 (siehe Abb. 37). Die Untereinheiten Nox1 und 3 konnten weder in Panc-1-Zellen noch in den als Kontrolle verwendeten frisch isolierten Monozyten aus peripherem Blut detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass Panc-1-Zellen die wichtigsten Untereinheiten des nichtphagozytischen Enzyms exprimieren und daher sehr wahrscheinlich die Fähigkeit besitzen, selbst ROS zu produzieren.



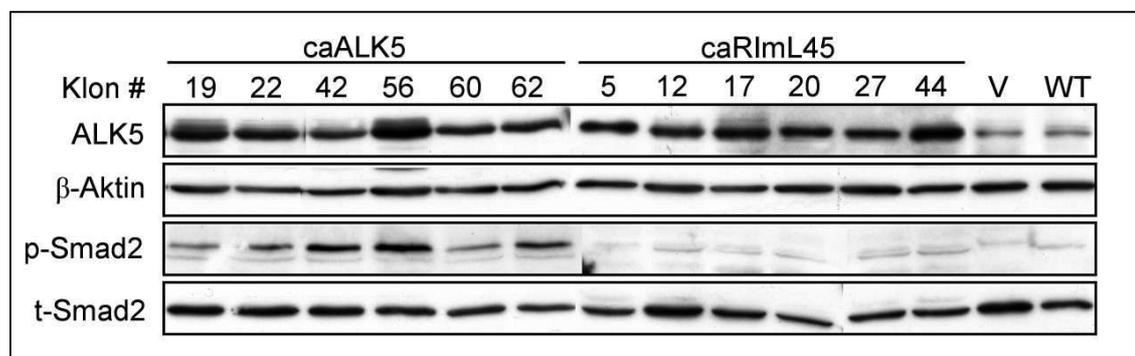
**Abb. 37: Expression verschiedener NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten in Panc-1-Zellen.** Mittels semiquantitativer RT-PCR-Analyse wurden gleiche Mengen an cDNA von Panc-1-Zellen und frisch isolierten Blutmonozyten auf die Expression der verschiedenen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten untersucht. *Oben:* Für Panc-1 wurde das Gel mit Proben aus zwei unabhängigen PCR-Reaktionen für jedes Primerpaar (siehe Kap. 2.10) beladen.

## 4.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ bei der Tumorprogression

### 4.2.1 Charakterisierung der ALK5-Mutante caRIml45 in Bezug auf die Smad- und die p38-MAPK-Aktivierung in Panc-1-Zellen

TGF- $\beta$  kann als Tumorsuppressor und als Tumorpromotor wirken. In einem frühen Stadium der Karzinogenese besitzt TGF- $\beta$  eine antiproliferative Wirkung auf epitheliale und lymphoide Zellen, die allerdings während der Tumorprogression durch verschiedene Mutationen in Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogenen in den meisten Tumoren verloren geht. Hier sollte geklärt werden, inwiefern die durch TGF- $\beta$ 1 vermittelte Aktivierung der ALK5-Kinase bzw. deren Smad-aktivierende Funktion in Pankreaskarzinomzellen an der Tumorsuppression und an der Regulation metastasierungs-assoziiierter Gene *in vitro* und *in vivo* (SCID-Mausmodell) beteiligt ist. Für die *in vitro* Experimente wurde die gut charakterisierte TGF- $\beta$  responsive Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 gewählt, die repräsentativ für ein frühes Tumorstadium ist.

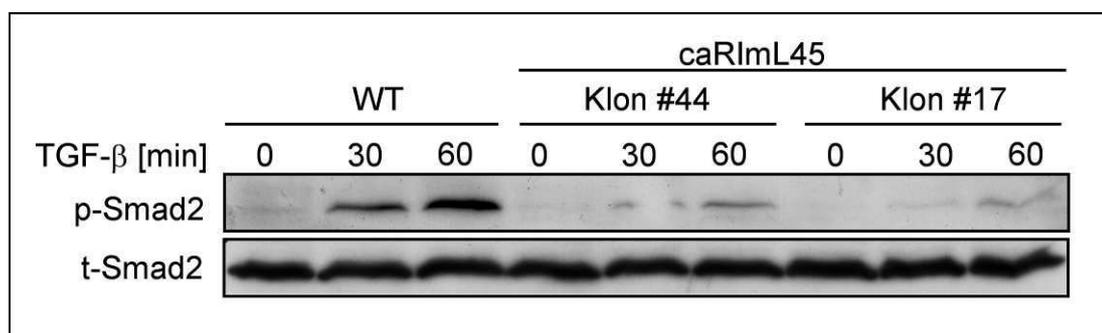
Für Untersuchungen des Effektes von ALK5 (T $\beta$ RI) auf die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Smad-vermittelte Wachstumsinhibition, anti-Angiogenese und die Metastasierung wurden Panc-1-Zellen verwendet, die stabil caALK5 oder caRIml45 exprimieren. Mittels anti-ALK5-WB-Analyse erfolgte zunächst ein Screening der Einzelklone auf die Expression der Mutanten. Wie Abb. 38 zeigt, sind die Proteinspiegel der Mutanten in den Panc-1-Zellen ca. 4-fach höher als die des endogenen Typ I-Rezeptors in den Panc-1-WT-Zellen bzw. den Leervektor-(TJM) exprimierenden Kontrollzellen.



**Abb. 38:** WB-Analyse für ALK5 und phospho-Smad2 (p-Smad2) mit Zelllysaten aus Panc-1-Einzelklonen, die stabil caALK5 oder caRIml45 exprimierten. Die relative Proteinoxpression von ALK5 und p-Smad2 wurde relativ zu den geladenen Mengen von  $\beta$ -Aktin und gesamt-Smad2 (t-Smad2) und durch den Vergleich mit den Leervektor-exprimierenden (V, TJM) Panc-1-Zellen oder den Panc-1-WT-Zellen (WT) beurteilt.

Zur Überprüfung der Funktionalität der beiden Konstrukte wurde ihr Einfluss auf den Smad-Signalweg untersucht. Durch eine WB-Analyse konnte, wie erwartet, gezeigt werden, dass die basalen Spiegel von p-Smad2 in den caALK5 exprimierenden Panc-1-Zellen höher als in den caRImL45-exprimierenden Zellen sind; letztere unterscheiden sich nicht von den Kontrollen (siehe Abb. 38).

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der ektopten Expression von caRImL45 für die Ligand-induzierte Aktivierung von endogenem ALK5 untersucht. Dazu wurden zunächst vier verschiedene caRImL45-stabil-exprimierende Klone für 30 und 60 min mit TGF- $\beta$ 1 behandelt und anschließend die Menge an phosphoryliertem Smad2 mittels WB-Analyse bestimmt. Die Expression von caRImL45 beeinträchtigte effizient die Aktivierung von Smad2, wobei sich die deutlichsten Effekte in den beiden Klonen mit der stärksten Transgen-Expression (#17 und #44, siehe Abb. 39) zeigten. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Mutante caRImL45 in einer dominant-negativen Weise die Smad-Aktivierung durch den endogenen WT-Rezeptor unterdrückt.



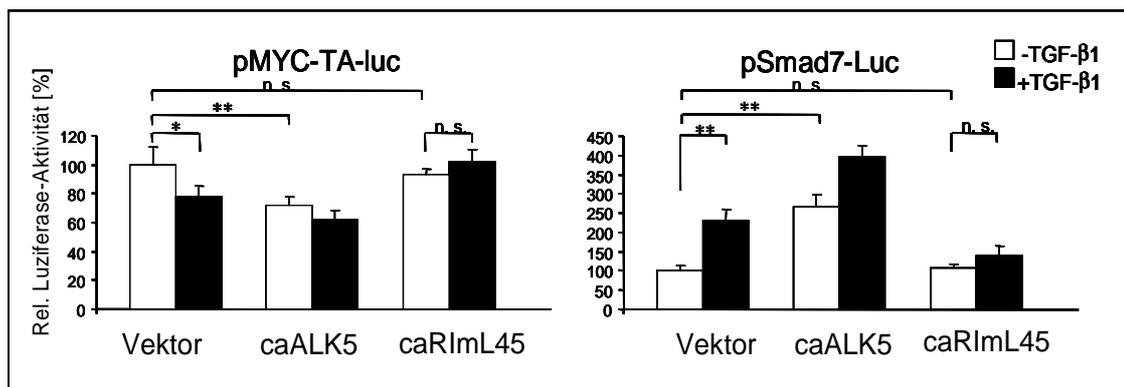
**Abb. 39: Untersuchung der Wirkung von caRImL45 auf die TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von Smad2.** Die Panc-1-WT-Zellen und zwei der caRImL45-stabil-exprimierenden Klone aus Abb.38 wurden unter serum-reduzierten Bedingungen für die angegebenen Zeiten mit TGF- $\beta$ 1 behandelt, lysiert und mittels WB-Analyse auf die Expression von p-Smad2 untersucht. Auch hier wurden die relativen Mengen an p-Smad2 durch einen Vergleich mit der Expression von gesamt-Smad2 abgeschätzt.

#### 4.2.2 Vergleich der Effekte von caALK5 und caRImL45 auf die Smad-abhängige Regulation verschiedener TGF- $\beta$ -responsiver Gene

Um festzustellen, ob die Entfernung der Smad-bindenden Funktion in ALK5 die erwartete Wirkung auf die Genexpression zeigt, wurden transiente Co-Transfektionen mit Smad2/3-responsiven Reportergenen und Expressionsplasmiden für caALK5 und caRImL45 durchgeführt. Wie schon zuvor gezeigt (siehe Kap. 4.1.3), konnte die ektope Expression von caALK5, im Gegensatz zur Expression von caRImL45, die durch

TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung des p6SBE-Luc-Reporters in Panc-1-Zellen imitieren. Um herauszufinden, ob die Expression von caALK5 ausreicht, um das *Myc*-Gen auf Transkriptionsebene zu hemmen (was eine Voraussetzung für die p21<sup>WAF1</sup>-Induktion darstellt (Claassen und Hann, 2000)), wurden transiente Co-Transfektionen mit pMYC-TA-Luc zusammen mit caALK5, caRImL45 oder pcDNA3 (Leervektor) durchgeführt (siehe Kap. 3.6). Wie in Abb. 40 gezeigt, unterdrückt caALK5 die Aktivität des *Myc*-Promotors, während caRImL45 den Effekt von exogenem TGF- $\beta$ 1 abmildert, was erneut auf die dominant-negative Beeinträchtigung der Smad-Signalweiterleitung hindeutet.

Weiterhin konnte mittels Co-Transfektion von pSmad7-Luc (zusammen mit caALK5, caRImL45 oder pcDNA3) und anschließendem Luziferase-Assay (siehe Kap. 3.7) gezeigt werden, dass caALK5, im Gegensatz zu der Mutante mit dem Defekt in der Smad-Bindung, auch die Reporter-Gen-Aktivität des Smad7-Promotors ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1 induziert, was deutlich macht, dass caALK5 die transkriptionelle Induktion dieses Gens durch TGF- $\beta$  in Pankreaszellen nachahmen kann (siehe Abb. 40).

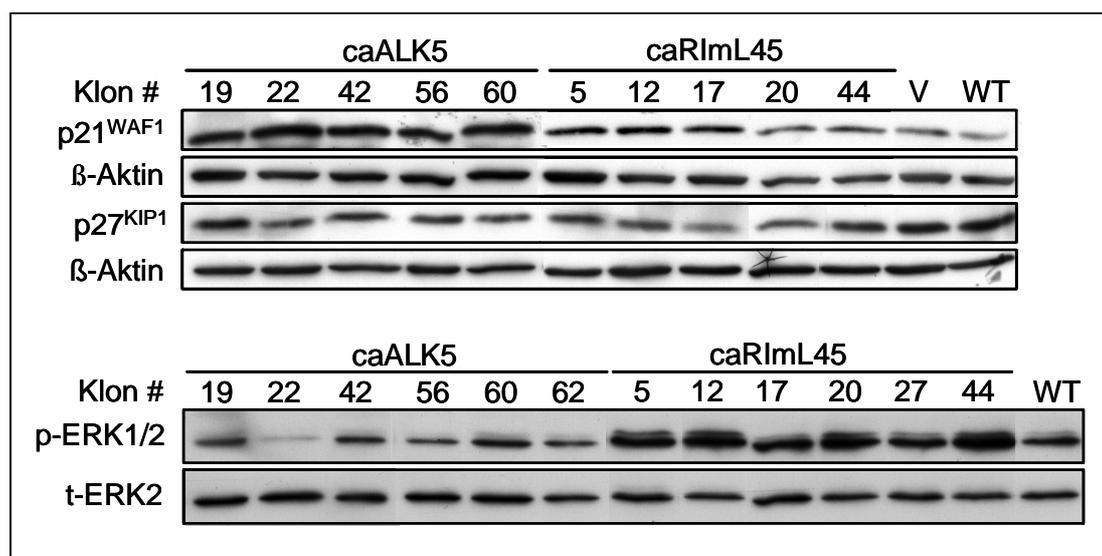


**Abb. 40: Die ektote Expression von caALK5 beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von Myc- und Smad7-Reporter-Gen-Konstrukten.** Panc-1-Zellen wurden mittels Lipofectamine Plus transient mit Myc- oder Smad7-Promotor-Firefly-Luziferase-Fusionsplasmiden und Leervektor, caALK5 oder caRImL45 zusammen mit pRL-TK co-transfiziert: 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 für weitere 24 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und für die Luziferase-Aktivitätsmessung weiterverarbeitet (siehe Kap.3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Wells aus einem von drei durchgeführten Experimenten (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ; n.s.: nicht signifikant).

Die Weiterleitung des TGF- $\beta$ -Signals an den Zellzyklus wird in pankreatischen Zellen primär über die Aktivierung des Smad-Signalweges und der nachgeschalteten Aktivierung der cdk-Inhibitoren p21<sup>WAF1</sup> (Voss *et al.*, 1999) und/oder p27<sup>KIP1</sup> (Boyer und Korc, 2005) vermittelt. Aus diesem Grund wurden die in der Abb. 38 gezeigten Einzelklone mittels WB-Analyse auf die Expression von p21<sup>WAF1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> untersucht. Wie Abb. 41 zeigt, ist caALK5 in der Lage, die Expression des p21<sup>WAF1</sup>-

Proteins ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu induzieren. Die Proteinspiegel waren deutlich höher als die in den caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen und den Kontrollen, während die Expression von p27<sup>KIP1</sup> unbeeinflusst blieb (siehe Abb. 41).

Auch ERK MAPKs sind in die Kontrolle der Zellproliferation durch TGF- $\beta$  involviert (Derynck und Zhang, 2003). Mittels WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass die pERK1/2-Spiegel in den caRImL45-Zellen relativ zu den Vektorkontrollen sogar erhöht waren (siehe Abb. 41), was auf eine direkte Aktivierung von ERK durch die RImL45-Kinase-Domäne oder eine indirekte Aktivierung durch die Derepression der Smad-Inhibition hinweist (siehe Diskussion). Diese Ergebnisse bestätigen, dass verschiedene Proliferations- und Zellzyklus-assoziierte Gene durch TGF- $\beta$ /ALK5 in ihrer transkriptionellen Aktivität modifiziert werden und dass diese Effekte auch durch die aktivierte ALK5-Kinase imitiert werden können.



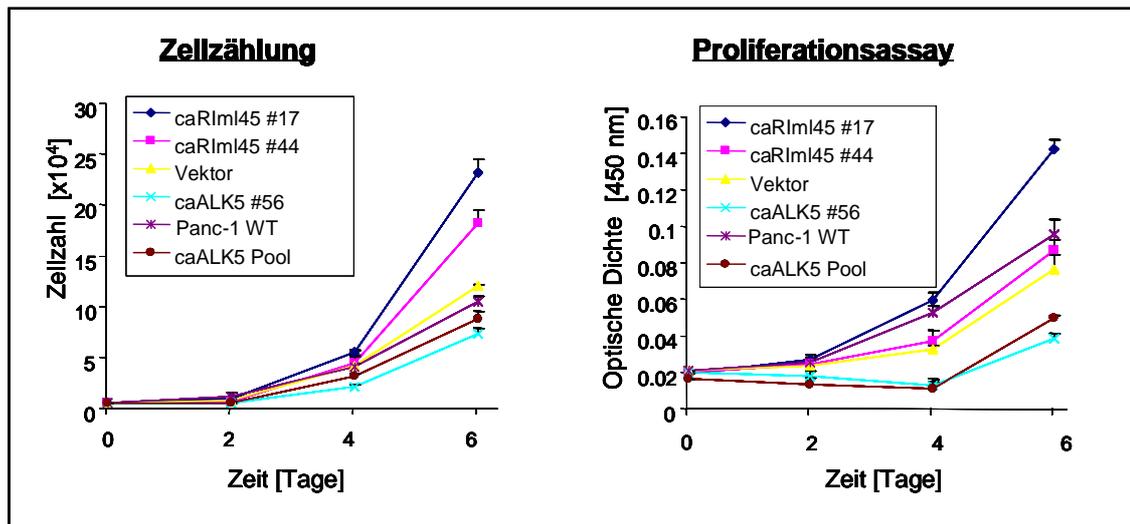
**Abb. 41: Untersuchung des Effektes von caALK5 und caRImL45 auf die Expression von Genen, die an der durch TGF- $\beta$ 1-vermittelten Wachstumsinhibition beteiligt sind.** Eine Reihe von Einzelklonen, die stabil caALK5 oder caRImL45 exprimierten, wurden mittels WB-Analyse auf die Expression der cdk-Inhibitoren p21<sup>WAF1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> und auf die Aktivierung von ERK1/2 mittels eines phospho-ERK-spezifischen Antikörpers (p-ERK, siehe Tabelle 2) untersucht. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin und gesamt-ERK2 (t-ERK2) zeigte, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden (p21<sup>WAF1</sup>- und p27<sup>KIP1</sup>-Antikörper: siehe Tabelle 2).

#### 4.2.3 Die Expression von caALK5 kann den proliferationshemmenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 in Panc-1-Zellen imitieren

Zuvor wurde gezeigt, dass caALK5 den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Smad-abhängige transkriptionelle Aktivierung/Repression von verschiedenen Proliferations- und

Zellzyklus-assoziierten Genen imitieren kann. Zur Überprüfung, ob die ektope Expression der beiden Mutanten, caALK5 und caRImL45, das Wachstumsverhalten von Panc-1-Zellen (ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1) unter Standardkulturbedingungen (Medium mit 10 % FCS) beeinflusst, wurde die Zellproliferation mittels Zellzählung und Proliferations-Assay (EZ4U) charakterisiert. Die Zellzahl der Panc-1-WT-Zellen und der caRImL45-exprimierenden Zellen stieg innerhalb von sechs Tagen deutlich schneller an als die Zellzahl der caALK5-exprimierenden Zellen (siehe Abb. 42).

Durch Messung der mitochondrialen Aktivität, die auf Veränderungen im ATP-Verbrauch basiert, wurden mittels eines Proliferations-Assays (EZ4U) ähnliche Ergebnisse erzielt. Die beiden Klone, die die höchsten Spiegel an caRImL45 exprimierten (Klon #17 und #44), wuchsen schneller als die WT-Zellen (siehe Abb. 42).



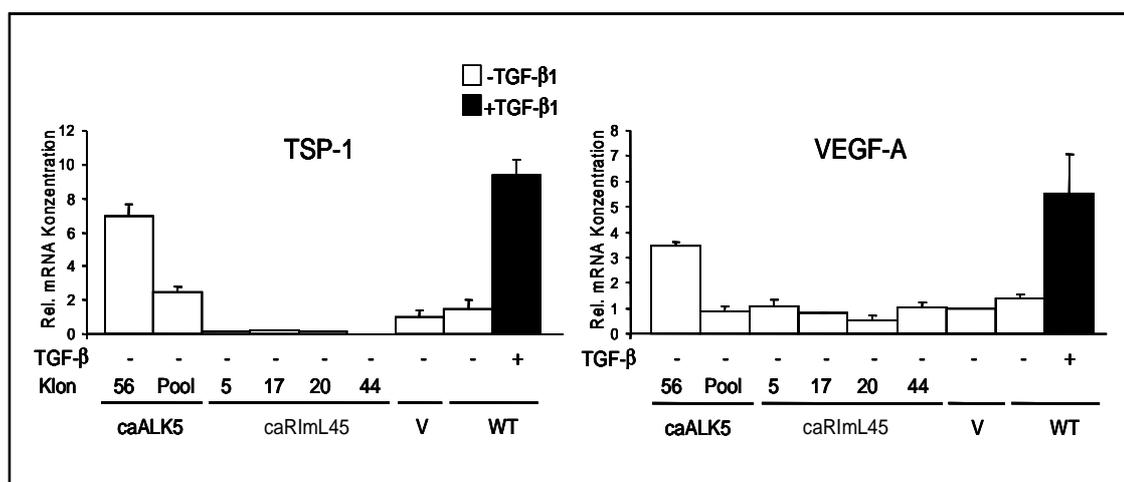
**Abb. 42: Die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 ist notwendig für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Wachstumsinhibition.** *Links:* Die Zellen ( $0,5 \times 10^4$ ) der untersuchten Einzelklone wurden in 12-Well-Platten in normalem Wachstumsmedium ausgesät, bis zu den angegebenen Zeitpunkten inkubiert und anschließend trypsiniert und gezählt. Der Zeitpunkt sechs Stunden nach der Anheftung der Zellen galt als Tag 0. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus jeweils drei Wells. *Rechts:* Die gleichen Einzelklone und die Kontrollen (Panc-1-WT und Vektor (TJM)) wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Alle zwei Tage wurde das EZ4U-Reagenz zu dem Medium in jedes Well gegeben. Nach einer Inkubationsperiode von 4 h wurde die OD bei 450 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils sechs parallel behandelten Wells.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass neben der Kinase-Aktivität auch die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 für den antiproliferativen Effekt benötigt wird, was sich auch in der Smad-abhängigen Regulation von verschiedenen wachstumskontrollierenden Genen widerspiegelt.

#### 4.2.4 Die Expression von caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene, die in die Neoangiogenese, EMT und Invasion/Metastasierung involviert sind

Für Smad-vermittelte TGF- $\beta$ 1-Signale wurde gezeigt, dass sie eine tumor-supprimierende Funktion besitzen, in dem sie die Neoangiogenese inhibieren (Schwarte-Waldhoff *et al*, 2000). TGF- $\beta$ 1 induziert dabei sowohl die Expression von VEGF-A, einem wichtigen pro-angiogenen Faktor als auch die Expression von Thrombospondin-1 (TSP-1), einem Inhibitor des Tumorzellwachstums und der Angiogenese. Für TSP-1 wurde gezeigt, dass es VEGF-A-vermittelte Wirkungen antagonisieren kann (Lawler, 2000; Bornstein, 2001).

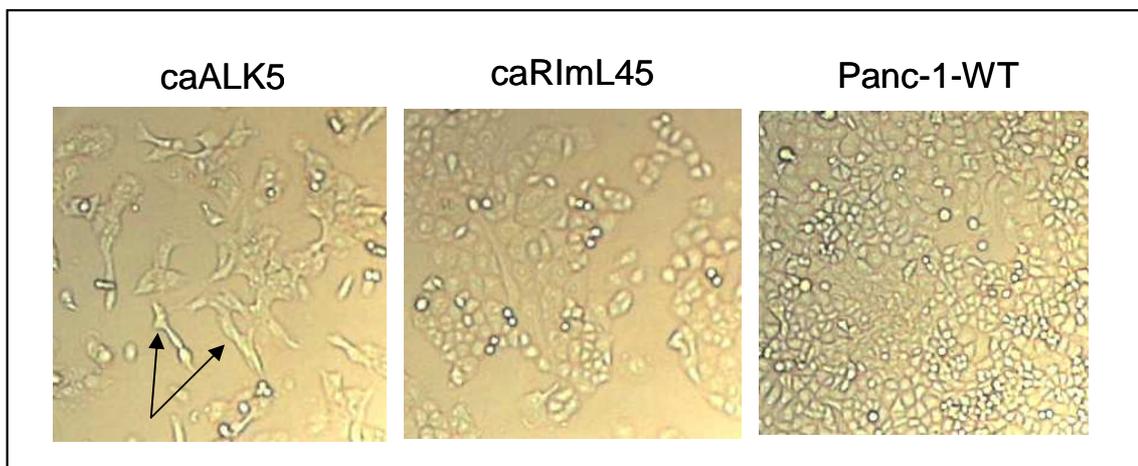
Mittels quantitativer real-time PCR (siehe Kap. 3.3.4) und den entsprechenden Primern (siehe Kap. 2.10) wurden die relativen Expressionsspiegel von TSP-1 und VEGF-A ermittelt. In unstimulierten Kontrollzellen betrug das Verhältnis von TSP-1/VEGF-A annähernd 1, während es in den caALK-exprimierenden Zellen (Klon #5 und Pool) deutlich  $>1$  und in allen der caRimL45-exprimierenden Klone  $\ll 1$  war (siehe Abb. 43).



**Abb. 43: caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Marker der Neoangiogenese.** Die Expression von TSP-1 und VEGF-A wurde nach der RNA-Isolierung aus den angegebenen caALK5-, caRimL45-, den Leervektor (V)-exprimierenden Klonen und den Panc-1-WT-Zellen mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt. *Links:* die caALK5-exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen und den caRimL45-exprimierenden Zellen erhöhte Spiegel an TSP-1-mRNA. *Rechts:* Es konnte eine Induktion der VEGF-A-mRNA in den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Panc-1-WT-Zellen und in dem Klon #56, der stabil caALK5 exprimierte, beobachtet werden. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA-Konzentrationen und die Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung von Smads in diesem Zellsystem eher zu einer anti-angiogenen Wirkung führt (siehe auch Diskussion).

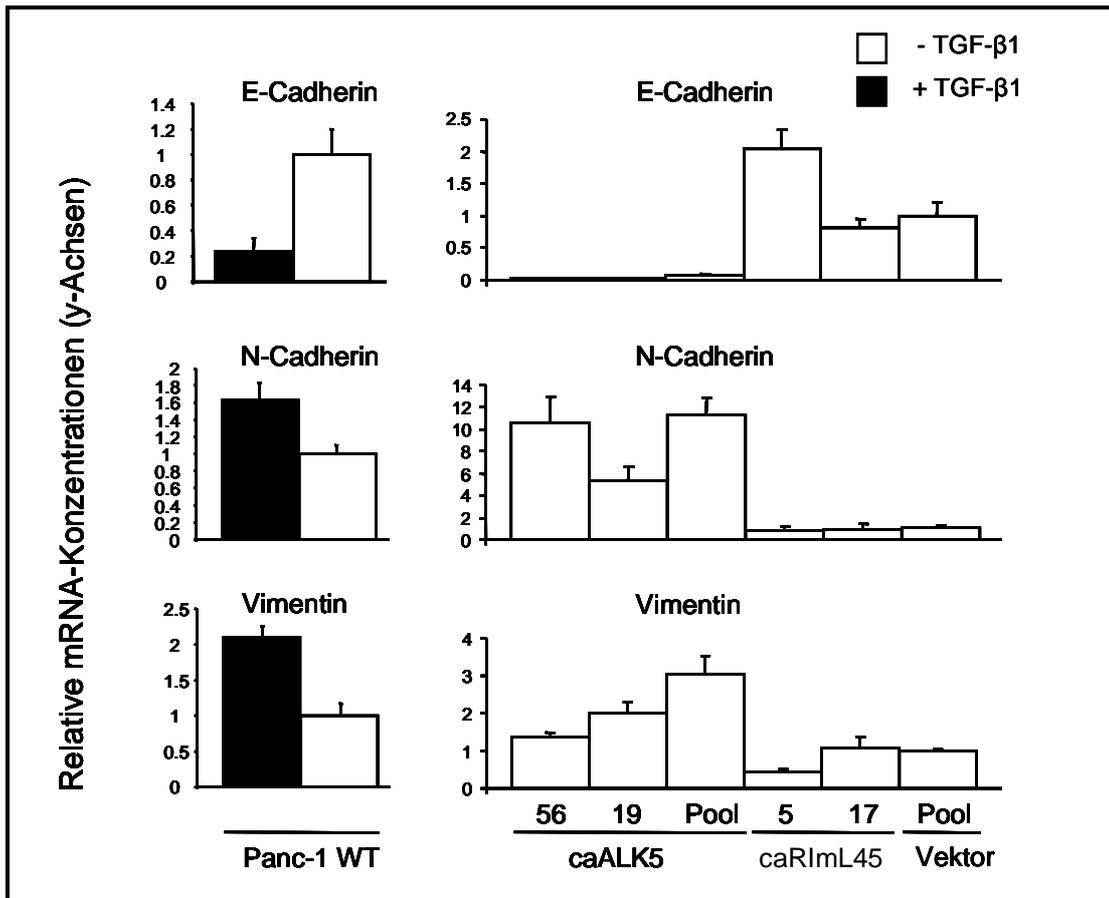
In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Panc-1-Zellen auf TGF- $\beta$ -Behandlung *in vitro* mit EMT und einer moderaten Zunahme des migratorischen und invasiven Verhaltens reagieren (Ellenrieder *et al.*, 2001a). Allerdings war der Beitrag der Smad-Signalwirkung für die EMT umstritten, da kürzlich berichtet wurde, dass Smad4 für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT in einer anderen Pankreaskarzinomzelllinie, Colo-357, und in HaCaT Keratinozyten (Levy und Hill, 2005) keine Bedeutung hat. Interessanterweise konnte das klassische morphologische Merkmal der EMT, die spindelförmige Gestalt, nur in den caALK5-stabil-exprimierenden Zellen und nicht in den caRImL45-exprimierenden Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 44).



**Abb. 44:** Die caALK5-exprimierenden Zellen weisen morphologische Merkmale der EMT auf. Lichtmikroskopische Darstellung repräsentativer Zellrasen-Ausschnitte von Panc-1-caALK5 (Klon #56), Panc-1-caRImL45 (Klon # 44) bzw. der Panc-1-WT-Zellen (100-fache Vergrößerung).

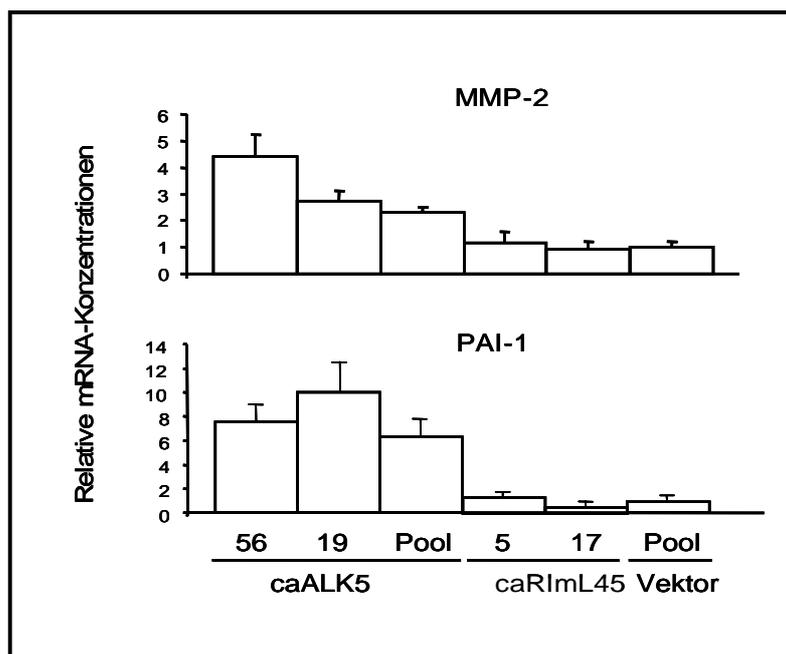
Außerdem konnte mittels real-time RT-PCR für die mit TGF- $\beta$ 1 stimulierten Panc-1-WT-Zellen und die caAKL5-Zellen eine Reduktion in der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin gezeigt werden (siehe Abb. 45).

Gleichzeitig konnte eine Zunahme der Expression der mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin beobachtet werden (siehe Abb. 45; Nakajima *et al.*, 2004). In den caRImL45-exprimierenden Zellen traten diese Veränderungen nicht ein, wobei in einem der Klone (#5) sogar ein gegenläufiger Trend in der Regulation dieser Gene zu beobachten war (siehe Abb. 45).



**Abb. 45: Expression von EMT-Markern in TGF-β1 behandelten WT-, unbehandelten caALK5- und caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen.** Es wurde RNA aus Panc-1-WT-Zellen, die für 24 h mit TGF-β1 behandelt waren, und RNA aus caALK5-, caRImL45- und Leervektor-exprimierenden Panc-1-Zellen mittels quantitativer real-time RT-PCR auf die Expression von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA-Konzentrationen und die Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen nach Normalisierung auf die beiden „housekeeping“-Gene β-Aktin und TATA-box binding Protein.

Es ist bekannt, dass die Behandlung von Panc-1-Zellen mit TGF-β1 zu einer starken Induktion der Expression und Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)-System führt. Letzteres besteht aus uPA und PAI-1, wobei PAI-1 im duktalem Pankreaskarzinom überexprimiert wird (Rowland-Goldsmith *et al.*, 2002). Werden MMP-2 und uPA/PAI-1 inhibiert, dann kommt es zu einer signifikanten Reduktion der durch TGF-β1-induzierten Invasivität dieser Zellen (Ellenrieder *et al.*, 2001a). Aus diesem Grund wurden Panc-1-caALK5 (Klone #56, #19 und Pool), Panc-1-caRImL45 (Klone #17, #44) und Panc-1-TJM durch quantitative real-time PCR-Analysen auf die relative mRNA-Expression von MMP-2 und PAI-1 untersucht.



**Abb. 46: caALK5 initiiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene der Metastasierung.** Es wurde RNA aus denselben caALK5- und caRImL45-exprimierenden Klonen wie in Abb. 46 isoliert und im Vergleich zu der RNA aus den Vektorkontrollzellen mittels quantitativer real-time RT-PCR auf die Expression von MMP-2 und PAI-1 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA-Konzentrationen und die Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen nach Normalisierung auf die beiden „housekeeping“-Gene  $\beta$ -Aktin und TATA-box binding Protein.

Abb. 46 zeigt, dass die Expression von MMP-2 und PAI-1 in den caALK5-exprimierenden Zellen (hauptsächlich Klone #56 und #19) im Vergleich zu den Vektorkontrollen und den caRImL45-exprimierenden Zellen erhöht war. Offenbar kann also caALK5 ein Genexpressionsprofil induzieren, das charakteristisch für Zellen mit erhöhtem invasiven Potential ist.

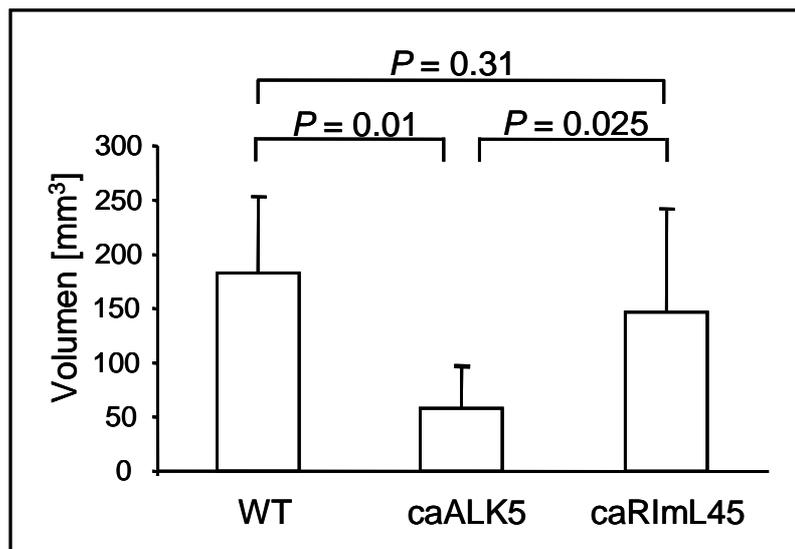
#### **4.2.5 ALK5 supprimiert zwar das Tumorwachstum, steigert aber gleichzeitig die Metastasierung in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell des duktaalen Pankreasadenokarzinoms**

Der Effekt der ektopen Expression von caALK5 und caRImL45 auf das Wachstum der Panc-1-Zellen wurde auch *in vivo* in einem orthotopen SCID-(„severe combined immunodeficiency disease“) Maus-Modell untersucht. Zellen von jeweils acht Einzelklonen jedes Konstruktes wurden im gleichen Verhältnis gemischt und in das Pankreas von immundefizienten Mäusen injiziert. Nach 28 Tagen wurden die Tumore chirurgisch entfernt und deren Volumen, Proliferationsindex und Kapillardichte

bestimmt. Die Tumore der Panc-1-WT-Zellen waren etwas größer (Mittelwert: 183 mm<sup>3</sup>, SD: 71 mm<sup>3</sup>) als die der caRImL45-transduzierten Zellen (Mittelwert: 147 mm<sup>3</sup>, SD: 95 mm<sup>3</sup>). Allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ( $p=0,31$ ) (siehe Abb. 47). Im Gegensatz dazu waren die Tumore, die aus den caALK5-exprimierenden Panc-1-Zellen entstanden waren (Mittelwert: 58 mm<sup>3</sup>, SD: 39 mm<sup>3</sup>), signifikant kleiner als die aus den WT-Zellen ( $p=0,01$ ) und die aus den caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen entstandenen Tumore ( $p=0,025$ ) (siehe Abb. 47).

**Abb. 47:** Durchschnittliches Tumolvolumen von orthotop gewachsenen Panc-1-Zellpools (n=6 Mäuse/Gruppe) in SCID-Mäusen nach 28 Tagen.

Oben: Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der jeweiligen Tumolvolumina. Die p-Werte wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests errechnet und deuten auf eine signifikante Wachstumsinhibition durch die ektope Expression von caALK5 hin.

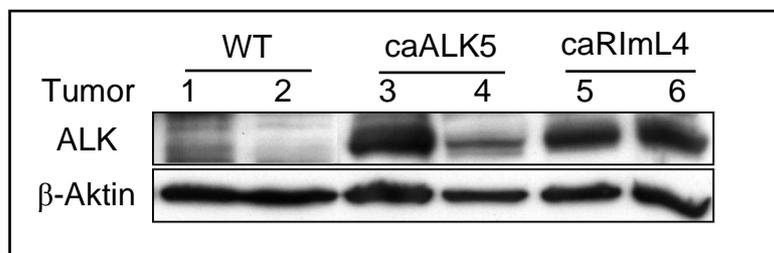


Bei allen Xenograft-Tumoren, die von den unterschiedlichen Genotyp-Gruppen der Panc-1-Zellen gebildet wurden, handelte es sich um mäßig bis schlecht differenzierte Adenokarzinome.

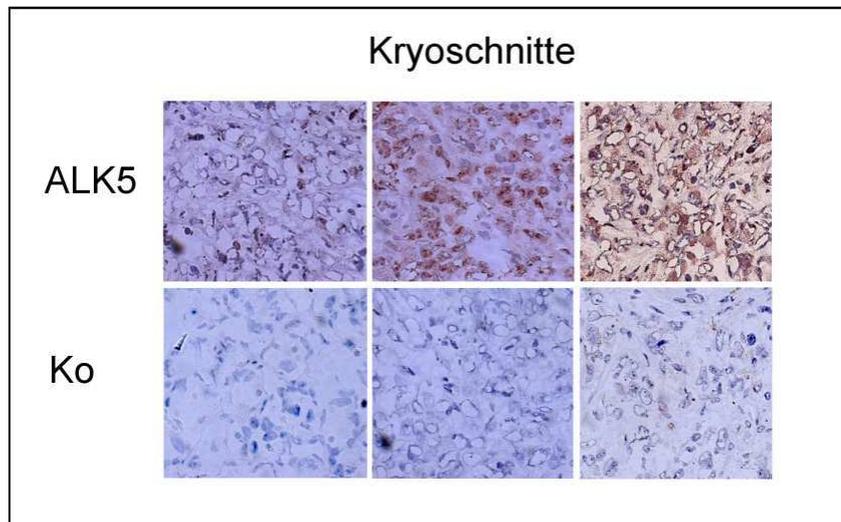
**Abb. 48:** Expression der ALK5-Mutanten in den Xenograft-Tumoren.

Lysate aus Tumorgewebe von jeweils zwei Mäusen aus jeder Gruppe wurden mittels WB-Analyse auf die Expression von ALK5 untersucht, um zu zeigen,

dass die ALK5-Mutanten auch *in vivo* weiter exprimiert werden. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Beladungskontrolle

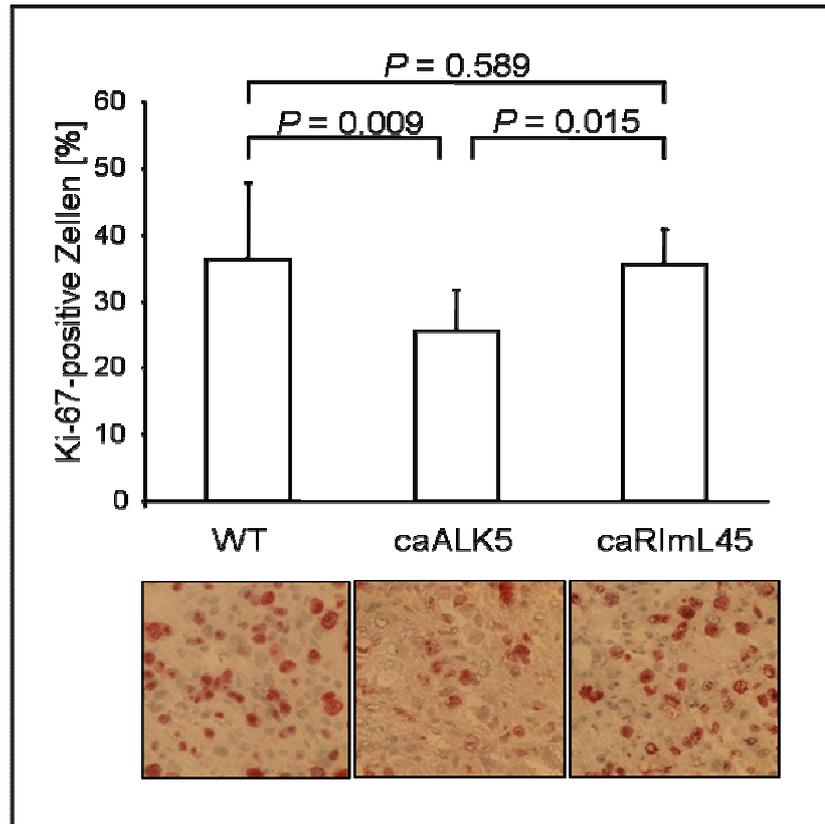


Durch WB-Analyse (Abb. 48) und Immunhistochemie (Abb. 49) konnte bestätigt werden, dass die ALK5 Mutanten in den von Panc-1-caALK5 und -caRImL45 generierten Tumoren nach wie vor exprimiert wurden.



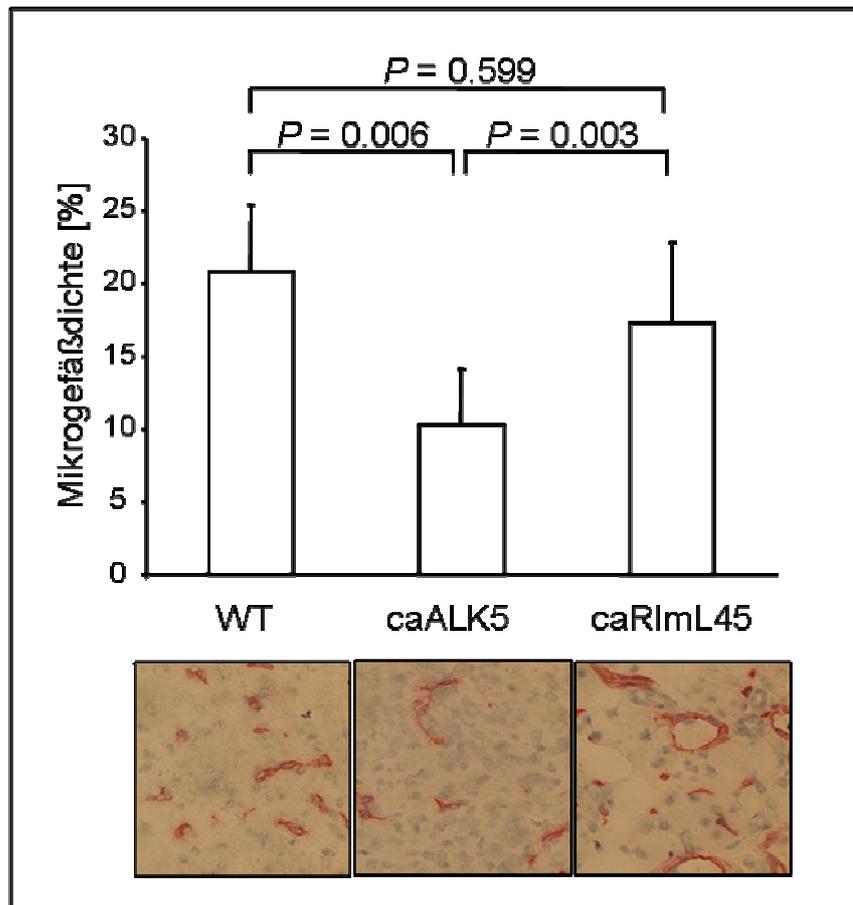
**Abb. 49: Immunhistochemischer Nachweis von ALK5 in Schnitten eines Tumors, der aus den caALK5-exprimierenden Panc-1-Zellen entstanden ist (Panc-1-caALK5 Tumor #3).** Die Färbung erfolgte wie in Kap. 3.10.1 beschrieben. Co: Kontrolle (Kaninchenserum). 400-fache Vergrößerung.

Um ein Maß für die Proliferationsaktivität der Tumorzellen in den Xenograft-Tumoren zu erhalten, wurden Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt (siehe Kap. 3.10.1). Die Ki-67-Färbung war in den zentralen Regionen der Tumore schwächer und in den Randregionen stärker ausgeprägt, wobei die von den Panc-1-RImL45 und den Panc-1-WT-Zellen abstammenden Tumore einen höheren mitotischen Index aufwiesen als die Tumore, die sich aus den caALK5-exprimierenden Zellen entwickelten (siehe Abb. 50).



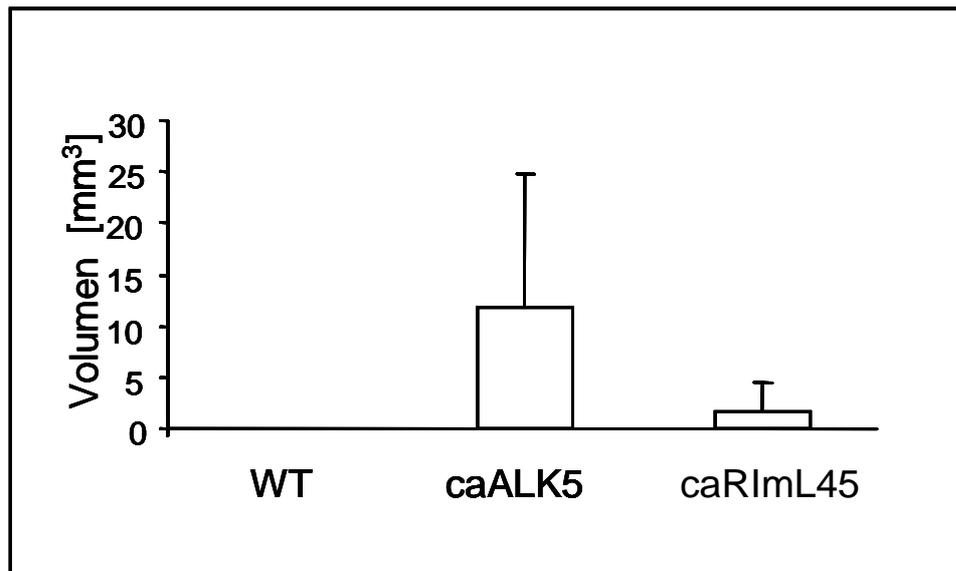
**Abb. 50: Mitotischer Index der von Panc-1-caALK5-, Panc-1-caRImL45-exprimierenden und Panc-1-WT-Zellen abstammenden Tumore.** Der Proliferationsindex der Tumore wurde nach Färbung des nukleär lokalisierten Ki-67-Antigens (Anfärbung der Zellkerne) mit Hilfe der APAAP-Methode (siehe Kap. 3.10.1) durch Auszählen von 200 Tumorzellen in drei „hot spots“ jedes Kryoschnittes bei einer 400-fachen Vergrößerung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

Auch die Dichte der Kapillaren, die durch die immunohistochemische Darstellung des endothelialen Markers CD31/PECAM-1 abgeschätzt wurde (siehe Kap. 3.10.1), war in den Tumoren, die von den caALK5-exprimierenden Panc-1-Zellen abstammten, geringer als in den Tumoren aus den Kontrollzellen. Das deutet darauf hin, dass die Angiogenese in diesen Tumoren reduziert war (siehe Abb. 51). Dieses steht im Einklang mit der geringeren Tumorgöße und der gesteigerten Expression des Angiogenese-Inhibitors TSP-1 in diesen Zellen *in vitro*.



**Abb. 51:** Färbung von Kryoschnitten aus den in Abb. 47 gezeigten Tumoren mit CD31 zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte. Es wurde die Anzahl der Mikrogefäße pro Gesichtsfeld in fünf „hot spots“ jedes Schnittes bei einer 400-fachen Vergrößerung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD in Prozent.

Interessanterweise bildeten die von Panc-1-caALK5-Zellen abstammenden Tumore zahlreiche Lebermetastasen aus (siehe Abb. 52). Fünf der sechs Mäuse, denen Panc-1-caALK5-Zellen eingespritzt wurden, wiesen große Metastasen auf (mittlere Größe:  $11,9 \text{ mm}^3$ ; SD:  $13 \text{ mm}^3$ ). Im Gegensatz dazu waren die Mäuse, denen die Panc-1-WT-Zellen injiziert wurden, metastasenfrem und nur zwei von sechs Mäusen, denen die caRImL45-exprimierenden Zellen injiziert wurden, wiesen kleine metastatische Läsionen auf (mittlere Größe:  $1,8 \text{ mm}^3$ ; SD:  $2,8 \text{ mm}^3$ ). In anderen Organen wurden keine Metastasen gefunden.



**Abb. 52: Mittleres Volumen der Lebermetastasen.** Dargestellt ist das mittlere Volumen der Lebermetastasen, die von den Tumoren der in die SCID-Mäuse injizierten Zellen (Panc-1-WT, Panc-1-caALK5, Panc-1-caRIm45) abstammen. Die WT-Zellen waren metastasenfrem. 5/6 der mit Panc-1-caALK5 injizierten Mäuse hatten große Metastasen, während 2/6 der mit Panc-1-RImL45 transplantierten Mäuse metastatische Läsionen geringer Größe aufwiesen.

Ingesamt zeigen die in dieser Studie präsentierten Daten, dass die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 Voraussetzung ist, um die antiproliferativen und die anti-angiogenen Effekte von TGF- $\beta$  *in vitro* und *in vivo* zu vermitteln. Da die Mutante caALK5 allerdings die Metastasenbildung fördert, kann man daraus schließen, dass der Smad-Signalweg in Bezug auf den Primärtumor anti-onkogen, in Bezug auf die Metastasenbildung aber pro-onkogene Wirkung besitzt.

---

## 5. Diskussion

### 5.1 Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion am Beispiel des mesenchymalen Markers Biglykan (BGN)

TGF- $\beta$ 1 ist an der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse wie Proliferation, Angiogenese, Apoptose und „Turnover“ der extrazellulären Matrix beteiligt. Unklar ist bis heute, wie TGF- $\beta$  über seine beiden Rezeptoren T $\beta$ RII und ALK5 eine solche Vielzahl von Prozessen zu regulieren vermag, die nicht nur vom Zelltyp, sondern auch von dessen Differenzierungsstatus und Vorkommen anderer Zytokine abhängen. Teilweise können die pleiotropen Effekte von TGF- $\beta$  dadurch erklärt werden, dass der intrazelluläre Smad-Signalweg, z.B. durch den Crosstalk mit anderen zelltypspezifischen Signaltransduktionen, modifiziert werden kann.

Die Weiterleitung des TGF- $\beta$ -Signals kann Smad-abhängig oder auch –unabhängig erfolgen. Bei dem kleinen leucinreichen Proteoglykan BGN, das durch TGF- $\beta$ 1 induziert wird, handelt es sich um einen mesenchymalen Marker, der im Zuge der EMT (epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung) aufreguliert wird. Andere EMT-Marker wie N-Cadherin und Vimentin werden transkriptionell durch TGF- $\beta$ 1 über den Transkriptionsfaktor Snail induziert. Ungefroren und Krull konnten zeigen, dass die TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Erhöhung nicht transkriptionell, sondern post-transkriptionell (z.B. durch prä-mRNA-Prozessierung und/oder nukleären Export) erfolgt und somit anderen Mechanismen gehorcht (Ungefroren und Krull, 1996).

Es stellte sich heraus, dass die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 komplex und abhängig von der Aktivierung des Smad- (Chen *et al.*, 2002) und des p38-MAPK-Signalweges (Ungefroren *et al.*, 2003) ist. Beide Signalwege sind über das „stress response“ Gen GADD45 $\beta$  miteinander verknüpft (Ungefroren *et al.*, 2005). Da die Weiterleitung des TGF- $\beta$ 1-Signals über die beiden TGF- $\beta$ -Rezeptoren (T $\beta$ RII und T $\beta$ RI/ALK5) erfolgt, wurde zunächst die Rolle von ALK5 bei der Regulation von BGN durch TGF- $\beta$  in duktalem Pankreaszellen analysiert.

---

### **5.1.1 Die Smad-aktivierende Funktion und die Kinasefunktion von ALK5 sind Voraussetzung für die Aktivierung von p38 MAPK und die Hochregulation der BGN-mRNA.**

Durch die Verwendung von verschiedenen Mutanten (dnT $\beta$ RII, kdALK5) sowie eines spezifischen pharmakologischen Inhibitors (SB431542, siehe Abb. 11) wurde nachgewiesen, dass der T $\beta$ RII (siehe Abb. 10) sowie die Kinaseaktivität und die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 (siehe Abb. 12, Abb. 13) notwendig für die Induktion der BGN-Expression sind.

Chen und Mitarbeiter (2002) haben gezeigt, dass sowohl die Expression von funktionellem Smad4 als auch die Aktivierung von p38 (Ungefroren *et al.*, 2003) für die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 erforderlich sind und dass die Aktivierung von p38 der Smad-Aktivierung nachgeschaltet ist (Ungefroren *et al.*, 2003). Um die Smad-Abhängigkeit von p38 und BGN auf der Ebene der Rezeptoren zu bestätigen, wurde untersucht, ob die Fähigkeit von ALK5, nach Ligandenbindung p38 zu induzieren und die BGN-Expression auszulösen, auf der direkten Aktivierung von Smads durch die ALK5-Kinase beruht. Zu diesem Zweck wurden Zellen verwendet, die eine von ALK5 abstammende Mutante (caRImL45) mit einer intakten Kinase-Domäne und einem Defekt in der Smad-Bindungsstelle exprimierten. Aufgrund dieses Defekts in der L45-Schleife ist die Mutante nicht in der Lage, das Smad-responsive Reporterplasmid p6SBE-Luc (siehe Abb. 15) zu induzieren oder die R-Smads durch Phosphorylierung zu aktivieren (siehe Abb. 14) (Yu *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es in Panc-1-Zellen, die diese Mutante transient oder stabil exprimierten, zu keiner Aktivierung von p38 und folglich auch nicht zu einer Genexpression von BGN kam (siehe Abb. 14 und Abb. 16). Diese Ergebnisse und die Smad4-Rekonstitutionsexperimente aus früheren Untersuchungen (Ungefroren *et al.*, 2003) deuten darauf hin, dass die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 entscheidend für die Aktivierung von p38 und die Induktion von BGN ist und dass die p38-Aktivierung in den Panc-1-Zellen Smad-abhängig und nicht Smad-unabhängig verläuft, wie es beispielsweise für Brustdrüsen-Epithelzellen (NMuMG-Zellen) der Maus beschrieben wurde (Yu *et al.*, 2002).

Itoh und Mitarbeiter (Itoh *et al.*, 2003) haben durch Experimente mit ähnlichen Smad-bindungsdefizienten ALK5-Mutanten festgestellt, dass die Aktivierung des p38-Signalweges in R4-2 Nerz-Lungenepithelzellen abhängig von einer intakten L45-Schleife des Rezeptors ist.

---

### **5.1.2 Die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Aktivierung von p38-MAPK und Hochregulation von BGN sowie die Aktivierung von Rac1 sind abhängig von der Zelladhäsion.**

Als nächstes wurde der Einfluss der Zelladhäsion und der kleinen GTPase Rac1 für die TGF- $\beta$ 1-Wirkung auf BGN untersucht. Abb. 53 zeigt, wie Rac1 in das Netzwerk der Signalwirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression integriert ist.

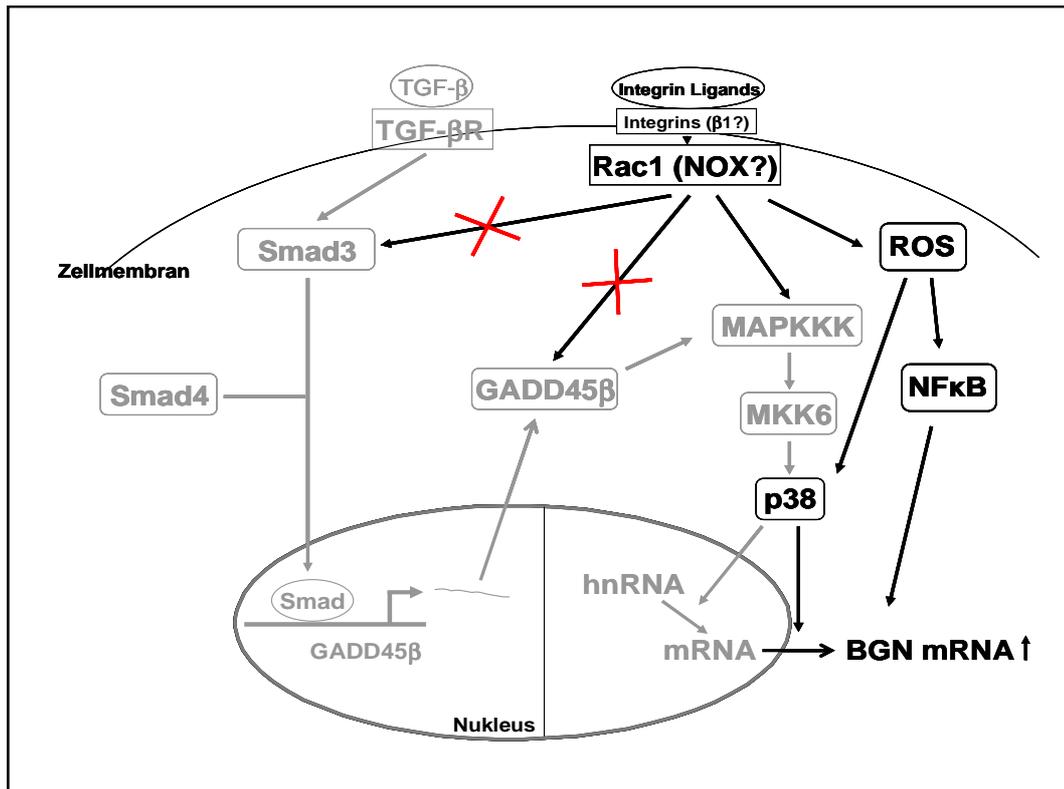
Die Zelladhäsion und die Rac1-Aktivierung wurden in dieser Arbeit als wichtige Faktoren für die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 über die Aktivierung von p38 identifiziert, wodurch auch hier die entscheidende Funktion der p38-Kinase für die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 deutlich wird (Ungefroren *et al.*, 2003).

Experimente, in denen Panc-1-Zellen auf poly-D-Lysin beschichteten Platten (nicht-Integrin-bindendes Polypeptid) gewachsen waren, zeigten, dass auch die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 abhängig von Interaktionen zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix sein könnte, da in diesen Zellen der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression deutlich reduziert war (siehe Abb. 20). Weiterhin konnte durch einen Rac1-Affinitäts-Präzipitations-Assay (siehe Abb. 33) demonstriert werden, dass es nur in adhären Zellen zu einer GTP-Beladung von Rac1 kam, was darauf hindeutet, dass die Adhäsion/Integrin-Signalwirkungen eine Voraussetzung für die Aktivierung von Rac1 darstellen.

Mögliche Kandidaten könnten die  $\beta$ -Integrine, insbesondere  $\beta$ 1-Integrine, sein, da diese sowohl notwendig als auch ausreichend für die durch Integrine-ausgelöste Beladung von Rac1 mit GTP sind (Berrier *et al.*, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass die  $\beta$ 1-Integrine wichtig für die durch TGF- $\beta$  induzierte p38-Aktivierung sind (Bhowmick *et al.*, 2001).

Ein interessantes Phänomen ist die funktionelle Trennung des TGF- $\beta$ /Smad/GADD45 $\beta$ - und des Rac1/p38-Signalweges. Es konnte gezeigt werden, dass die TGF- $\beta$ -Rezeptor-vermittelte Signalwirkung und die Smad2/3-Phosphorylierung in nicht-adhären Panc-1-Zellen (siehe Abb. 18) und in adhären Rac1-T17N-transduzierten Panc-1-Zellen (siehe Abb. 26) nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 erhalten blieb. Außerdem wurden zwei klassische Zielgene von TGF- $\beta$ 1, PAI-1 und GADD45 $\beta$ , die unabhängig von der p38-Aktivierung über Smads induziert werden, untersucht. Dabei wurde herausgefunden, dass deren Induktion durch TGF- $\beta$ 1 weder durch die Kultivierung der Zellen in Suspension (siehe Abb. 19) noch durch die Expression von dnRac1 (siehe Abb. 27) negativ beeinflusst wird.

---



**Abb. 53: Integration von Rac1 in das Signalfloßmodell der BGN-Induktion durch TGF- $\beta$ 1.** Die Induktion von BGN über GADD45 $\beta$  erfolgt wie unter Abb. 2 beschrieben. Die Aktivierung von p38 und BGN erfordert zusätzlich die durch TGF- $\beta$ 1 stimulierte Aktivierung von Rac1, welche wiederum abhängig von der Zelladhäsion/Integrin-Ligation ist. Aktiviertes Rac1 wirkt wahrscheinlich durch die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase (Nox) und die damit verbundene ROS-Produktion auf die p38-Signalkaskade ein. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass wahrscheinlich auch der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der zelluläre Effekte von ROS vermitteln kann, an der TGF- $\beta$ 1-vermittelten BGN-Induktion beteiligt ist.

Stattdessen war die Induktion von GADD45 $\beta$  durch TGF- $\beta$ 1 unter nicht-adhäsiven Bedingungen sogar gesteigert (siehe Abb. 19). Die TGF- $\beta$ 1-Regulation der PAI-1-Expression wurde nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen sich so interpretieren, dass die Adhäsion/Rac1-Aktivierung einen gewissen inhibitorischen Effekt auf den Smad-Signalweg ausübt.

### 5.1.3 Die ektope Überexpression von Rac1-WT steigert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die BGN-Expression.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Signalwirkung des TGF- $\beta$ /Smad-Signalweges Voraussetzung dafür ist, dass Rac1 die BGN-Expression regulieren kann. Diese wurde dadurch bestätigt, dass die ektope Überexpression von WT-Rac1 zu einer beachtlichen Steigerung der durch TGF- $\beta$ 1 induzierten BGN-mRNA-Spiegel führte (siehe Abb. 29). Insgesamt weisen die Ergebnisse aus den Gen-Transfer-Experimenten

darauf hin, dass Rac1 zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Regulation von BGN durch TGF- $\beta$ 1 ist und dass die Haupt-, wenn nicht sogar die einzige Funktion von Rac1 in diesem Prozess die Induktion der p38-Aktivierung ist.

#### **5.1.4 CaRac1 kann den TGF- $\beta$ 1-Effekt auf die BGN-Expression in nicht-adhärenenten Zellen wieder herstellen.**

Da die stabile Expression von dnRac1 sowie die pharmakologische Inhibition von Rac1 die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte p38-Aktivierung (siehe Abb. 25) und damit auch die Expression von BGN (siehe Abb. 22 und Abb. 24) unterdrücken, wurde als nächstes untersucht, ob die ektope Expression einer Rac-1-Mutante mit einer konstitutiven GTPase-Aktivität (Rac1-Q61L) diese Effekte von TGF- $\beta$ 1 imitieren kann. CaRac1 konnte zwar in transienten Co-Transfektionsexperimenten p38 aktivieren (siehe Abb. 30), war aber, wie erwartet nicht in der Lage, in stabil-exprimierenden Zellen die BGN-Expression zu induzieren (siehe Abb. 32). Wenn jedoch gleichzeitig Smads aktiviert werden, kann caRac1 in nicht-adhärenenten Zellen die BGN-Induktion retten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Stressreize, durch die p38 aktiviert wird (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Methyl-Methansulfonat, Sorbitol, UV-Strahlung), nicht ausreichen, um BGN zu induzieren (Ungefroren, nicht veröffentlicht).

Somit wurde der letzte Beweis für das Signalfuss-Modell durch die Experimente erbracht, in denen gezeigt wurde, dass die Expression von caRac1 (assoziiert mit höheren Spiegeln an aktiviertem p38) in nicht-adhärenenten Zellen den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf BGN wiederherstellen konnte (siehe Abb. 32).

BGN und Rac1 wurden beide unabhängig voneinander mit Zelladhäsion und Zellmigration in Zusammenhang gebracht. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass BGN an der Kontrolle von EMT und Zellmigration beteiligt sein könnte, wurde beobachtet, dass es zu einer Hochregulation der BGN-RNA-Expression in wandernden Endothelzellen nach Monolayer-Verletzung im „Scratch-Assay“ *in vitro* kommt, ein Prozess, der von der Aktivierung durch TGF- $\beta$ 1 abhängig sein könnte (Kinsella *et al.*, 1997). Interessanterweise wurde BGN mittels immunzytochemischer Färbung in den Spitzen der Lamellopodien von migrierenden Zellen lokalisiert, was darauf hindeutet, dass BGN dort lokalisiert ist, wo die Bildung und die Dissoziation von Adhäsionsplaques auftritt (Kinsella *et al.*, 1997). Eine ähnliche Lokalisation konnte auch für Rac1 gezeigt werden. Aktiviertes Rac1 reguliert zusammen mit Cdc42 die Lamellopodien- und Filopodien-Ausbildung sowie die Bildung kleinerer fokaler

---

Komplexe (Diekmann *et al.*, 1995; Tufvesson und Westergren-Thorsson, 2003). In diesen Bereichen kommt es zu einer Co-Lokalisation mit phosphoryliertem p38 (Shin *et al.*, 2005). Hier wird deutlich, dass sich die enge funktionelle Verbindung der Rac1- (und der p38-) Aktivierung und der BGN-Expression durch TGF- $\beta$ 1 auch räumlich in ihrer subzellulären Verbreitung widerspiegelt. Weiterhin zeigt sich der funktionelle Zusammenhang zwischen der BGN- und der Rac1-Expression dadurch, dass BGN morphologische Veränderungen und Veränderungen im Zytoskelett hervorrufen kann, in welche die Signalwirkungen von RhoA und Rac1 verwickelt sind, was zur Migration von Lungenfibroblasten führt (Tufvesson und Westergren-Thorsson, 2003).

#### **5.1.5 DPI supprimiert die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Aktivierung von p38 und die Induktion der BGN-Expression.**

Da viele der Rac1-Signalwirkung nachgeschalteten Effekte durch die NAD(P)H-Oxidase und die damit verbundene ROS-Generation vermittelt werden, wurde untersucht, ob Rac1 auch in der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN als Untereinheit der NAD(P)H-Oxidasefunktion wirkt. Dieses konnte durch die Beobachtung, dass der NAD(P)H-Oxidase-Inhibitor DPI die Effekte von dnRac1 imitiert, bestätigt werden: DPI unterdrückt sowohl die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte Expression von BGN (siehe Abb. 34) als auch die Aktivierung von p38 (siehe Abb. 35), beeinflusst aber nicht die Hochregulation der PAI-1-Expression (siehe Abb. 34). Chiu und Mitarbeiter (2001) haben zuvor gezeigt, dass ROS an der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten p38-Aktivierung in Keratinozyten beteiligt sind.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse wird angenommen, dass die Adhäsionsabhängigkeit des TGF- $\beta$ 1-Effektes auf die BGN-Expression letztendlich auf der Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidase-Funktion von der Zelladhäsion beruht (Zhao *et al.*, 2003).

#### **5.1.6 Die Bedeutung von ROS bei der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN**

Zur weiteren Klärung der Rolle der ROS-Produktion für die TGF- $\beta$ 1-induzierte BGN-Expression wurden Experimente mit verschiedenen ROS Radikalfängern, Antioxidationsmitteln bzw. anderen Chemikalien, die dafür bekannt sind, dass sie die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase direkt oder indirekt beeinflussen, durchgeführt. Die zellulären Effekte von ROS z.B. können durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Strozyk und Kulms, 2005) vermittelt werden. Die Beobachtung, dass der NF $\kappa$ B-Inhibitor PDTC

---

die TGF- $\beta$ 1-vermittelte BGN-Induktion hemmt, liefert einen indirekten Beweis für die Beteiligung von ROS in diesem Prozess (siehe Abb. 36).

Allerdings konnte kein Effekt des NO-Inhibitors S-M-Sulfat auf die TGF- $\beta$ 1-regulierte BGN-Expression beobachten werden, woraus abgeleitet werden kann, dass Stickstoffoxid in pankreatischen Zellen nicht an diesem Vorgang beteiligt ist (siehe Abb. 36). Wird die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte ROS-Produktion durch Radikalfänger oder durch Antioxidationsmittel inhibiert, kommt es wahrscheinlich nicht mehr zu einer Aktivierung von p38. Wie schon zuvor gezeigt, verhindert eine Behandlung von Panc-1-Zellen mit DPI die durch TGF- $\beta$ 1-vermittelte Aktivierung von p38 (siehe Abb. 35).

Die Behandlung von Fibroblasten (Ungefroren, 2006) und kultur-aktivierten Sternzellen der Leber (Meurer *et al.*, 2005) mit N-Acetyl-L-Cystein (NAC) führt zu einer Aufhebung der Smad-Signalwirkung, was daraufhin deutet, dass ROS für eine effiziente Smad-Aktivierung gebraucht werden. Ob dieses ein direkter Effekt oder die Folge einer beeinträchtigten MAPK-Aktivierung ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Für Antioxidationsmittel (wie NAC) konnte gezeigt werden, dass sie antifibrotische Effekte besitzen und die TGF- $\beta$ -Signalwirkung sowie die nachfolgende Expression der Fibrose-spezifischen Proteine bei der Dupuytren-Krankheit (Morbus Dupuytren: gutartige Erkrankung des Bindegewebes der Handinnenfläche) (Kopp *et al.*, 2006) aufheben. Dieses könnte eine Grundlage für therapeutische Ansätze bei dieser oder anderen fibroproliferativen Krankheiten sein. Die Verhinderung der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression von BGN mit Hilfe von NAC oder anderen Antioxidationsmitteln/Radikalfängern könnte einen vielversprechenden Ansatz für eine antifibrotische Therapie liefern, da dieses Proteoglykan eine zentrale Rolle bei dem Matrixaufbau besitzt.

### **5.1.7 Panc-1-Zellen exprimieren verschiedene Nox- und phox-Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase.**

Über die Expression von Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase in Pankreasgangzellen und daraus hervorgegangenen Tumorzellen ist nur wenig bekannt. Die dazu durchgeführten real-time PCRs ergaben, dass die Zellen verschiedene Untereinheiten und Nox-Isoformen der phagozytischen NAD(P)H-Oxidase exprimieren. Unter anderem wird die phagozytische Untereinheit gp91<sup>phox</sup> (= Nox2) in den Panc-1-Zellen exprimiert (siehe Abb. 37), was darauf hindeutet, dass das Enzym in diesen Zellen Ähnlichkeit mit dem aus phagozytotisch aktiven Zellen, wie z.B. den Monozyten aus

---

peripherem Blut, besitzen könnte. Vaquero und Mitarbeiter (2004) demonstrierten, dass eine nicht-mitochondriale NAD(P)H-Oxidase in Pankreaskrebszellen die Hauptquelle der Wachstumsfaktor-induzierten ROS-Produktion ist. In MIA PaCa-2 und Panc-1-Zellen führt die Transfektion mit Nox4 antisense-mRNA Oligonukleotiden oder siRNAs (siNox4RNAs) zur Inhibition der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und der Superoxid-Produktion und macht die Zellen sensitiv für Apoptose (Vaquero *et al.*, 2004). Ebenso könnte Nox4 auch eine wichtige Rolle bei der TGF- $\beta$ 1-Regulation von BGN spielen.

Da ROS wichtige physiologische Funktionen bei zellulären Signalwirkungen besitzen, die an Apoptose oder am Überleben der Zellen (Vaquero *et al.*, 2004, Mochizuki *et al.*, 2006), an der Zellzykluskontrolle (Honore *et al.*, 2003) und an Alterungsprozessen (Simm und Brömme, 2004) beteiligt sind, überrascht es nicht, dass bei Entzündungsprozessen oder Krebs eine erhöhte ROS-Produktion zu Schädigungen des Gewebes führen kann.

Für verschiedene Krankheiten wie der chronischen Herzinsuffizienz, Arteriosklerose und dem diabetischen Nierenleiden, die mit einer ungewöhnlich hohen BGN-Expression (Wadhwa *et al.*, 2004) assoziiert sind, wurden pathophysiologische Funktionen von TGF- $\beta$ 1 und der redox-sensitiven Signalwirkung beschrieben. Tiede und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Stimulation des AT-1-Rezeptors (Angiotensin II-Rezeptors) in Herzfibroblasten, welche zur ROS-Produktion führt, BGN über eine autokrine Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 induziert (Tiede *et al.*, 2003).

Eine gesteigerte ROS-Produktion und TGF- $\beta$ 1 begünstigen durch die Förderung der Synthese und der Akkumulation von Komponenten der extrazellulären Matrix die Entwicklung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose und Desmoplasie.

BGN gehört zu einer Gruppe von TGF- $\beta$ 1-induzierten Matrix-assoziierten Proteinen wie z.B. TIMP3 (Li *et al.*, 2004), COLIA2 (Segawa *et al.*, 2002) und PAI-1 (Jiang *et al.*, 2003), die durch diesen Wachstumsfaktor über Nox-Proteine oder ROS-Zwischenprodukte induziert werden. Dieser pathophysiologische Mechanismus könnte bei der durch TGF- $\beta$ 1 geförderten Transformation von kultivierten humanen Herzfibroblasten in Myofibroblasten (ein Prozess, der Nox4 abhängig ist, Cucoranu *et al.*, 2005) und bei der Transformation von Fett-speichernden Zellen in der fibrotischen Leber zu Myofibroblasten, die mit einer starken Hochregulation der BGN-Expression einhergeht (Meyer *et al.*, 1992; Breitkopf *et al.*, 2006), von Bedeutung sein.

---

Zusammengefasst lässt sich für diese Untersuchungen festhalten, dass der TGF- $\beta$ 1-Effekt auf BGN adhäsions-abhängig ist und dass es sich bei der Aktivierung von Rac1 um einen wichtigen Zwischenschritt in der durch TGF- $\beta$ 1 vermittelten Regulation von BGN handelt. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal kooperative Interaktionen zwischen der Adhäsion/Integrin-vermittelten Signalwirkung und der TGF- $\beta$ -Rezeptor/Smad-abhängigen Signalwirkung bei der Regulation der BGN-Expression. Weiterhin wird deutlich, dass die NAD(P)H-Oxidase über ihre ROS-Produktion an der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression von BGN beteiligt ist.

## 5.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ bei der Tumorprogression

Bei den meisten Pankreastumoren kommt es im Verlauf der Tumorgenese zu Störungen im Smad-Signalweg. Am häufigsten tritt eine „loss-of-function“ Mutation im Smad4-Gen auf, wobei es sich hier um ein relativ spätes Ereignis während der Tumorgenese handelt. Dieses spiegelt sich auch in der Beobachtung wieder, dass die Mehrheit der etablierten dukталen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien auf eine Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 nicht mit einer Wachstumsinhibition oder anderen Smad-vermittelten Antworten reagieren. Zur Untersuchung der Konsequenzen einer selektiven Inaktivierung des Smad-Signalweges für die Pankreastumorgenese *in vitro* wurde Panc-1 als zelluläres Modell gewählt. Diese Zelllinie ist gut charakterisiert und repräsentativ für ein frühes bis mittleres Stadium der Pankreastumorgenese, da sie bereits Mutationen in *Ki-Ras* und anderen Zellzyklus-assoziierten Genen besitzt, der Smad-Signalweg aber noch intakt ist (Sipos *et al.*, 2003).

In diesem Teil der Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle die Smad-Aktivierung durch ALK5 bei der Tumorprogression spielt. Dazu wurden die biochemischen und zellulären Effekte von zwei ALK5-Mutanten nach ektopter Expression in Panc-1-Zellen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Diese Mutanten unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Smads zu aktivieren: caRImL45 kann aufgrund einer Mutation in der L45-Schleife im Gegensatz zu caALK5 keine Smads binden, beide Mutanten besitzen aber eine intakte Kinase-Domäne.

### 5.2.1 Effekte der stabilen Expression der konstitutiv-aktiven ALK5-Mutante auf verschiedene TGF- $\beta$ -responsive Gene und die Proliferationshemmung

In früheren Studien der Zellzyklusregulation durch TGF- $\beta$ 1 in Pankreaskarzinomzellen wurde gezeigt, dass es sich nur bei dem CDK-Inhibitor p21<sup>WAF1</sup> um ein Zielgen von TGF- $\beta$ 1 handelt, während die Expression von p15<sup>INK4b</sup> und p27<sup>KIP1</sup> nicht durch TGF- $\beta$ 1 beeinflusst wird (Grau *et al.*, 1997; Voss *et al.*, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese Befunde dadurch experimentell bestätigt werden, dass die TGF- $\beta$ /ALK5-induzierte Hochregulation der p21<sup>WAF1</sup>-Expression in Panc-1-Zellen sowohl eine intakte Kinase-Domäne als auch die Smad-aktivierende Funktion von ALK5 benötigt (siehe Abb. 41). Von Grau und Mitarbeitern war zuvor schon beschrieben worden, dass die Induktion von p21<sup>WAF1</sup> in Pankreaskarzinomzellen abhängig von Smad4 (DCP4) ist (Grau *et al.*, 1997).

Da auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) in Zusammenhang mit der Wachstumskontrolle durch TGF- $\beta$ 1 gebracht wurden, erfolgte hier eine Untersuchung der Effekte der ALK5-Mutanten auf die ERK-Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass in den caRImL45-exprimierenden Zellen erhöhte Spiegel von phospho-ERK1/2 vorlagen (siehe Abb. 41). Da diese Mutante eine intakte Kinase-Domäne besitzt und p38-MAPK aktivieren kann (Yu *et al.*, 2002), könnte sie auch imstande sein, ERKs direkt zu aktivieren. Iglesias und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Smad4 die Ras-abhängige ERK-Signalwirkung in Ras-transformierten Keratinozyten hemmt (Iglesias *et al.*, 2000). In Panc-1-Zellen, die eine aktivierende Mutation (G12D) in einem Allel des *Ki-Ras*-Gens aufweisen, hemmt TGF- $\beta$ 1 die Wachstumsfaktor-(EGF-)vermittelte Aktivierung von ERK (Giehl *et al.*, 2000). Die gesteigerte ERK-Aktivierung in caRImL45-exprimierenden Zellen ist wahrscheinlich das Ergebnis einer Derepression der Smad-Inhibition. Voraussetzung dafür ist eine permanente niedrigschwellige Autostimulation durch den Wildtyp-Rezeptor ALK5 mit der Folge einer permanenten Smad-Aktivierung. Diese wird durch den dominant-negativen Effekt von caRImL45 aufgehoben (siehe Abb. 39).

In zwei Panc-1-Klonen mit starker caRImL45-Expression konnte beobachtet werden, dass diese Zellen auch ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1 eine gesteigerte Proliferationsrate zeigten (siehe Abb. 42). Dieses könnte eine direkte Konsequenz der erhöhten ERK-Aktivierung sein. Alternativ könnte es sich bei dem wachstumsfördernden Effekt um das Ergebnis einer dominant-negativen Hemmung der endogenen WT-Rezeptoren

durch die Mutante handeln, die durch TGF- $\beta$ 1, welches die Zellen selbst (autokrin) produzieren, stimuliert werden.

### **5.2.2 ALK5 supprimiert das Tumorwachstum in einem orthotopen Xenotransplantationsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms.**

Nach der Transplantation von ALK5-transduzierten Zellen in das Pankreas von immundefizienten Mäusen bildeten die caALK5-exprimierenden Zellen Tumore, die deutlich kleiner waren (siehe Abb. 47) und eine niedrigere Proliferationsrate besaßen (siehe Abb. 50) als die Tumore, die sich aus den caRImL45-exprimierenden und den WT-Zellen entwickelten. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Rekonstitution der Smad4-Expression in humanen Pankreaskarzinomzellen die Tumorausbildung *in vivo* unterdrückt (Duda *et al.*, 2003; Schwarte-Waldhoff *et al.*, 2000). Anders als in Karzinomzellen führt allein die Expression von caALK5 (ALK5-TD) in normalen Zellen von Mäusen nicht zu einer Entwicklung von Tumoren (Muraoka-Cook *et al.*, 2005). Erst durch die kooperative Wirkung mit Onkogenen wie *Ras* kommt es zur Tumorbildung.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die caRImL45-Mutante in einer dominant-negativen Art und Weise mit Smad-vermittelten Effekten interferiert, die durch exogenes und endogenes TGF- $\beta$ 1 ausgelöst werden. Solch ein dominant-negativer Effekt wurde auch schon früher für die Regulation von BGN in Panc-1-Zellen durch TGF- $\beta$ 1 beschrieben (Ungefroren *et al.*, 2005).

Tian und Mitarbeiter haben in einer Veröffentlichung über die *in vivo* und *in vitro* Funktionen einer (kinase-inaktiven) Version von RImL45 in Ha-Ras-transformierten Brustkrebszellen gezeigt, dass diese Mutante, so wie in dem hier beschriebenen Modell, selektiv die Aktivierung von Smad2 in einer dominant-negativen Weise störend beeinflusst (Abb. 38, 39) und als Folge davon die Malignität der Xenograft-Tumore von prämaligen oder gut differenzierten Brustkrebszelllinien (Tian *et al.*, 2004) steigert.

In der vorliegenden Studie konnte ein tumor-fördernder Effekt von caRImL45 *in vivo* nicht beobachtet werden, da die Tumore, die sich aus diesen die Mutante-exprimierenden Zellen entwickelten, etwas kleiner als die der Panc-1-WT-Zellen waren. Allerdings war dieser Effekt nicht signifikant und kann deshalb nur als Trend gewertet werden (siehe Abb. 47). Der Grund für diese Diskrepanz zwischen den *in vivo* Ergebnissen von Tian und Mitarbeitern (Tian *et al.*, 2004) und denen dieser Studie ist nicht bekannt, könnte allerdings auf Unterschiede in dem Konstrukt der Mutante (nicht-

kinase-aktiv versus kinase-aktiv), in dem Typ des aktivierten Ras (Ha-Ras versus Ki-Ras) und vor allem dem Ort des Xenograft-Wachstums (subkutan versus orthotop) oder der gesteigerten Apoptose (sub G1) in den caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen (Daten nicht gezeigt) beruhen.

Die Hemmung der Neoangiogenese stellt einen potenziellen Mechanismus der Tumorsuppression dar. Deshalb wurde die Bildung von Mikrogefäßen in den entstandenen Tumoren untersucht. Bemerkenswerterweise war die Mikrogefäßdichte (MVD) in den aus den Panc-1-caALK5-Zellen entstandenen Tumoren signifikant reduziert im Gegensatz zu der MVD in den Tumoren, die aus den Panc-1-WT und den caRImL45-exprimierenden Zellen entstanden sind (siehe Abb. 51). Dieses steht im Einklang mit der geringeren Tumorgroße der aus den Panc-1-caALK5-Zellen entstandenen Tumore und der gesteigerten Expression des Angiogenese-Inhibitors TSP-1 in diesen Zellen *in vitro*.

### **5.2.3 Die Expression von caALK5 imitiert den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Gene, die an der Neoangiogenese und der EMT beteiligt sind.**

Um einen Hinweis auf den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus der Neoangiogenese zu erhalten, wurden Gene untersucht, die an diesem Vorgang beteiligt sind und durch TGF- $\beta$ /ALK5 reguliert werden. Das Verhältnis von anti-angiogenen (TSP-1, PAI-1) zu den pro-angiogenen (VEGF-A) Faktoren war in den caALK5-stabil-exprimierenden Zellen deutlich größer als in den caRImL45-exprimierenden Zellen (siehe Abb. 43). Dieses lässt vermuten, dass die Smad-vermittelte Unterdrückung der Neoangiogenese zu dem anti-Tumor-Effekt beiträgt. Diese Ergebnisse stimmen mit entsprechenden aus Tierversuchen überein, in denen eine funktionelle Smad4-Expression *in vivo* das Wachstum von Pankreastumoren durch die Inhibition der Neoangiogenese hemmt, was mechanistisch teilweise durch die Hochregulation der TSP-1-Expression (Schwarte-Waldhoff *et al.*, 2000) und/oder die Suppression von VEGF (Duda *et al.*, 2003) erfolgt.

Für TGF- $\beta$ 1 ist bekannt, dass es sowohl pro-angiogene als auch anti-angiogene Eigenschaften besitzt, was sich darin widerspiegelt, dass es sowohl die Expression von VEGF-A als auch von TSP-1 positiv reguliert. In kürzlich veröffentlichten Studien über Smad-knockout Zellen wurde gezeigt, dass Smad2 für die Expression von TSP-1 durch TGF- $\beta$ 1 wichtig ist, während Smad3 eine Schlüsselrolle bei der Stimulation der VEGF-A-Expression zukommt, was auf eine anti-angiogene Funktion von Smad2

---

hindeutet (Nakagawa *et al.*, 2004). Der hohe Quotient von TSP-1/VEGF-A in caALK5- im Vergleich zu dem in caRImL45-exprimierenden Panc-1-Zellen könnte eine direkte Konsequenz der erhöhten Spiegel von aktiviertem Smad2 (siehe Abb. 38) und den vergleichsweise niedrigen Spiegeln an aktiviertem Smad3 (und reduzierten Mengen von gesamt-Smad3; hier nicht gezeigt; Schniewind *et al.*, 2007) in diesen Zellen *in vitro* (und vermutlich auch *in vivo*) sein.

Für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT wurde gezeigt, dass sie mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert (Deckers *et al.*, 2006; Zavadil und Bottinger, 2005) und Smad-abhängig ist. Die Expression von caALK5 bewirkt im Gegensatz zu der Expression von caRImL45 die mit der EMT-assoziierten phänotypischen und molekularen Veränderungen in den Pankreaskrebszellen, wie beispielsweise eine abnehmende Expression von Cytokeratinen und E-Cadherin und eine Induktion der Expression von Vimentin und N-Cadherin (siehe Abb. 45). Auch weitere wachstums- und metastasierungs-assoziierte Gene wie PAI-1 und MMP-2 waren in den caAK5-stabil-exprimierenden Zellen überexprimiert (Rowland-Goldsmith *et al.*, 2002; siehe Abb. 46). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Smad-Signalwirkung für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT in Pankreaskrebszellen notwendig ist.

#### **5.2.4 Konstitutiv-aktives ALK5 fördert die Metastasierung in SCID-Mäusen.**

Die Smad-Aktivierung stellt eine Voraussetzung für die durch TGF- $\beta$ 1-induzierte EMT und Invasivität dar. Dass den Smads auch eine entscheidende Funktion bei der durch TGF- $\beta$ 1 angetriebenen Metastasierung im Pankreaskarzinom zukommt, konnte nach orthotoper Transplantation von SCID-Mäusen gezeigt werden, da caALK5 die Metastasenbildung in der Leber induzierte, während die Mutante mit dem Defekt in der Smad-Bindung (caRImL45) weitaus weniger dazu befähigt war (siehe Abb. 52). Diese Ergebnisse passen zu den *in vitro* Daten des Expressionsprofils von invasions-/metastasierungs-assoziierten Genen und befinden sich in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Smads für die Knochenmetastasenbildung der MDA-MB-231 Brustkrebszellen erforderlich sind (Kang *et al.*, 2005; Deckers *et al.*, 2006). Tian und Mitarbeiter konnten in einem Zellmodell für das Mammakarzinom zeigen, dass die prometastatische Aktivität von TGF- $\beta$ /ALK5 durch die Expression von RImL45 in der aggressiven und metastasierenden MCF10CA1a (MIV) Zelllinie unterdrückt wird (Tian *et al.*; 2004). Da für die Experimente dieser Studie keine metastasierende TGF- $\beta$  responsive Pankreaskarzinomzelllinie zur Verfügung stand, konnte nicht überprüft werden, ob die Expression von caRImL45 und die damit

---

verbundene Reduktion der Smad2/3-Signalwirkung mit der Inhibition der prometastatischen Aktivität korreliert.

Um EMT, Invasion und Metastasierung zu induzieren, würde die durch caALK5 induzierte Smad-Signalwirkung allein nicht ausreichen, da Smads dazu mit anderen Signal-Kaskaden kooperieren müssen. Oft und Mitarbeiter haben gezeigt, dass der Ras-Signalweg in die Vermittlung der Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf die Tumorzellmorphologie involviert ist (Oft *et al.*, 1996; Oft *et al.*, 2002, Janda *et al.*, 2002). Auch das MCF10CA1-Modell (siehe oben) basiert auf Ras-transformierten MCF10AT Zellen (Tian *et al.*, 2004). Panc-1-Zellen besitzen ein mutiertes *Ki-Ras*-Allel (Fensterer *et al.*, 2004), und Experimente, in denen die endogene nicht-onkogene Aktivierung von *Ras* durch eine *dnRas*-Mutante (H-Ras (S17N)) unterdrückt wird, weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Ras durch TGF- $\beta$ 1 an der durch TGF- $\beta$ 1-induzierten EMT, Invasion und Metastasierung beteiligt ist. Im Gegensatz dazu stellen zellzyklus- und proliferations-assoziierte Gene keine primären Ziele der Interaktion zwischen der Ras und der TGF- $\beta$ -Kaskade in Panc-1-Zellen dar (Fensterer *et al.*, 2004). Ein denkbarer Mechanismus, wie *Ki-Ras* die Metastasierung vorantreibt, könnte die Förderung der nukleären Akkumulation von Smad2 sein, das zuvor durch caALK5 phosphoryliert wurde. Oft und Mitarbeiter haben diesen Vorgang schon für H-Ras in Plattenepithelkarzinomzellen beschrieben: erhöhte Spiegel an H-Ras führen dort zu einer Akkumulation von Smad2 im Nukleus (Oft *et al.*, 2002).

Zusätzlich könnte die Smad-Kaskade Faktoren induzieren, durch welche die Tumorzellen mit dem „microenvironment“ des Ortes der Metastasierung (Deckers *et al.*, 2006) kommunizieren. Dieser Prozess wird für das optimale Tumorwachstum und die Metastasierung benötigt. Daneben können parakrine Mechanismen, wie z.B. die Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 durch TSP-1, eine entscheidende Funktion für das Vorantreiben des metastatischen Prozesses sein.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die entscheidende Rolle der Smad-aktivierenden Funktion von ALK5 für den antiproliferativen Effekt von TGF- $\beta$ 1 *in vitro* und die tumorsupprimierenden und prometastatischen Funktionen von TGF- $\beta$ 1 *in vivo* im duktalem Pankreasadenokarzinom.

### 5.2.5 Ausblick

Durch zukünftige Studien, z.B. durch einen Vergleich des Transkriptosoms von Tumoren, die von caALK5-exprimierenden und caRimL45-exprimierenden Zellen abstammen, könnten weitere Zielgene des Smad-Signalweges, die an diesem Prozess

---

beteiligt sind identifiziert werden. Eine Aufklärung der molekularen Grundlage dieses Mechanismus würde zum besseren Verständnis der Rolle von TGF- $\beta$ 1 bei der Tumorprogression führen. Dieses ist eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien, die eine selektive Förderung der tumorsupprimierenden Funktionen/Aktivitäten von TGF- $\beta$ /ALK5 zum Ziel haben.

---

---

## 6. Literaturverzeichnis

**Alberts B, Johnson A; Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004).**

Molekularbiologie der Zelle, 1020-1021.

4. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

**Bachman KE, Park BH (2005)**

Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter

Curr Opin Oncol.; 17 (1): 49-54

**Benard V, Bohl BP, Bokoch GM (1999).**

Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases.

J Biol Chem.; 274 (19): 13198-13204.

**Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schafer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Hocker M, Rosewicz S (2003).**

Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells.

Cancer Res.; 63 (5): 1083-1092.

**Berrier AL, Martinez R, Bokoch GM, LaFlamme SE (2002).**

The integrin beta tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1.

J Cell Sci.; 115 (Pt 22): 4285-4291.

**Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmeier C, Ziegler H (2006).**

Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006

**Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL (2001).**

Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity.

J Biol Chem.; 276 (50): 46707-46713.

**Bokoch GM, Diebold BA (2002).**

Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase.

Blood.; 100 (8): 2692-2696.

**Bokoch GM, Knaus UG (2003).**

NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!

Trends Biochem Sci.; 28 (9): 502-508.

---

**Bonewald LF, Wakefield L, Oreffo RO, Escobedo A, Twardzik DR, Mundy GR (1991).**

Latent forms of transforming growth factor-beta (TGF beta) derived from bone cultures: identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF beta.

Mol Endocrinol.; 5 (6): 741-751.

**Border WA, Noble NA (1994).**

Transforming Growth Factor  $\beta$  in Tissue Fibrosis.

N Engl J Med.; 331 (19):1286-1292.

**Bornstein P (2001).**

Thrombospondins as matricellular modulators of cell function.

J Clin Invest. 2001 Apr;107(8):929-34.

J Clin Invest.; 107 (8): 929-934.

**Boyer Arnold N, Korc M (2005).**

Smad7 abrogates transforming growth factor-beta1-mediated growth inhibition in COLO-357 cells through functional inactivation of the retinoblastoma protein.

J Biol Chem.; 280 (23): 21858-21866.

**Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, Singer MV, Dooley S (2006).**

TGF-beta/Smad signaling in the injured liver.

Z Gastroenterol., 44 (1): 57-66.

**de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB (2000).**

Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer.

J Natl Cancer Inst.; 92 (17): 1388-1402.

**Chang JC, Chang HH, Lin CT, Lo SJ (2005).**

The integrin  $\alpha 6 \beta 1$  modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets.

J Biomed Sci.; 12 (6):881-898.

**Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H (2002).**

Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells.

J Biol Chem.; 277 (39): 36118-36128.

**Chiu C, Maddock DA, Zhang Q, Souza KP, Townsend AR, Wan Y (2001).**

TGF-beta-induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes.

Int J Mol Med.; 8 (3): 251-255.

---

**Chomczynski P, Sacchi N (1987).**

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
Anal Biochem.; 162 (1): 156-159.

**Claassen GF, Hann SR (2000).**

A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta-induced cell-cycle arrest.  
Proc Natl Acad Sci U S A.; 97 (17): 9498-9503.

**Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, Blaveri E, Baron A, Terris B, Jones M, Tyson K, Bassi C, Scarpa A, Lemoine NR (2001).**

Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia.  
Oncogene.; 20 (50): 7437-7446.

**Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D (2005).**

NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts.  
Circ Res.; 97 (9): 900-907. Epub 2005 Sep 22.

**Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Lowik C, van der Pluijm G, ten Dijke P (2006).**

The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells.  
Cancer Res.; 66 (4): 2202-2209.

**Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001)**

TGF- $\beta$  signalling in tumor suppression and cancer progression.  
Nat Genet; 29(2):117-129.

**Derynck R, Zhang YE (2003).**

Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.  
Nature; 425(6958): 577-584.

**ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, CH, Miyazono K (1993).**

Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity.  
Oncogene; 8 (10): 2879-2887.

**Diekmann D, Nobes CD, Burbelo PD, Abo A, Hall A (1995).**

Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites.  
EMBO J.; 14 (21): 5297-5305.

---

---

**Duda DG, Sunamura M, Lefter LP, Furukawa T, Yokoyama T, Yatsuoka T, Abe T, Inoue H, Motoi F, Egawa S, Matsuno S, Horii A (2003).**

Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells.

Oncogene; 22 (44): 6857-6864.

**Dusi S, Della Bianca V, Donini M, Nadalini KA, Rossi F (1996).**

Mechanisms of stimulation of the respiratory burst by TNF in nonadherent neutrophils: its independence of lipidic transmembrane signaling and dependence on protein tyrosine phosphorylation and cytoskeleton. J Immunol.; 157 (10): 4615-4623.

**Ebner R, Chen RH, Shum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck R (1993).**

Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor.

Science; 260 (5112): 1344-1348.

**Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM (2001a).**

TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system.

Int J Cancer.; 93 (2): 204-211.

**Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM (2001b).**

Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation.

Cancer Res.; 61 (10): 4222-4228.

**Feng XH, Derynck R (1997).**

A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity.

EMBO J.; 16 (13): 3912- 3923.

**Fensterer H, Giehl K, Buchholz M, Ellenrieder V, Buck A, Kestler HA, Adler G, Gierschik P, Gress TM (2004).**

Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1.

Genes Chromosomes Cancer.; 39 (3): 224-235.

**Fölsch U. R. und Schäfer H. (2004).**

Das Pankreaskarzinom: eine besondere Herausforderung in der Onkologie.

Medizinische Klinik; 99 (4): 183-184

---

**Forman HJ, Torres M (2002).**

Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling.  
Am J Respir Crit Care Med.; 166 (12 Pt 2): S4-8.

**Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K (1993).**

Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor.  
Cell.; 75 (4): 681-692.

**Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999).**

Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.  
Biotechniques 26, 112-122, 124-115.

**Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, Korc M (1993).**

Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival.  
Gastroenterology; 105 (6): 1846-1856

**Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR (2001).**

Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation.  
J Biol Chem.; 276 (47): 44173-44178.

**Geiszt M, Leto TL (2004).**

The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond.  
J Biol Chem.; 279 (50): 51715-51718.

**Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996).**

A novel method for real time quantitative RT-PCR.  
Genome Res.; 6, 995-1001.

**Giehl K, Seidel B, Gierschik P, Adler G, Menke A (2000).**

TGFbeta1 represses proliferation of pancreatic carcinoma cells which correlates with Smad4-independent inhibition of ERK activation.  
Oncogene; 19 (39): 4531-41.

**Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziere R, Noguera I, Rifkin DB (1997).**

TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation.  
Stem Cells.; 15 (3): 190-197.

---

**Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R (2000).**

A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall.

Circ Res.; 87 (1): 26-32.

**Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1998).**

Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas.

Cancer Res.; 58 (23): 5329-5332.

**Grau AM, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans DB, Abbruzzese JL, Zhang W, Chiao PJ (1997).**

Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells.

Cancer Res.; 57 (18): 3929-3934.

**Gressner AM, Krull N, Bachem MG (1994).**

Regulation of proteoglycan expression in fibrotic liver and cultured fat-storing cells.

Pathol Res Pract.; 190 (9-10): 864-882.

**Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000).**

NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.

Circ Res.; 86 (5): 494-501.

**Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996).**

DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1.

Science.; 271 (5247): 350-353.

**Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D (1997).**

The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling.

Cell.; 89 (7): 1165-1173.

**Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM (1993):**

Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s).

Mol Biol Cell.; 4 (11): 1217-1223.

---

---

**Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E (1994).**

Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.

Biochem J.; 302 ( Pt 2): 527-534.

**Hirai R, Fijita T (1996).**

A human transforming growth factor-beta type II receptor that contains an insertion in the extracellular domain.

Exp Cell Res.; 223 (1): 135-141.

**Honore S, Kovacic H, Pichard V, Briand C, Rognoni JB (2003).**

Alpha2beta1-integrin signaling by itself controls G1/S transition in a human adenocarcinoma cell line (Caco-2): implication of NADPH oxidase-dependent production of ROS.

Exp.Cell Res. 285: 59-71.

**Howard BD, Boenicke L, Schniewind B, Henne-Bruns D, Kalthoff H (2000).**

Transduction of human pancreatic tumor cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retroviral vectors containing a herpes simplex virus thymidine kinase mutant gene enhances bystander effects and sensitivity to ganciclovir.

Cancer Gene Ther.; 7 (6): 927-938.

**Iglesias M, Frontelo P, Gamallo C, Quintanilla M (2000).**

Blockade of Smad4 in transformed keratinocytes containing a Ras oncogene leads to hyperactivation of the Ras-dependent Erk signalling pathway associated with progression to undifferentiated carcinomas.

Oncogene.; 19 (36): 4134-4145.

**Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS (2002).**

SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7.

Mol Pharmacol.; 62 (1): 65-74.

**Iozzo RV (1997).**

The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth.

Crit Rev Biochem Mol Biol.; 32 (2):141-174.

**Iozzo RV (1999).**

The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins.

J Biol Chem.; 274 (27): 18843-18846.

---

**Irani K (2000):**

Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.

Circ Res.; 87(3): 179-183.

**Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, ten Dijke P (2003).**

Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses.

J Biol Chem.; 278 (6): 3751-3761.

**Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S (2002).**

Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.

J Cell Biol.; 156 (2): 299-313.

**Javelaud D, Mauviel A (2005).**

Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis.

Oncogene; 24 (37): 5742-5750.

**Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, Uh ST, Park CS, Lee HB (2003).**

Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 309: 961-966.

**Kamata H, Hirata H (1999).**

Redox regulation of cellular signalling.

Cell Signal 11: 1-14.

**Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massague J (2005).**

Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway.

Proc Natl Acad Sci U S A.; 102 (39): 13909-13914.

**Kang Y (2006).**

Pro-metastasis function of TGFbeta mediated by the smad pathway.

J Cell Biochem.; [Epub ahead of print]

**Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT, Wight TN (1997).**

Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor.

J Biol Chem.; 272 (1): 318-325.

---

**Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN (2004).**

The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype.

Crit Rev Eukaryot Gene Expr.; 14 (3): 203-234.

**Kjoller L, Hall A (1999).**

Signaling to Rho GTPases.

Exp Cell Res. 1999 Nov 25;253(1):166-79.

**Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Truong P, Buchler MW, Falb D, Korc M (1999).**

The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer

Oncogene.; 18 (39): 5363-5372

**Knaus PI, Lindemann D, DeCoteau JF, Perlman R, Yankelev H, Hille M, Kadin ME, Lodish HF (1996).**

A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma

Mol. Cell. Biol.; 16 (7): 3480-3489.

**Kopp J, Seyhan H, Muller B, Lanczak J, Pausch E, Gressner AM, Dooley S, Horch RE (2006).**

N-acetyl-L-cysteine abrogates fibrogenic properties of fibroblasts isolated from Dupuytren's disease by blunting TGF-beta signalling.

J Cell Mol Med.; 10 (1): 157-165.

**Krishnaveni MS, Eickelberg O (2006)**

TGF- $\beta$  receptors: Assembly, signalling, and disease relevance.

Sig. Transduction; 6, 301-313.

**Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, Wang Z, Chen Y (2006).**

In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas.

Proc Natl Acad Sci U S A.; 103 (6): 1858-1863.

**Lawler J (2000).**

The functions of thrombospondin-1 and-2.

Curr Opin Cell Biol.; 12 (5): 634-640.

**Levy L, Hill CS (2005).**

Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses.

Mol Cell Biol.; 25 (18): 8108-8125.

---

**Li WQ, Qureshi HY, Liacini A, Dehnade F, Zafarullah M (2004).**

Transforming growth factor beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species.

Free Radic. Biol. Med. 37: 196-207.

**Liebermann DA, Hoffman B (2002).**

Myeloid differentiation (MyD)/growth arrest DNA damage (GADD) genes in tumor suppression, immunity and inflammation.

Leukemia; 16 (4): 527-541.

**Lo RS, Massague J (1999).**

Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2.

Nat Cell Biol.; 1 (8): 472-478.

**Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. 2001:**

Molekulare Zellbiologie. 536-577; 1140-1171.

4. Auflage., Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verlag.

**Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S. (2003).**

Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer.

Cancer Res.; 63 (10): 2649-2657.

**Massagué J (1998).**

TGF-beta signal transduction.

Annu Rev Biochem.; 67: 753-791.

**Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000)**

TGF- $\beta$  signalling in growth control, cancer, and heritable disorders.

Cell.; 103 (2): 295-309.

**Mazerbourg S, Sangkuhl K, Luo CW, Sudo S, Klein C, Hsueh AJ (2005).**

Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses.

J Biol Chem.; 280 (37): 32122-32132. Epub 2005 Jul 27.

**McCarty OJ, Larson MK, Auger JM, Kalia N, Atkinson BT, Pearce AC, Ruf S, Henderson RB, Tybulewicz VL, Machesky LM, Watson SP (2005).**

Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow.

J Biol Chem.; 280 (47): 39474-39484.

---

**Meurer SK, Lahme B, Tihaa L, Weiskirchen R, Gressner AM (2005).**

N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-beta signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug.  
Biochem. Pharmacol. 70: 1026-1034.

**Meyer DH, Krull N, Dreher KL, Gressner AM (1992).**

Biglycan and decorin gene expression in normal and fibrotic rat liver: cellular localization and regulatory factors.  
Hepatology.; 16 (1): 204-216.

**Mochizuki T, Furuta S, Mitsushita J, Shang WH, Ito M, Yokoo Y, Yamaura M, Ishizone S, Nakayama J, Konagai A, Hirose K, Kiyosawa K, Kamata T (2006).**

Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells.  
Oncogene 25: 3699-3707.

**Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. (2003).**

Genetic abnormalities in pancreatic cancer.  
Mol Cancer; 2(1): 7.

**Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE (1997).**

p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma.  
Cancer Res.; 57 (11): 2140-2143

**Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL (2005).**

Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression  
Clin Cancer Res.; 11(2 Pt 2):937s-94 3s.

**Muraoka-Cook RS, Shin I, Yi JY, Easterly E, Barcellos-Hoff MH, Yingling JM, Zent R, Arteaga CL (2006).**

Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression.  
Oncogene; 25 (24): 3408-3423.

**Nakagawa T, Li JH, Garcia G, Mu W, Piek E, Bottinger EP, Chen Y, Zhu HJ, Kang DH, Schreiner GF, Lan HY, Johnson RJ (2004).**

TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways.  
Kidney Int.; 66 (2): 605-613.

---

---

**Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M (2004).**

N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma.  
Clin Cancer Res.; 10 (12 Pt 1): 4125-4133.

**Nakao A, Roijer E, Imamura T, Souchelnytskyi S, Stenman G, Heldin CH, ten Dijke P (1997).**

Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway.  
J Biol Chem.; 272 (5): 2896-2900.

**Nobes CD, Hall A (1995)**

Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.  
Cell.; 81(1): 53-62.

**Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E (1996).**

TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells.  
Genes Dev.; 10 (19): 2462-2477.

**Oft M, Akhurst RJ, Balmain A (2002).**

Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels.  
Nat Cell Biol.; 4 (7): 487-494.

**Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR (2003).**

Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase.  
Diabetes; 52 (6): 1457-1463.

**Peinado H, Quintanilla M, Cano A (2003).**

Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.  
J Biol Chem.; 278 (23): 21113-21123.

**Ray R, Shah AM (2005).**

NADPH oxidase and endothelial cell function.  
Clin Sci (Lond).; 109 (3): 217-226.

**Ridley AJ (1994).**

Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho.  
J Cell Sci Suppl.; 18: 127-131.

---

---

**Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1996).**

Mad-related genes in the human.

Nat Genet.; 13 (3): 347-349.

**Rowland-Goldsmith MA, Maruyama H, Matsuda K, Idezawa T, Ralli M, Ralli S, Korc M (2002).**

Soluble type II transforming growth factor-beta receptor attenuates expression of metastasis-associated genes and suppresses pancreatic cancer cell metastasis.

Mol Cancer Ther.; 1 (3): 161-167.

**Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997).**

Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.

Cancer Res.; 57 (9): 1731-1734.

**Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW (1996).**

Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components.

Proc Natl Acad Sci U S A. 23; 93 (2): 790-794

**Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, Schonherr E, Macakova K, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H (2001).**

Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin.

FASEB J.; 15 (3): 559-561.

**Schaefer L, Beck KF, Raslik I, Walpen S, Mihalik D, Micegova M, Macakova K, Schonherr E, Seidler DG, Varga G, Schaefer RM, Kresse H, Pfeilschifter J (2003).**

Biglycan, a nitric oxide-regulated gene, affects adhesion, growth, and survival of mesangial cells.

J. Biol. Chem. 278: 26227-26237.

**Schiller M, Javelaud D, Mauviel A (2004).**

TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing.

J Dermatol Sci.; 35 (2): 83-92.

**Schniewind B, Groth S, Sebens Muerkoster S, Sipos B, Schafer H, Kalthoff H, Fändrich F, Ungefroren H (2007).**

Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function.

Oncogene. 2007 [Epub ahead of print]

---

---

**Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttgies J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W (2000).**

Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A.; 97 (17): 9624-6929.

**Segawa M, Kayano K, Sakaguchi E, Okamoto M, Sakaida I, Okita K (2002).**

Antioxidant, N-acetyl-L-cysteine inhibits the expression of the collagen alpha2 (I) promoter in the activated human hepatic stellate cell line in the absence as well as the presence of transforming growth factor-beta. Hepatol. Res. 24: 305.

**Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM (1995).**

Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*.

Genetics; 139 (3): 1347-1358.

**Shin I, Kim S, Song H, Kim HR, Moon A (2005).**

H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells.

J Biol Chem.; 280 (15): 14675-14683.

**Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ, Massague J (2003).**

Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis.

Proc Natl Acad Sci U S A.; 100 (14): 8430-8435.

**Simm A, Brömme HJ (2005).**

Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them - can we measure them - should we block them?

Signal Transduction 5: 115-125.

**Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, Klöppel G (2003)**

A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform.

Virchows Arch.; 442 (5): 444-452.

**Strozyk E, Kulms D (2005).**

NFκB: cell survival or cell death?

Signal Transduction 5: 334-349.

---

---

**Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, Furukawa F, Mori S, Yamagata H, Yoshida K, Matsushita M, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K (2003).**

Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*; 22 (15): 2309-2321.

**Takekawa M, Saito H (1998).**

A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell.*; 95 (4): 521-530.

**Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, Saito H (2002).**

Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *EMBO J.*; 21 (23): 6473-6482.

**Tian F, Byfield SD, Parks WT, Stuelten CH, Nemani D, Zhang YE, Roberts AB (2004).**

Smad-binding defective mutant of transforming growth factor beta type I receptor enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer Res.*; 64 (13): 4523-4530.

**Tiede K, Stoter K, Petrik C, Chen WB, Ungefroren H, Kruse ML, Stoll M, Unger T, Fischer JW (2003).**

Angiotensin II AT(1)-receptor induces biglycan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGFbeta in vitro. *Cardiovasc Res.*60: 538-546.

**Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL (2002).**

Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.*; 90 (11): 1205-1213.

**Tufvesson E, Westergren-Thorsson G (2003).**

Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J Cell Sci.*; 116 (Pt 23): 4857-4864.

**Ungefroren H, Krull NB (1996).**

Transcriptional regulation of the human biglycan gene. *J Biol Chem.*; 271 (26): 15787-15795.

---

**Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, Faendrich F, Kalthoff H (2003).**

Regulation of Biglycan Gene Expression by Transforming Growth Factor- $\beta$  Requires MKK6-p38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Downstream of Smad Signaling.  
J. Biol. Chem.; 278 (13): 11041-11049.

**Ungefroren H, Groth S, Ruhnke M, Kalthoff H, Faendrich F (2005).**

Transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor/ALK5-dependent activation of the GADD45beta gene mediates the induction of biglycan expression by TGF-beta.  
J Biol Chem.; 280 (4): 2644-2652.

**Ungefroren, H. (2006).**

TGF- $\beta$  Signaling and Biglycan in Pancreatic Cancer.  
Methods in Molecular Biology, Part IV, Transforming Growth Factor-Beta in Cancer Therapy. Ed. Jakowlew, S., The Humana Press, Inc., in press.

**Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS (2004).**

Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells.  
J. Biol. Chem. 279: 34643-34654.

**Vimalachandran D, Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. (2004).**

Genetics and prevention of pancreatic cancer.  
Cancer Control.; 11 (1): 6-14.

**Vincent F, Nagashima M, Takenoshita S, Khan MA, Gemma A, Hagiwara K, Bennett WP (1997).**

Mutation analysis of the transforming growth factor-beta type II receptor in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor-beta.  
Oncogene; 15 (1): 117-122.

**Voss M, Wolff B, Savitskaia N, Ungefroren H, Deppert W, Schmiegel W, Kalthoff H, Naumann M (1999).**

TGFbeta-induced growth inhibition involves cell cycle inhibitor p21 and pRb independent from p15 expression.  
Int J Oncol.; 14 (1): 93-101.

**Wadhwa S, Embree MC, Bi Y, and Young MF (2004).**

Regulation, regulatory activities, and function of biglycan.  
Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 14: 301-315.

---

---

**Wagner M, Kleeff J, Lopez ME, Bockman I, Massaue J, Korc M (1998).**

Transfection of the type I TGF-beta receptor restores TGF-beta responsiveness in pancreatic cancer.  
Int J Cancer.;78 (2): 255-260.

**Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, Leder G, Adler G, Gress TM (2001).**

Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines.  
Gastroenterology; 121 (3): 657-667.

**Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991).**

Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma.  
N Engl J Med.; 324: 1-8.

**Westergren-Thorsson G, Hernnas J, Sarnstrand B, Oldberg A, Heinegard D, Malmstrom A (1993).**

Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.  
J Clin Invest.; 92 (2): 632-637.

**Wieser R, Wrana JL, Massague J (1995).**

GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex.  
EMBO J.; 14 (10): 2199-2208.

**Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (2000).**

Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression.  
Cancer Res.; 60 (7): 2002-2006.

**Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994).**

Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.  
Nature.;370 (6488): 341-347.

**Yang S, Hardaway M, Sun G, Ries WL, Key LL Jr (2000).**

Superoxide generation and tyrosine kinase.  
Biochem Cell Biol.; 78 (1): 11-17.

**Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Goggins M, Canto MI, Abrams RA, Laheru D, Jaffee EM, Hidalgo M, Yeo CJ. (2002).**

Pancreatic cancer.  
Curr Probl Cancer.; 26 (4): 176-275.

---

---

**Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ Jr, Liebermann DA, Bottinger EP, Roberts AB (2003).**

Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation.

J Biol Chem.; 278 (44): 43001-43007.

**Yu L, Hérbert MC, Zhang YE (2002).**

TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses.

EMBO J.; 21:3749–3759.

**Zavadil J, Bottinger EP (2005).**

TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions.

Oncogene.; 24 (37): 5764-74.

**Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE (1998).**

Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators.

Mol Cell.; 1 (4): 611-617.

**Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM (1995).**

Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1.

J Biol Chem.; 270 (41): 23934-23936.

**Zhao T, Benard V, Bohl BP, Bokoch GM (2003).**

The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils.

J Clin Invest.; 112 (11): 1732-1740.

**Zuidema, G, Yeo, C.** Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract Kapitel 5: Pancreatic and Periapillary Carcinoma (Nonendocrine)

5. Auflage, Saunders Company, 2002

---

## 7. Zusammenfassung

TGF- $\beta$ 1 ist ein Zytokin, das an der Regulation verschiedenster biologischer Prozesse beteiligt ist und u.a. die Bildung der extrazellulären Matrix durch die Induktion des kleinen leucin-reichen Proteoglykans Biglykan (BGN) fördert. Die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Aktivierung des BGN Gens führt, ist sehr komplex und abhängig von der Aktivierung des Smad- (Chen *et al.*, 2002) und des p38-MAPK-Signalweges (Ungefroren *et al.*, 2003), wobei beide über das „stress response“ Gen GADD45 $\beta$  miteinander verknüpft sind (Ungefroren *et al.*, 2005). Unter Einsatz verschiedener kinase-defizienter und kinase-aktiver Mutanten sowie spezifischer pharmakologischer Inhibitoren in der TGF- $\beta$  responsiven Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität und die Smad-aktivierende Funktion des TGF- $\beta$  Typ I Rezeptors (ALK5) für die Induktion der BGN-Expression erforderlich sind. Durch Experimente, in denen Panc-1-Zellen in Suspension kultiviert oder mit dem Zytoskelett zerstörenden Toxin Cytochalasin D behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass der TGF- $\beta$ -Effekt auf BGN abhängig von der Zelladhäsion ist. In einer weiteren Versuchsreihe, in denen Panc-1-Zellen mit einem Rac1-Inhibitor behandelt wurden, konnte deutlich gemacht werden, dass der TGF- $\beta$ -Effekt auf BGN durch die kleine GTPase Rac1, die auch an der Weiterleitung von Adhäsions-Signalen beteiligt ist, vermittelt wird.

Außerdem konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von Panc-1-Zellen, die unterschiedliche Rac1-Mutanten (dnRac1, WT-Rac1, caRac1) ektop exprimierten, unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Zellen (adhärent oder in Suspension) gezeigt werden, dass Rac1 auf der Ebene von p38 wirkt und keinen Einfluss auf die Smad3-Aktivierung und die GADD45 $\beta$ -Induktion hat. Schließlich konnte durch die pharmakologische Inhibition des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes mittels Diphenyliodoniumchlorid (DPI) gezeigt werden, dass Rac1 seine Funktion bei der p38-Aktivierung als Untereinheit der reaktive Sauerstoffspezies (ROS: „reactive oxygen species“)-produzierenden NAD(P)H-Oxidase ausübt. Dass auch ROS selbst eine wichtige Rolle bei der TGF- $\beta$ -Regulation von BGN spielen, konnte durch Experimente mit Radikalfängern und Antioxidantien demonstriert werden. Die Vermutung, dass die NAD(P)H-Oxidase als Quelle der ROS-Produktion an diesem Prozess beteiligt ist, wurde weiterhin dadurch unterstützt, dass in den Panc-1-Zellen verschiedene Nox und phox Untereinheiten dieses Enzymkomplexes exprimiert werden.

---

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Effekte der TGF- $\beta$ -Signalwirkung auf das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* und auf ihre Tumorigenität *in vivo* analysiert. Dazu wurden die biochemischen und zellulären Effekte von zwei ALK5-Mutanten nach Überexpression in Panc-1-Zellen untersucht. Diese Mutanten besitzen beide eine intakte Kinase-Domäne, unterscheiden sich aber in ihrer Fähigkeit, Smads zu aktivieren, wobei konstitutiv-aktives RImL45 (caRImL45) aufgrund einer Mutation in der L45-Schleife, im Gegensatz zu konstitutiv-aktivem ALK5 (caALK) keine Smads binden kann. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die stabile Expression von caALK5 (im Gegensatz zu caRImL45) den antiproliferativen Effekt von TGF- $\beta$  nachahmen konnte, was auf der Fähigkeit dieser Mutante beruht, den Smad-Signalweg zu aktivieren. Im Gegensatz zu den caRImL45-transduzierten Panc-1-Zellen zeigten caALK5-transduzierte Zellen eine epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) und eine erhöhte Expression von metastasierungs-assoziierten Genen. Zusätzlich kam es in diesen Zellen zu einem erhöhten Expressionsverhältnis von anti-angiogenen (TSP-1, PAI-1) zu pro-angiogenen Faktoren (VEGF-A). Nach einer orthotopen Transplantation dieser Zellen in immundefiziente Mäuse kam es durch caALK5 im Gegensatz zu caRImL45 zu einer Reduktion des Primärtumorwachstums kam. Allerdings förderte diese Mutante im Gegensatz zu caRImL45 die Bildung von Lebermetastasen, woraus geschlossen werden kann, dass der Smad-Signalweg in Bezug auf den Primärtumor zwar anti-onkogen, in Bezug auf die Metastasenbildung aber pro-onkogen wirkt.

---

## 8. Summary

The growth factor transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) regulates a diverse array of biological processes and is a potent stimulator of extracellular matrix synthesis. TGF- $\beta$  induces the expression of biglycan (BGN), a small leucine-rich proteoglycan involved in matrix assembly and regulation of growth factor activity. TGF- $\beta$  intracellular signaling leading to the activation of *BGN* is complex and depends on the activation of both the Smad- and the p38-MAPK pathway, and intermittent transcriptional induction of *MyD118*, a gene encoding the stress response protein GADD45 $\beta$ . Using different kinase-deficient and kinase-active ALK5 mutants or a specific pharmacologic inhibitor (SB431542) it was shown that BGN induction by TGF- $\beta$  in the pancreatic adenocarcinoma cell line Panc-1 required both the Smad-activating function and the kinase activity of the TGF- $\beta$  type I receptor ALK5. Next, it was demonstrated that the effect of TGF- $\beta$  on BGN induction was dependent on cell adhesion, because BGN expression was strongly reduced, when cells were kept in suspension or exposed to the actin cytoskeleton-disrupting agent cytochalasin D. By treating Panc-1 cells with a specific Rac1 inhibitor it was demonstrated that the TGF- $\beta$  effect on BGN was mediated by the small GTPase Rac1. Ectopic expression of wild type Rac1 or different mutants (dominant-negative, constitutively active) in adherent or non-adherent Panc-1 cells indicated that Rac1 acted at the level of p38, without affecting Smad3 activation and *MyD118* induction. Finally, using the NAD(P)H-oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI), it was shown that Rac1 activated p38 as a subunit of the reactive oxygen species (ROS)-generating enzyme NAD(P)H-oxidase. Using various radical scavengers and antioxidants, it was established that ROS play a significant role in TGF- $\beta$  regulation of BGN. Expression of various Nox and phox subunits in Panc-1 cells suggested that NAD(P)H-oxidase might be the source of TGF- $\beta$ -induced ROS production.

In addition, the effects of TGF- $\beta$  signaling on the growth behavior of pancreatic carcinoma cells *in vitro* and on their tumorigenicity *in vivo* have been analysed. In particular, the biochemical and cellular effects of two ALK5 mutants after ectopic expression in Panc-1 cells were studied. Both mutants (constitutively active (ca) ALK5, constitutively active (ca) RImL45) harbor an intact kinase domain, while caRImL45 was deficient in its ability to activate Smads, due to a mutation in its L45 loop. The growth-inhibitory effect of TGF- $\beta$  in Panc-1 cells was mimicked by stable expression of

---

caALK5 and was dependent on ALK5's ability to activate Smad signaling. In contrast to caRImL45-transduced cells, the caALK5-transduced cells underwent epithelial-to-mesenchymal transition and upregulated various metastasis-associated genes. Furthermore, these cells showed a higher ratio of anti-angiogenic (thrombospondin-1, plasminogen activator-inhibitor-1) to pro-angiogenic factors (VEGF-A). After orthotopic transplantation into immunodeficient mice, Panc-1-caALK5, but not Panc-1-caRImL45 cells, reduced the tumor size, but induced the formation of liver metastases. These results suggest an important role of the Smad2/3 signaling pathway in the tumor suppressive and prometastatic functions of TGF- $\beta$  *in vivo*.

---

---

## 9. Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Groth, Stephanie  
Anschrift: Ahlmannstr.24  
24118 Kiel  
Geburtsdatum: 08.01.1979  
Geburtsort: Lübeck  
Familienstand: ledig

### Hochschulstudium:

8/2004 - 8/2007 Doktorandin an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Abteilung: Transplantationsforschung, UK-SH, Campus Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. F. Fändrich (Betreuung durch Prof. Dr. Ungefroren; offizielle Betreuung durch Prof. Dr. H. Kalthoff, Sektion Molekulare Onkologie)  
Thema: *„Die Rolle von TGF- $\beta$  bei der Regulation des Biglykan-Gens und bei der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms“*

22.07.2004 Abschluss: Diplom-Biologin

7/2003-6/2004 Diplomarbeit: Durchführung Uniklinikum S-H, Kiel, Klinik für Allgem. und Thoraxchirurgie, Sektion: Molekulare Onkologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Kalthoff.  
Titel der Arbeit: *„Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen im Pankreaskarzinom“*

1998-2004 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Vordiplom 2000)  
Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Zoologie, Biochemie

### Schulbildung:

Schulabschluss: Juni 1998, allgemeine Hochschulreife  
1989-1998 Johanneum zu Lübeck  
1985-1989 Grundschule, Stockelsdorf

---

## 10. Erklärung und Publikationsliste

Hiermit versichere ich, dass ich die Dissertation - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen. Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (siehe unten).

Kiel,..... (Stephanie Groth)

### Publikationen

Schniewind B, Groth S, Sebens Muerköster S, Sipos B, Schäfer H, Kalthoff H, Fändrich F, Ungefroren H (2007).

Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function.

Oncogene. 26(33):4850-62.

Ungefroren H, Schniewind B, Groth S, Chen WB, Muerköster SS, Kalthoff H, Fändrich F (2007).

Antitumor activity of ALK1 in pancreatic carcinoma cells.

Int J Cancer.; 120 (8): 1641-51.

Ungefroren H, Groth S, Fändrich F (2006).

Antioxidants and inhibitors of flavoprotein-dependent oxidases abrogate TGF-beta induction of biglycan: Evidence for a role of reactive oxygen species

Signal Transd., 6, 338-344.

---

Groth S, Schulze M, Kalthoff H, Fändrich F, Ungefroren H (2005).

Adhesion and Rac1-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta. Evidence for oxidative signaling through NADPH oxidase.

J Biol Chem., 280(39): 33190-9.

Ungefroren H, Groth S, Ruhnke M, Kalthoff H, Fändrich F (2005).

Transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor/ALK5-dependent activation of the GADD45beta gene mediates the induction of biglycan expression by TGF-beta.

J Biol Chem.; 280 (4): 2644-52.

---

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Transplantationsforschung“ der Klinik für allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums S.-H. in Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. F. Fändrich bedanken:

Ich danke Prof. Dr. Hendrik Ungefroren für die Möglichkeit der Anfertigung und die Betreuung dieser Doktorarbeit. Weiterhin danke ich ihm für die mir entgegengebrachte Hilfe, die Bereitstellung der verwendeten Materialien und des Arbeitsplatzes.

Mein Dank gilt auch meinen Labor-Kolleginnen Martina Jansen und Ingrid Berg für die Hilfsbereitschaft und dass sie immer für mich da waren. Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Transplantationsforschung für das gute Arbeitsklima und die nette Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. H. Kalthoff, Leiter der Sektion Molekularen Onkologie für die offizielle Betreuung dieser Arbeit, sein Interesse an dem Thema und seine hilfreichen Tipps.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch des Zoologischen Instituts der CAU Kiel für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine nützlichen Tipps.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bodo Schniewind für die Durchführung der SCID-Maus-Experimente sowie Bianca Körtge für die Färbungen der Tumorschnitte.

Vielen lieben Dank an meine Freunde und meine Schwester, die mich in der stressigen Zeit besonders unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich meinem Freund Laurent Goletz für seine Geduld und seine Unterstützung danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich während der schwierigen Phase der Verfassung dieser Arbeit immer unterstützt und mir sehr geholfen haben.

---