

Universität Ulm

Innere Medizin I

Leiter: Prof. Dr. Guido Adler

**Analyse der Regulation von**  
**Wachstumsfaktoren und der**  
**Cadherin/Catenin-Expression**  
**in Pankreaskarzinomzelllinien**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

Christiane Jung  
geb. am 18.07.1970  
in Böblingen

im Jahre 2003

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Adler**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fischer**

**Tag der Promotion: 05.02.2004**

***Gewidmet meiner  
über alles geliebten  
Mutter***

# Inhaltsverzeichnis:

## Abkürzungsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>II. Material und Methodik</b>	<b>8</b>
II.I. Häufig verwendete Lösungen	8
II.II. Zellkultur	9
II.III. Ribonukleinsäureisolierung aus Gewebe	11
II.IV. Ribonukleinsäureisolierung aus Zellkulturen	11
II.V. Northern-Blot	12
II.VI. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	13
II.VII. cDNA-Herstellung	14
II.VIII. Hybridisierung	14
II.IX. Auswertung	17
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>18</b>
III.I. Vergleich der Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle in Pankreaskarzinomgewebe	18
III.II. Vergleich von Pankreaskarzinomzelllinien	19
III.II.I. Expression von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen	22
III.II.II. Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$	24
III.II.III. Weitere Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren	26
III.II.IV. Transkriptionsfaktoren	32
III.II.V. Phosphoinositol-3-Kinasen	33
III.II.VI. Kollagene der Typen I und III	34

III.III.	Stimulation bzw. Inhibition einzelner Zelllinien	36
III.III.I.	Stimulation mit TGF- $\beta$ oder Inhibition mit anti-TGF- $\beta$ -R II-Antikörpern	36
III.III.II.	Stimulation mit EGF oder Inhibition mit anti-EGF-Rezeptor-Antikörpern	40
III.III.III.	Stimulation mit Cholezystokinin	44
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
IV.I.	E-Cadherin-Expression in Pankreaskarzinomzelllinien	46
IV.II.	Expression von E-Cadherin und Cateninen	47
IV.III.	Expression der TGF- $\beta$ -Wachstumsfaktoren	51
IV.IV.	Expression verschiedener Wachstumsfaktoren	55
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>VIII.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>82</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AP-1	Aktivierendes Protein 1
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
BMP-2, -4, -7	Knochenbildendes Protein-2, -4, -7
BSA	Serumalbumin vom Rind ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CCK	Cholezystokinin
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Rinderserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I
IGF-2	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor II
JNK	Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobasen
LEF-1	<i>lymphoid enhancer factor-1</i>
M	molar
mM	milli-molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	<i>Mitogen-activated extracellular signal regulated kinase</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
PAI-I	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
R-Smad	Rezeptor-reguliertes Smad
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SF	<i>Scatter Factor</i> = Hepatozyten-Wachstumsfaktor
Tab.	Tabelle
Tcf	T-Zell-Faktor
TGF- $\alpha$	Transformierender Wachstumsfaktor $\alpha$
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TGF- $\beta$ -R I	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ Rezeptor Typ I
TGF- $\beta$ -R II	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ Rezeptor Typ II
TIEG	TGF- $\beta$ induziertes frühes Antwortgen
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure

## I. Einleitung

Das Pankreaskarzinom stellt mit seiner extrem schlechten Prognose eine der häufigsten Todesursachen von Malignomen in der westlichen Welt dar. Die Inzidenz beträgt seit Jahren etwa 0,01 Prozent, Männer und Schwarze sind etwas häufiger betroffen als Frauen und Weiße und Menschen aus ärmeren Ländern (137). Pathogenetisch gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang z. B. mit Rauchen, Ernährung, Diabetes mellitus, einer erblichen Komponente, chemischen Stoffen, der chronischen Pankreatitis u. a. (114,137). Das duktales Karzinom hat einen Anteil von 75 bis 92 Prozent an den Pankreaskarzinomen, wobei man bei der Frage der Ursprungszellen die Plastizität der Pankreaszellen nicht außer acht lassen sollte, d. h. daß sich Azinuszellen, die im gesunden Pankreas fast 90 % der Zellen bilden, unter bestimmten Bedingungen in Zellen mit duktuären oder zentroazinären Merkmalen umwandeln können (16,52).

Neoplastische Zellen wachsen unabhängig von Kontrollmechanismen und zeigen häufig eine veränderte Wachstumsfaktorabhängigkeit. Im Vergleich zu normalen Zellen haben maligne Zellen in Zellkultur durch die eigene Produktion von Wachstumsfaktoren einen verminderten Bedarf an exogenen Wachstumsfaktoren und können so physiologische Beschränkungen ihres Zellwachstums umgehen. Bei gleichzeitiger Überexpression der korrespondierenden Wachstumsfaktorrezeptoren kann es zu einer unkontrollierten Aktivierung der Signalkaskaden kommen (autokrine Stimulation). In transformierten Zellen wird eine Amplifikation und Überexpression von Wachstumsfaktoren und/oder ihrer Rezeptoren beobachtet (84,102), mit klinischer Korrelation zu schnellem und invasivem Tumorwachstum (40,60). Auch beim Pankreaskarzinom wurden bereits vielfältige Veränderungen entdeckt wie Mutationen in Protoonkogenen (z. B. *K-ras*) und/oder Tumorsuppressorgenen (wie *p53*, *p16*, *smad4*) (133) und/oder Überexpressionen von Wachstumsfaktoren (wie EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) und gleichzeitig ihrer Rezeptoren (wie EGFR, TGF- $\beta$ -R). Diese Veränderungen tragen durch sequentielle Summation von Mutationen zu Zellentartung, Metastasierung und Invasivität bei (50,119).

Das exokrine Pankreas besteht zu 90 % aus azinären und zu ca. 10 % aus duktalem Zellen. Den Azinuszellen wird die Synthese und Sekretion der Verdauungsenzyme zugeschrieben, den duktalem Zellen die bikarbonatreiche Flüssigkeitssekretion (126). Cholezystokinin (CCK) wird im Dünndarm gebildet, auf Nahrungsreize hin freigesetzt und reguliert unter anderem neben der Freisetzung der Verdauungsenzyme auch die Wasser- und Bikarbonatsekretion des Pankreas und das Wachstum des Gastrointestinaltraktes (126). Es wird vermutet, daß CCK nicht nur als Wachstumsfaktor des normalen Pankreas dient, sondern auch bei der Pankreaskarzinogenese eine Rolle spielt (125).

E-Cadherin (auch Uvomorulin, Cell CAM 120/80, Arc-1 oder L-CAM genannt) gehört zu einer Familie kalziumabhängiger Zelloberflächen-Glykoproteine, die die Zell-Zell-Adhäsion durch homophile Interaktionen fördern. Dadurch wird dem, vor allem von epithelialen Zellen exprimierten, E-Cadherin eine Schlüsselrolle in der Bildung und Aufrechterhaltung der Adhäsionskomplexe zugeschrieben. Der extrazelluläre Teil des Cadherins ist verantwortlich für spezifische Zell-Zell-Interaktionen, der zytoplasmatische dient der Verbindung mit einer Gruppe von Proteinen, den sogenannten Cateninen. Während  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin direkt an E-Cadherin binden können, vermittelt  $\alpha$ -Catenin die Verbindung von  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin mit zytoskeletären Proteinen (20). Die Verbindung des Cadherin-Catenin-Komplexes mit dem Aktin-Zytoskelett ist wesentlich für die Zell-Zell-Bindungsaktivität verantwortlich (71). Die Catenine sind jedoch nicht nur Teil des Adhäsionskomplexes: Vor allem  $\beta$ -Catenin ist auch in Signalprozesse über die Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung involviert, während  $\gamma$ -Catenin in anderen Adhäsionssystemen wie Desmosomen gefunden wird (57,128,146). Neben seiner Bedeutung in der Embryonalentwicklung spielt E-Cadherin durch die Aufrechterhaltung von Zellpolarität und Differenzierung in der Organisation und Integrität der verschiedenen Gewebe eine entscheidende Rolle (130,139). Der fördernde Einfluß, der einem E-Cadherin-Verlust auf die Invasivität von Karzinomen zugeschrieben wird (108), wird durch Experimente unterstützt, in denen mit neutralisierenden Antikörpern gegen E-Cadherin eine Transformation E-Cadherin-positiver Zellen zu invasiven Zellen erreicht werden konnte (12). Im Gegensatz dazu konnte durch Transfektion E-Cadherin-negativer Karzinomzellen

mit E-Cadherin-cDNA die Motilität und Invasivität dieser Zelllinien verringert werden (43,83). In Karzinomen verschiedener Organe (wie z. B. Ösophagus, Magen, Prostata, Blase, Brust, Kolorektum und Pankreas) kann eine verminderte E-Cadherin-Expression nachgewiesen werden, bei den meisten, jedoch nicht allen mit einer Korrelation zum klinischen Stadium, zum Differenzierungsgrad, zum Lymphknotenstatus und zur Metastasierung (64,112). In vielen dieser Tumore zeigt sich, daß E-Cadherin nicht mehr nachweisbar ist, heterogen exprimiert wird oder abnormal im Zytoplasma lokalisiert ist (49,124). Der Verlust des Zell-Zell-Kontaktes kann jedoch nicht nur über ein defektes E-Cadherin sondern auch über eine mutationsbedingte Veränderung des Catenin-Komplexes bewirkt (62,105,123) und nach Transfektion mit der entsprechenden Catenin-cDNA wieder aufgehoben werden (49,83). Mutationen im E-Cadherin- oder den Catenin-Genen sind nur eine der Ursachen für einen gestörten Zell-Zell-Kontakt - daneben spielen auch posttranslationale Veränderungen (wie beispielsweise durch Wachstumsfaktoren induzierte Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen der Catenine) eine bedeutende Rolle (28,98,106).

Der Verlust der Zelladhäsion ist ein Teil der komplexen Vorgänge, die zu einer Zelldissemination führen. Eine Loslösung der entarteten Zellen aus dem Zellverband durch eine Veränderung des Cadherin-Catenin-Komplexes scheint einer der initialen, alleine jedoch nicht ausreichenden Schritte zu sein, die zusammengenommen zu Invasivität und Metastasierung führen (11,49,129).

Die transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta$  (TGF- $\beta$ 's) sind eine Familie multifunktionaler Regulatoren von Zellwachstum und -differenzierung in verschiedensten Zelltypen. Sie gehören wie die Inhibin/Activin-Familie, die DPP/VG1-Familie, die BMP's und die MIH-Substanz-Familie zur TGF- $\beta$ -Superfamilie (17,90).

Die biologischen Effekte der TGF- $\beta$ s sind vielfältig: Sie beeinflussen Zellproliferation, extrazelluläre Matrix (EZM)-Bildung, Zelladhäsion, Differenzierung, Zellwanderung und Angiogenese, und spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen mit nachfolgender Fibrose, Immunantworten u. a. (6,17).

TGF- $\beta$ 1 wurde zuerst als Faktor identifiziert, der das substratunabhängige Wachstum von Nagetierfibroblasten stimuliert. Im Gegensatz zur Stimulation mesenchymaler Zellen wird das Wachstum epithelialer Zellen durch TGF- $\beta$  inhibiert (6). Die in ihrer Sequenz sehr ähnlichen TGF- $\beta$  Isoformen wirken mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten und fördern einerseits als starke Stimulatoren die EZM-Produktion und die Polymerisation, Ablagerung und Synthese von Matrixkomponenten, vermindern andererseits jedoch den Abbau der Matrix durch die Inhibition matrixdegradierender Enzyme und die Induktion von Proteaseinhibitoren (profibrotischer Einfluß) (17). Nahezu alle unveränderten und viele neoplastische Zellen besitzen Zelloberflächenrezeptoren oder Bindungsproteine für TGF- $\beta$  (6). Bei Säugetieren sind bisher drei TGF- $\beta$ -Isoformen bekannt, die an drei TGF- $\beta$ -Rezeptoren (TGF- $\beta$ -R I bis TGF- $\beta$ -R III) binden (6,141). Es handelt sich dabei um eine Familie von transmembranären Rezeptoren, von denen Typ I und II Rezeptoren intrazellulär als Serin/Threonin-Kinasen wirken (82,134). Das Zusammenspiel von TGF- $\beta$ -R I und TGF- $\beta$ -R II ist für die Aktivierung der Signalübermittlung nötig (133). In dem am besten charakterisierten TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg wird durch Bindung eines Liganden an die TGF- $\beta$ -Rezeptoren das Signal über Smad-Proteine übertragen, die in den Kern translozieren und so die Genexpression regulieren (25,95). Über diesen Weg wird die Expression von Cyclin D1 und cdk4, die wesentlich für die Zellzyklusprogression sind, herunterreguliert, dagegen die Transkription von Genen für extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen erhöht (47). Inhibitorische Smads (69,70) und andere Corepressoren wie Ski und SnoN können das Signal verhindern (94). Ebenso sind Interaktionen mit AP-1 bekannt (55,116). Betaglykan (TGF- $\beta$ -R III) ist dagegen hauptsächlich auf mesenchymalen Zellen lokalisiert. Bisher ist keine eigenständige Signalfunktion beschrieben worden, und es wird angenommen, daß er den beiden anderen Rezeptoren TGF- $\beta$  präsentiert (41,90). Neben einer TGF- $\beta$ -R II-Isoform wurden bisher verschiedene TGF- $\beta$ -R I-Isoformen identifiziert, wobei ALK5 der am weitesten verbreitete TGF- $\beta$ -R I ist (5). Zellen, die einen defekten TGF- $\beta$ -R II überexprimieren, sind gegenüber dem antiproliferativen Effekt auf epitheliale Zellen von TGF- $\beta$  resistent, reagieren auf TGF- $\beta$ 1 jedoch durch andere Wege, die

möglicherweise durch einen Rezeptor alleine initiiert werden können und bei Angiogenese und Metastasierung eine Rolle zu spielen scheinen (23). Der Verlust oder eine Störung der wachstumsinhibierenden TGF- $\beta$ -Funktion kann zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Trotz des bekannten inhibierenden Effektes auf die Proliferation epithelialer Zellen werden TGF- $\beta$ s von verschiedenen Karzinomen exprimiert, und einige Studien konnten eine Korrelation von erhöhter TGF- $\beta$ -Expression mit Tumorprogression und -metastasierung nachweisen (13,42,61). Für Pankreaskarzinome wird eine Überexpression der drei TGF- $\beta$ -Isoformen und des TGF- $\beta$ -R II beschrieben, assoziiert mit einer kürzeren postoperativen Überlebenszeit (41,42). Es ist noch nicht geklärt, ob dies durch einen direkten oder einen indirekten Einfluß von TGF- $\beta$  bewirkt wird, z. B. über eine gesteigerte Angiogenese, durch Immunsuppression, durch eine Veränderung der Wirkung anderer Wachstumsfaktoren oder eine vermehrte Synthese von extrazellulärer Matrix (51).

Der EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) stimuliert neben anderen Effekten die DNA-Synthese, Organentwicklung, -wachstum und -regeneration und ist an der Regulation der gastrointestinalen Sekretion beteiligt (24).

Sowohl EGF als auch TGF- $\alpha$  binden an den EGFR, eine Rezeptor-Tyrosinkinase. TGF- $\alpha$  scheint vielfach stärker als EGF zu wirken, so ist z. B. TGF- $\alpha$  in vielen zellulären Wirkungen potenter als EGF (30,72,73). Die Effekte in der Zellkultur können auto- oder parakrin sein, und sowohl EGF als auch TGF- $\alpha$  können die TGF- $\alpha$ -Expression induzieren (30). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) bewirkt nicht nur eine verstärkte Genexpression sondern auch eine Proliferation epithelialer Zellen. Ebenso sind Einflüsse auf die Zell-Zell-Adhäsion (über die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin oder p120<sup>ctn</sup>) und auf Transkriptionsfaktoren wie AP-1 bekannt (116). AP-1 ist eine kollektive Bezeichnung, die sich auf dimerische Transkriptionsfaktoren bezieht, welche sich aus Jun-, Fos- oder ATF-Untereinheiten zusammensetzen und an der AP-1-Bindungssequenz die DNA binden (65,104). Verschiedene AP-1-Faktoren regulieren verschiedene Zielgene und üben so unterschiedliche Funktionen aus.

Die AP-1-Aktivität wird durch Interaktionen mit spezifischen Proteinkinasen und einer Vielzahl von Koaktivatoren reguliert. So werden Fos, Jun und myc als frühe Antwortgene (immediate early genes) nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF oder TGF- $\beta$  rasch induziert (27,110). In den meisten Zellen werden sie auf niedrigem Niveau exprimiert und tragen über die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen zu längerdauernden Veränderungen im Zellphänotyp bei (104). Sie spielen eine wichtige Rolle bei Zellproliferation, Angiogenese, neoplastischer Transformation und Invasivität. Über ihre Fähigkeit, die Expression und Funktion von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 oder p53 zu regulieren, kontrollieren sie Leben und Tod der Zellen (122). Ebenso ist ein Einfluß auf das Immunsystem über die Bildung und Apoptose hämopoetischer Zellen bekannt (39).

Die Überexpression des EGFR, eines transmembranären Proteines mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, ist assoziiert mit einem malignen Phänotyp und einer erhöhten Invasions- und Metastasierungstendenz (24,78). Auch die Überexpression von TGF- $\alpha$  oder EGF führt zu einer abnormalen Proliferation und einem transformierten Phänotyp, wie Untersuchungen an verschiedenen epithelialen Karzinomen wie Pankreas-, Magen-, Mamma-, Plattenepithel- und Blasenkarzinomen, aber auch an Hepatomen und Gehirntumoren gezeigt haben. Bei einem Teil dieser Tumore korrelierte die EGF/EGFR-Überexpression mit dem Malignitätsgrad (7,24).

HGF (Hepatozyten-Wachstumsfaktor), auch *Scatter-Factor (SF)* genannt, wurde ursprünglich nach partieller Hepatektomie als potentes Mitogen für Hepatozyten identifiziert. HGF/SF übt ein weites Spektrum biologischer Funktionen auf eine Vielzahl von Zelltypen aus: So werden ihm neben einer Erhöhung der Motilität Einflüsse auf Morphogenese, Zellwachstum, -invasion und -ausbreitung, aber auch auf Angiogenese, Wundheilung und die zelluläre Adhäsion zugeschrieben (63,66). HGF/SF wird von vielen Geweben produziert, hauptsächlich von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, konnte jedoch auch bei einigen Tumorzellen (u. a. Pankreaskarzinomzellen) nachgewiesen werden (63,117). Der HGF-Rezeptor c-MET, ein Protein mit einer intrazellulären Tyrosinasedomäne, wird durch das Proto-Onkogen *c-met* kodiert und ist vor allem auf der Oberfläche

epithelialer Zellen nachweisbar, wo er im Bereich interzellulärer Verbindungen zusammen mit E-Cadherin lokalisiert ist (63). Im Gegensatz zu einer geringen Expression im normalen Pankreas wird *c-met* bei Pankreas- (33,67) und vielen anderen Karzinomen (58,76,135) überexprimiert. Bei Karzinomzellen könnte HGF/SF durch eine gesteigerte Tumorzellmotilität und damit Invasivität, ausgelöst durch eine verringerte Zell-Zell-Adhäsion, sowie durch Freisetzung matrixdegradierender Enzyme zur Initiierung und/oder Promotion der Karzinogenese beitragen (63,107,137).

**Ziel dieser Arbeit** war es, Einblick in mögliche Regulationsmechanismen zu bekommen, die zu einer verringerten Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen in unterschiedlich intensiv metastasierenden Pankreaskarzinomzelllinien führen. Ausgewählte Zelllinien sollten in Bezug auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ 1, -2 und -3, BMP's, Activine, EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-1 und IGF-2, FGF-2, HGF) und ihrer Rezeptoren analysiert werden. Die Expression der Proteine des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes (E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin) sollten mittels Northern Blot Hybridisierungen untersucht und die Ergebnisse mit dem Phänotyp, dem Differenzierungsgrad und den Eigenschaften der Zelllinien assoziiert und verglichen werden. Anschließend sollte festgestellt werden, ob die Stimulation der Pankreaskarzinomzelllinien mit Hormonen oder Wachstumsfaktoren einen Einfluß auf die Genexpression der Zell-Adhäsionsproteine sowie der Wachstumsfaktoren hat. Darüber hinaus wurde durch eine Inhibition möglicher autokriner Stimulationen der Zellen mittels Inaktivierung einiger Wachstumsfaktor-Rezeptoren deren Beteiligung an der Expressionsregulation der genannten Gene analysiert.

## II. Material und Methodik

### II.1 Häufig verwendete Lösungen

Angegeben sind die Stammlösungen, auf die sich auch die angegebenen Molaritäten beziehen.

SSC 20x:	Natriumzitat 0,3 M NaCl 3 M, pH 7
Denhardt's 50x:	Ficoll Typ 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA (Fraktion V) 1 %
TAE-Puffer 50x:	Tris-Base 2 M Eisessig 1 M EDTA 0,5 M, pH 8
MOPS 10x:	MOPS 200 mM Na-Azetat 80 mM EDTA 10 mM, pH 7
SDS-Puffer 1x:	Tris-HCl 62,5 mmol/l (pH 6,8) Glyzerol 10 % SDS 2 % $\beta$ -Merkaptoethanol 5 %
Denaturierungs- Lösung 1x:	Guanidiniumthioisozyanat 4 M Natriumzitat 25 mM, pH 7 N-Laurylsarkosin 0,5 % $\beta$ -Merkaptoethanol 0,1 M

TE-Puffer:	Tris-HCl 10 mM, pH 8 EDTA 1 mM
Gel-Lade-Puffer:	Glyzerin 50 % EDTA 1 mM Bromphenolblau 0,25 %
TAE-Agarosegel	Agarose 1 % TAE-Puffer 1x
Formaldehyd-Gel	Agarose 1 % MOPS 1x Formaldehyd 16 %

Sämtliche Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

## ***II.II Zellkultur***

### ***II.II.I Verwendete Zelllinien***

MIA PaCa-2:	ATCC CRL-1420, erstmalig beschrieben von (89)
PANC-1:	ATCC CRL-1469, erstmalig beschrieben von (88)
BxPC3:	ATCC CRL-1687, erstmalig beschrieben von (131)
AsPC1:	ATCC CRL-1682
NIH 3T3:	ATCC CRL-1658
AR4-2J:	ATCC CRL-1492, erstmalig beschrieben von (26,32)
PaTu 8988s:	Prof. Kern/Dr. Elsässer, Universität Marburg
PaTu 8988t:	Prof. Kern/Dr. Elsässer, Universität Marburg beide Zelllinien erstmalig beschrieben von (37)

### **II.II.II Kulturmedien**

Als Medium wurde für die Zelllinien PANC-1 und die Rattenpankreasfibroblasten Dulbecos modified Eagle´ medium (DMEM, Fa. Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe), für die Zelllinien BxPC3, MIA Paca-2, PaTu 8988s, PaTu 8988t und NIH 3T3 Minimal essential medium (MEM, Fa. Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe) verwendet. Diesen Medien wurden 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe), Glutamin 200 mM, Penicillin 10 000 IU/ml und Streptomycin 10 mg/ml (jeweils Fa. Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe) zugegeben und die gesamte Lösung durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Die Zellkulturgefäße wurden von der Firma Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg) erworben.

### **II.II.III Kulturbedingungen**

Die Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10 % bei DMEM bzw. 5 % bei MEM bei einem Medienwechsel jeden 2. Tag so lange kultiviert, bis sie konfluent waren. Einem Teil der Zellen wurden verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone oder Antikörper für etwa 24 Stunden zugegeben (genaue Daten siehe III. Ergebnisse). Je nach Versuch wurden die Zelllinien vor der Stimulation durch Inkubation in einem Medium ohne FCS, jedoch mit 1 % BSA zwischen 24 und 48 Stunden (genaue Daten siehe III. Ergebnisse) in einen Ruhezustand versetzt.

Endkonzentrationen der eingesetzten Stimulatoren bzw. Inhibitoren, die bei Zellkonfluenz dem jeweiligen Nährmedium (Angaben je ml Kulturmedium) zugegeben wurden:

Wachstumsfaktoren: TGF-β1: 10 ng/ml, IGF-1: 20 ng/ml, EGF: 20 ng/ml.

Hormone: CCK von 10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-10</sup> M.

anti-EGFR-Antikörper: 67 µg/ml,

anti-TGF-β-Antikörper: 0,5 µg/ml

Bezugsquelle der Wachstumsfaktoren war die Fa. Pepro Tech (Rocky Hill, New York, USA), der neutralisierenden Antikörper die Fa. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA) für anti-EGFR und R&D Systems (Freiburg) für anti-TGF- $\beta$ -RII.

### ***II.III Ribonukleinsäureisolierung aus Gewebe***

Das übereinstimmend mit den lokalen Ethikbestimmungen aus Operationspräparaten gewonnene Gewebe von menschlichen Pankreaskarzinomen und gesundem Pankreas der gleichen Patienten wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Labor wurde es in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und in 5 ml Denaturierungslösung (siehe II.I), die die RNase-Inhibitoren Guanidiniumisothiozyanat und  $\beta$ -Merkaptoethanol enthält, aufgenommen und anschließend homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen 70%igen Ethanol versetzt und mit Hilfe des RNeasy-Midi-Kits der Fa. Qiagen (Hilden) aufgearbeitet. Dabei wurden vor allem die RNA-Moleküle mit einer Länge über 200 Nukleotiden an eine Silikatgelmatrix in einer Zentrifugensäule gebunden, mit Hilfe verschiedener Waschpuffer aufgereinigt und dreimal in DEPC-Wasser eluiert. Anschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Zur Kontrolle der ermittelten Konzentration und zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde eine Elektrophorese in einem 1%igem TAE-Agarosegel durchgeführt.

### ***II.IV Ribonukleinsäureisolierung aus Zellkulturen***

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen erfolgte nach der Anleitung für RNeasy Midi- bzw. Mini-Präparationen der Firma Qiagen: Die Zellen wurden zuerst mit CMF-PBS gewaschen und danach durch Zugabe von guanidiniumthioisozyanat-haltigem Puffer (RLT-Puffer), dem 1 %  $\beta$ -Merkaptoethanol zugesetzt wurde, lysiert. Durch mehrmaliges Aufziehen durch eine

Injektionskanüle Gr. 21G wurden die Zellen homogenisiert und dem Homogenat anschließend das gleiche Volumen 70%iges Ethanol zugesetzt. Gemäß der Anleitung wurden die Proben und anschließend verschiedene Waschpuffer auf Zentrifugensäulen aufgetragen. Die an eine Silikatgelmatrix gebundenen RNA-Moleküle wurden anschließend dreimal mit RNase-freiem Wasser eluiert.

## **II.V Northern-Blot**

Mittels Northern-Blots wurden die RNA's der Größe nach in Formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen übertragen.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde der (in Wasser gelösten) Agarose 1/10 des Volumens 10 x MOPS und nach Abkühlung auf 60 - 65° C Formaldehyd (16 % des Endvolumens) zugegeben. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS (siehe II.I).

Probenvorbereitung:

RNA (40 µg)	9,6 µl
MOPS 10x	4,0 µl
Formaldehyd (37 %)	6,4 µl
deionisiertes Formamid	<u>20,0 µl</u>
Auffüllen mit Wasser auf	40,0 µl

Die RNA-Proben wurden anschließend bei 65° C denaturiert, auf Eis abgekühlt, mit Gel-Lade-Puffer (siehe II.I) versetzt und auf das vorbereitete Gel aufgetragen.

Direkt nach der Elektrophorese wurde das Gel in 1%igem Ethidiumbromid inkubiert, die RNA-Banden unter UV-Licht dargestellt und anschließend das Gel zusammen mit der Nylonmembran (Hybond+, Amersham, Braunschweig) in 20x SSC (siehe II.I) eingelegt.

Die Membran wurde nun auf das Gel, welches sich auf einer mit 20x SSC ständig befeuchteten Filterpapierbrücke befand, gelegt, 5 cm saugfähiges

Papier darüber gestapelt und mit 1,5 kg beschwert. Durch das Ansaugen des Puffers mittels Kapillarkraft wurden die Nukleinsäuren über einen Zeitraum von 18 bis 24 Stunden auf die Nylonmembran transferiert.

Durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stragene, Amsterdam, Niederlande) wurden anschließend Membran und RNA kovalent miteinander vernetzt.

## ***II.VI Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli***

Plasmide sind meist ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die getrennt von der chromosomalen DNA einer Zelle vorliegen. Diese extrachromosomalen DNA-Elemente existieren in einem parasitischen oder symbiotischen Verhältnis mit ihrer Wirtszelle und werden auch an die Tochterzellen weitergegeben. Mit dem entsprechenden Plasmid transfizierte *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  wurden in LB-Medium (10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract und 10 g NaCl in 1 l destilliertem Wasser bei pH 7) über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37° C kultiviert. Dem LB-Medium wurde ein entsprechendes Antibiotikum (50  $\mu$ g /ml) zugesetzt, unter welchem nur die Bakterien überleben konnten, die mit dem Plasmid eine Resistenz erworben hatten. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert und das Sediment resuspendiert. Mit Hilfe des Plasmid Mini- bzw. Midi-Kits der Firma Qiagen wurden die Bakterien durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen und Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Bindung an eine Ionenaustauschersäule mit Hilfe verschiedener Puffer aufgereinigt. Daraufhin wurde die nach Firmenanleitung eluierte DNA mit Isopropanol ausgefällt, zentrifugiert, das Sediment mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer gelöst.

## **II.VII cDNA-Herstellung**

Sonden sind spezifische DNA-Sequenzen zum Nachweis einer bestimmten mRNA. Die Sonden wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen, welche DNA-Moleküle an spezifischen, aus wenigen Nukleotiden bestehenden Erkennungsstellen erkennen, aus dem (bei II.VII gewonnen) Plasmid herausgeschnitten (Inkubation drei Stunden bei 37° C). Anschließend wurde die Probe im Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen, mit dem dreifachen Volumen Puffer QX1 (Gelextraktionskit "QIAquick" der Fa. Qiagen) versetzt und das Gel bei 50° C über 10 Minuten gelöst. Gemäß der Anleitung wurde die Lösung auf die Säulen gegeben, zentrifugiert, mit den vorgegebenen Puffern gewaschen und schließlich die DNA eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anschließend semiquantitativ im Agarosegel, d. h. durch den Vergleich der Bandenintensität der gewonnenen Sonde mit Markerbanden, die jeweils eine genau definierte Menge an DNA enthielten.

## **II.VIII Hybridisierung**

Um unspezifische Signale zu unterbinden, wurden die Nylon-Filter der Northern Blots über 24 Stunden in einem Puffer aus Formamid (50 %), 6x SSC, 5x Denhardt's (siehe II.I), SDS (0,5 %) und 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, dem 100 µg/ml Lachsspermien-DNA (ss-DNA, die zur Auftrennung der DNA-Stränge bei 95° C denaturiert wurde), 100 µg/ml tRNA und 10 µg/ml Poly-U zugesetzt worden sind, bei 42° C prähybridisiert.

Die zu markierende cDNA (25 ng/Northern Blot, siehe Tabelle 1) wurde zusammen mit etwas DEPC-Wasser 5 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden Zufalls-Hexanukleotid-Primer an die denaturierte Sonde gebunden und unter Einbau des radioaktiven Nukleotids ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP) durch das „Klenow-Enzym“ (Polymerase-I) nach Herstellerangaben (Random-Priming-Kit RPN 1601 Y der Firma Amersham, Braunschweig) zu kurzen Einzelsträngen verlängert. Diese Reaktion fand bei

37° C über drei Stunden im Wasserbad oder über Nacht bei Raumtemperatur statt und wurde durch Zugabe von EDTA (20mM) gestoppt. Zur Abtrennung nichtgebundener Nukleotide wurden tRNA (0,05 mg/ml), Na-Azetat 3 M (pH 5,2) und Ethanol (100%ig) zugegeben, bei -70° C gefällt und danach zentrifugiert. Das Sediment wurde in TE-Puffer gelöst, bei 95° C denaturiert und die Radioaktivität im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Diese Lösung wurde dann in einer Konzentration von 0,5 bis  $1 \times 10^6$  Zerfälle/cm<sup>3</sup>/min den Northern-Blots in obigem Prä- bzw. Hybridisierungspuffer zugegeben und die Blots über Nacht bei 42° C hybridisiert. Um unspezifisch- oder nichtgebundene Sonden abzutrennen, wurden die Blots in einer Lösung aus 2x SSC (Puffer) und 0,1 % SDS (Detergens) zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur, dann bei 67° C im Schüttelwasserbad gewaschen. Mit absteigender SSC-Konzentration (0,25x SSC, 0,1x SSC) mit jeweils 0,1 % SDS wurden die Blots gewaschen, bis eine Aktivität von < 20 Zerfälle/cm<sup>2</sup>/min erreicht war.

Es wurden folgende cDNA's verwendet (Tabelle 1):

Tabelle 1: Bezugsquelle der verwendeten cDNA's

<u>Homologes Gen</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<b>EGF:</b>	human, ATCC-Nr. 59959
<b>EGFR:</b>	human, ATCC-Nr. 57347
<b>FGF-2:</b>	human, von Dr. Welch, GBF Braunschweig
<b>IGF-1:</b>	Maus, ATCC-Nr. 63070
<b>IGF-2:</b>	human, ATCC-Nr. 57483
<b>TGF-<math>\alpha</math>:</b>	human, ATCC-Nr. 59953
<b>TGF-<math>\beta</math>-RI (ALK-5):</b>	human, von Dr. M. G. Brattain, Medical College of Ohio, Ohio
<b>TGF-<math>\beta</math>-RII:</b>	human, von Dr. M. G. Brattain, Medical College of Ohio, Ohio
<b>Activin-<math>\beta</math>B:</b>	Maus, von Dr. H. Schrewe, MPI für Immunologie, Freiburg
<b>Activin-<math>\beta</math>C:</b>	Maus, von Dr. H. Schrewe, MPI für Immunologie, Freiburg
<b>BMP-2:</b>	Frosch, von Prof. W. Knöchel, Ulm
<b>BMP-4:</b>	Frosch, von Prof. W. Knöchel, Ulm
<b>BMP-7:</b>	human, ATCC-Nr. 68020
<b>TGF-<math>\beta</math>1:</b>	human, von R. Derynck, University of California, San Franzisko
<b>TGF-<math>\beta</math>2:</b>	human, von R. Derynck, University of California, San Franzisko
<b>TGF-<math>\beta</math>3:</b>	human, von R. Derynck, University of California, San Franzisko
<b>P 85<math>\alpha</math>:</b>	human, von Prof. Wetzger, Magdeburg
<b>P 110<math>\alpha</math>:</b>	human, von Prof. Wetzger, Magdeburg
<b>P 110<math>\gamma</math>:</b>	human, von Prof. Wetzger, Magdeburg
<b>E-Cadherin:</b>	human, von Fr. Dr. Bussemaker, Universität Groningen, Niederlande
<b>Catenin <math>\alpha</math>:</b>	human, von Prof. Gress, Universität Ulm
<b>Catenin <math>\beta</math>:</b>	human, von Prof. Gress, Universität Ulm
<b>Catenin <math>\gamma</math>:</b>	human, von Prof. Gress, Universität Ulm
<b>Kollagen I:</b>	human, ATCC-Nr. 61322
<b>Kollagen III:</b>	human, ATCC-Nr. 61325
<b>c-myc:</b>	human, ATCC-Nr. 41010
<b>c-jun:</b>	Maus, ATCC-Nr. 63026
<b>c-fos:</b>	Human, ATCC-Nr. 41040
<b>c-met:</b>	human, von Prof. Birchmeier, MDC Berlin
<b>HGF:</b>	human, von Prof. Birchmeier, MDC Berlin
<b>Actin (beta):</b>	human, ATCC-Nr. 55129
<b>18S-rRNA:</b>	human, von Prof. Gress, Universität Ulm

## ***II.IX Auswertung***

Die hybridisierten Membranen wurden für 2 bis 21 Tage bei  $-70^{\circ}$  C auf Röntgenfilmen exponiert (Kodak XAR, Rochester, New York, USA) und diese nach der Entwicklung mit dem HP DeskJet 4-Scanner aufgenommen.

Um Differenzen durch ungleichmäßige Ladung der RNA auszugleichen, wurden die Blots mit 18S-rRNA hybridisiert und im Falle von Dichteunterschieden bei der densitometrischen Ausmessung der einzelnen RNA-Banden mit Hilfe der 1 D Gelanalyse-Software von Phoretix (Tyne, UK) die zuvor ermittelte Intensität anhand der 18S-mRNA-Werte normalisiert. Zur Verminderung falscher Ergebnisse wurden die Hybridisierungen der verschiedenen Zelllinien mehrfach auf unterschiedlichen Northern Blots durchgeführt. Die eingesetzten Northern Blots wurden zum Teil mehrfach hybridisiert.

Häufig wurden die Abbildungen im Ergebnisteil aus zwei Northern Blots zusammengesetzt und dies mit einem Strich gekennzeichnet. Obwohl alle Expressionen anhand der 18S-Hybridisierungen normalisiert wurden, wird dies nur bei den Stimulationsblots durch eine in einem Kästchen unter dem eigentlichen Blot abgebildeten 18S-rRNA-Hybridisierung verdeutlicht.

### III. Ergebnisse

#### III.1 Vergleich der Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle in Pankreaskarzinomgewebe

Mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierung wurden die Konzentrationen verschiedener mRNAs in Pankreaskarzinomgewebe untersucht und mit den Konzentrationen in gesunden Anteilen desselben Gewebes verglichen.

Im Gegensatz zu der fehlenden oder schwachen Expression bei den Karzinomgeweben werden E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin von gesundem Pankreasgewebe stark exprimiert. Dagegen wird  $\gamma$ -Catenin nur von Karzinomgewebe exprimiert und  $\alpha$ -Catenin sowohl von Karzinom- als auch von Kontrollgewebe (Abbildung 1).

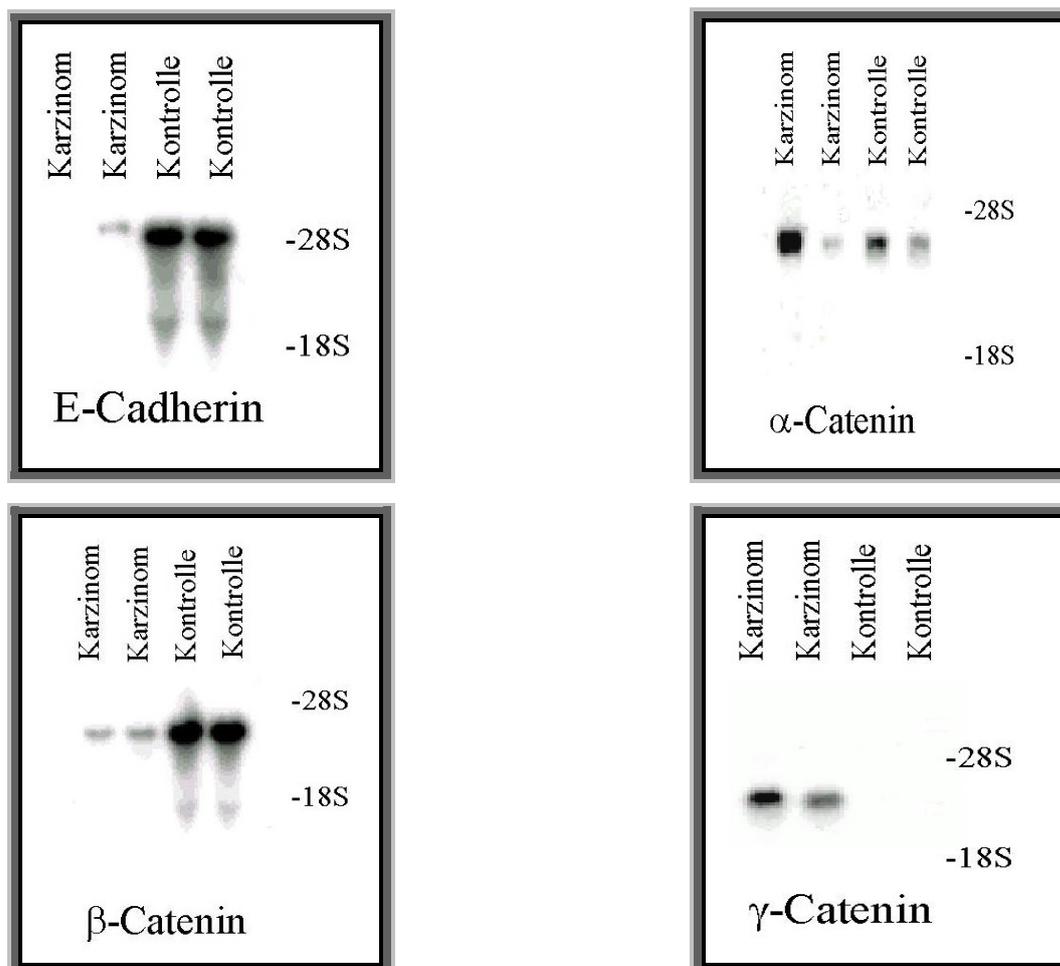


Abbildung 1: Hybridisierung von Gesamt-RNA aus menschlichem Pankreaskarzinom- und Kontrollgewebe des jeweils gleichen Patienten mit cDNA-Sonden spezifisch für E-Cadherin und  $\alpha$ -,  $\beta$  und  $\gamma$ -Catenin.

### **III.II Vergleich der Pankreaskarzinomzelllinien**

#### **Kurzbeschreibung der Pankreaskarzinomzelllinien**

Die in dieser Arbeit verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien weisen unterschiedliche Charakteristika bezüglich Wachstum und Malignität auf. Die von den jeweiligen Erstautoren (siehe Material und Methodik II.II.1) beschriebenen Verdoppelungszeiten konnten nachvollzogen werden. Zur Vervollständigung der nachfolgenden Charakterisierung wurde das Invasionsverhalten in Nacktmäusen aus den Originalarbeiten übernommen.

*PaTu 8988s* und *PaTu 8988t* sind zwei menschliche Zelllinien, die aus der Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas gewonnen wurden. Bei *PaTu 8988s* findet man in Zellhaufen wachsende kleine, polyedrische Zellen, die in Nacktmäusen einen soliden Tumor bilden, relativ undifferenziert sind und einen eher epithelialen Phänotyp besitzen. Im Gegensatz dazu bildet *PaTu 8988t* einen konfluenten Zellrasen mit spindelzelligen und runden Zelltypen, die in Nacktmäusen Tumore mit tubulären Strukturen bilden. Die Tumore der Zelllinie *PaTu 8988t* sind wesentlich differenzierter als die der Zelllinie *PaTu 8988s* und der Phänotyp erscheint unter Kulturbedingungen eher mesenchymal. Die Verdoppelungszeit liegt bei *PaTu 8988s* wesentlich höher als bei *PaTu 8988t* und *PaTu 8988s* kann im Gegensatz zu *PaTu 8988t* nach Injektion in Nacktmäuse metastasieren.

*MIA PaCa-2* ist eine undifferenzierte menschliche Pankreaskarzinomzelllinie mit einigen biochemischen Ähnlichkeiten zu duktalem Zellen. *MIA PaCa-2* wachsen nur lose aneinandergeheftet und haben einen irregulären bis runden Phänotyp. Auch *MIA PaCa-2*-Zellen können nach Injektion in Nacktmäuse metastasieren.

*PANC-1* wächst plattenepithelialartig oder nach ausreichender Konfluenz kuboidal bis säulenartig und zeigt einen epithelialen Phänotyp. Die Zellen weisen keine Kontaktinhibition auf und wachsen mehrschichtig. Bei Wachstum über die Konfluenz hinaus bilden die Zellen Zellhaufen. Die Zelllinie hat einige

Charakteristika der normalen duktaalen Zellen des Pankreas beibehalten wie geringe Mengen  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, große Mengen an Carboanhydrase und die basolaterale Lokalisation der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Die Verdoppelungszeit liegt bei etwa 52 Stunden, in der Nacktmaus bilden diese Zellen ein anaplastisches Karzinom.

*BxPC3* ist eine mäßig bis schlecht differenzierte epitheliale Zelllinie, die aus einer Biopsie eines humanen Adenokarzinoms des Pankreas entstanden ist. Die Zellverdoppelungszeit beträgt in der Zellkultur 48 bis 60 Stunden. Bisher konnte in der Nacktmaus keine bzw. eine sehr schwache Metastasierung festgestellt werden.

Die undifferenzierte Zelllinie *AR4-2J* ist aus Asazerin-induzierten malignen Knoten des Rattenpankreas hervorgegangen. Ihr Ursprung ist azinär, die Zellen synthetisieren, speichern und sezernieren Verdauungsenzyme und besitzen zusätzlich einige Charakteristika neuroendokriner Zellen.

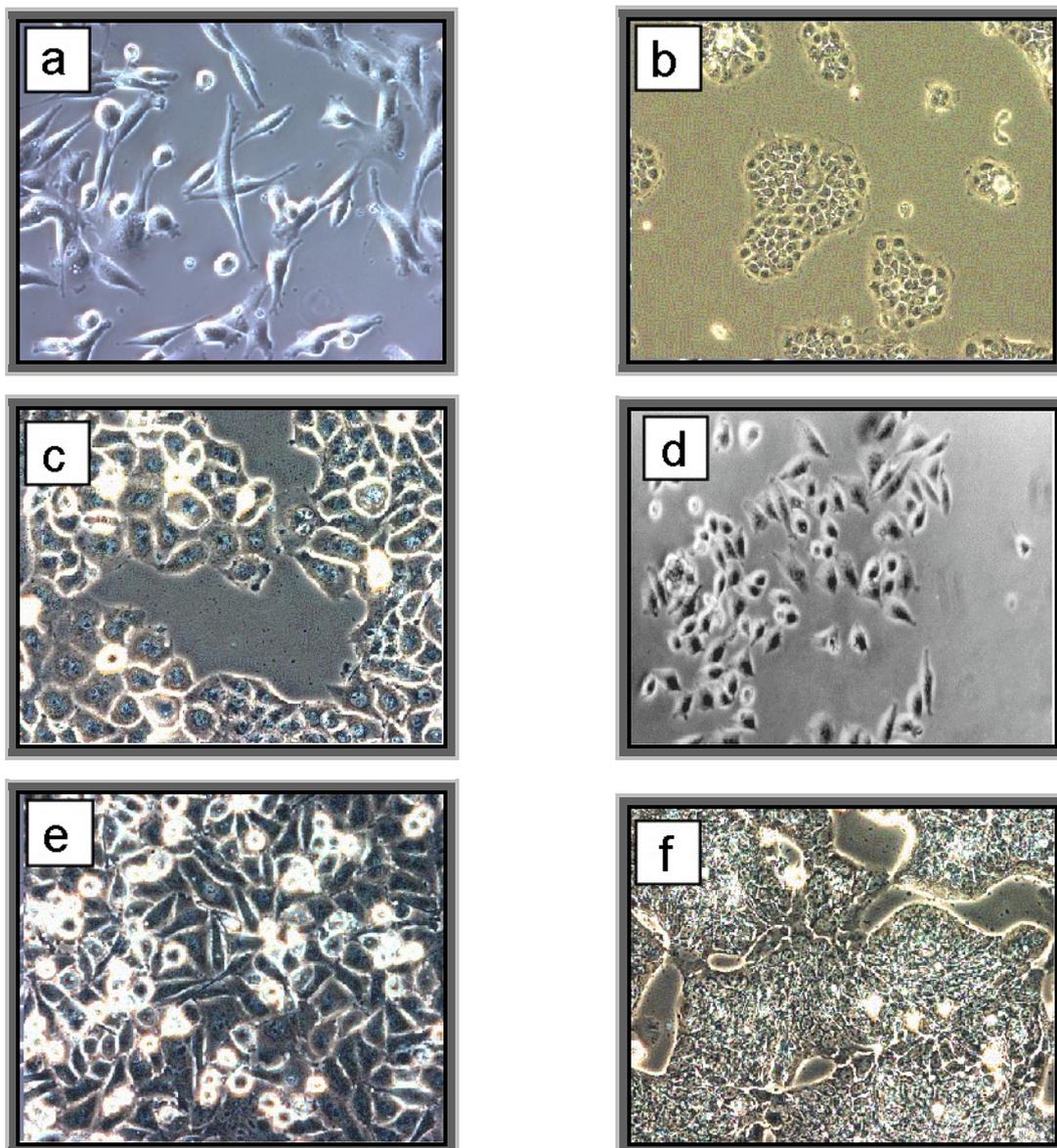


Abbildung 2: Phasenkontrastfotos der in dieser Arbeit benutzten Zelllinien

a:	NIH 3T3	d:	MIA PaCa2
b:	BxPC3	e:	PaTu 8988t
c:	PANC1	f:	PaTu 8988s

21fache Vergrößerung bei a, b, d und f,  
42fache Vergrößerung bei c und e

### **III.II.I Expression von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen**

Mit Hilfe einer humanen E-Cadherin-spezifischen Sonde konnte durch die Hybridisierung von Northern Blots, die Gesamt-RNA der verschiedenen Zelllinien enthielten, gezeigt werden, daß E-Cadherin von den Zelllinien BxPC3, AsPC1 und PaTu 8988s exprimiert wird, nicht jedoch von MIA PaCa-2, PANC-1, PaTu 8988t, AR4-2J oder NIH 3T3 (Mausfibroblasten) bzw. einer im Labor etablierten Rattenfibroblastenzelllinie. Im Gegensatz zu der zwischen den verschiedenen Zelllinien stark unterschiedlichen E-Cadherin-Expression werden die drei untersuchten Catenine von allen humanen Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert (siehe Abbildung 3). Während sich sowohl bei  $\alpha$ -Catenin als auch bei  $\beta$ -Catenin keine starken Expressionsunterschiede zeigen, wird  $\gamma$ -Catenin von den einzelnen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert: PANC-1, BxPC3, AsPC1 und PaTu 8988s zeigen sehr kräftige Expressionen, MIA PaCa-2 und PaTu 8988t eine deutlich schwächere. Bei der Rattenpankreaszinomzelllinie AR4-2J oder den Fibroblasten ist keine Expression von  $\gamma$ -Catenin nachweisbar (siehe Abbildung 3).

Zur Bestimmung der Bandengrößen wurden die 28S- und 18S-Banden in die Abbildungen eingezeichnet. Die 28S-Bande entspricht beim Mensch 5,0 kb, bei der Maus 4,7 kb. Die 18S-Bande verläuft auf der Größe von 1,9 kb bei Mensch und Maus.

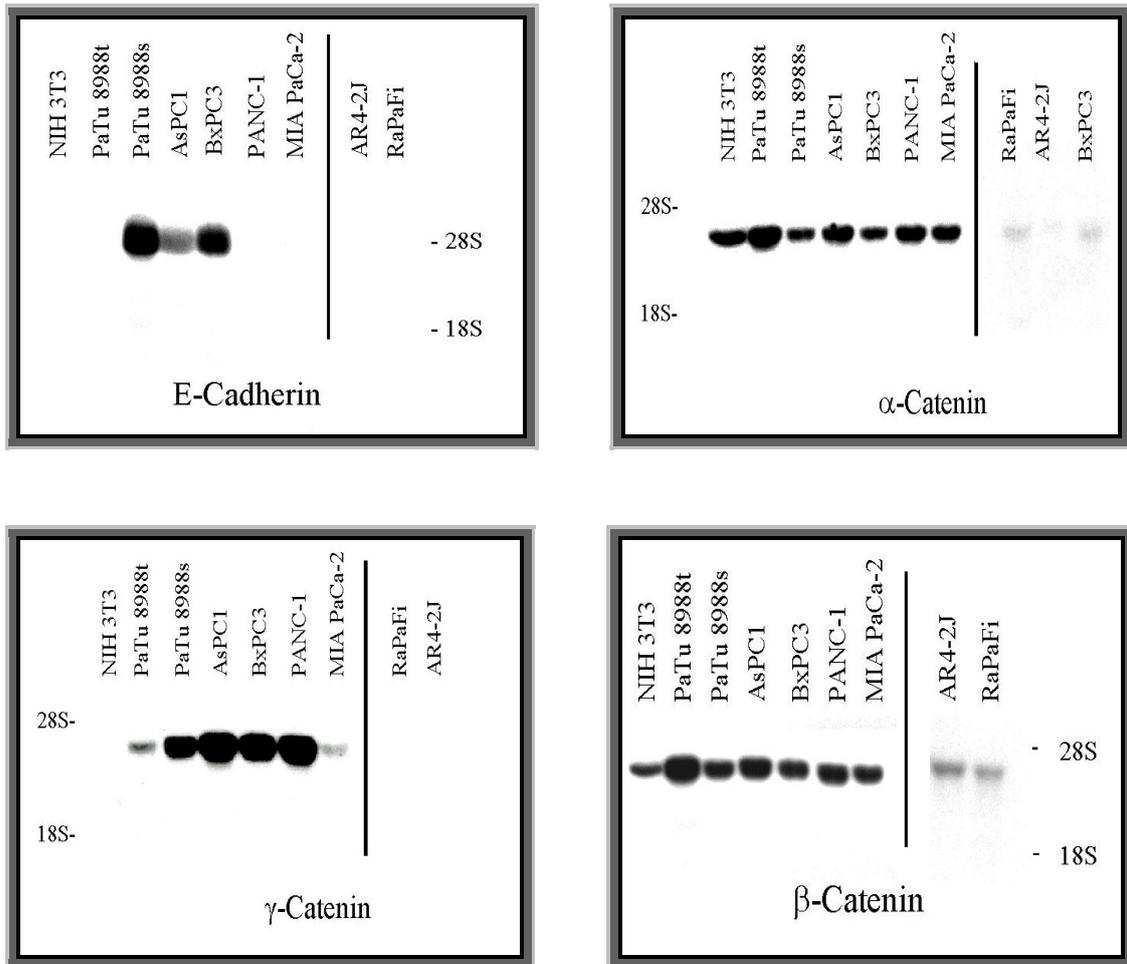


Abbildung 3: Hybridisierungen verschiedener Zelllinien mit Sonden spezifisch für E-Cadherin (4,7 kb),  $\alpha$ -Catenin (3,3 kb),  $\beta$ -Catenin (3,3 kb) und  $\gamma$ -Catenin (3,5 kb). Da es sich um zusammengesetzte Northern Blots handelt wurde ein Trennstrich zur Kennzeichnung eingefügt.

### **III.II.II Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$ 1 wird von allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3 und PaTu 8988t) exprimiert, AR4-2J als Rattenpankreaskarzinomzelllinie (azinäre Zelllinie) hat dagegen keine der drei TGF- $\beta$ -mRNAs. Bei TGF- $\beta$ 2 finden sich Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien: TGF- $\beta$ 2 wird von PaTu 8988t und AsPC1 stark exprimiert, bei PANC-1 zeigt sich nur eine äußerst schwache Bande (nicht abbildbar). TGF- $\beta$ 3 wird von den Fibroblasten stark exprimiert, wohingegen von den Pankreaskarzinomzelllinien nur einige eine schwache Bande aufweisen (MIA PaCa-2, PANC-1 und BxPC3).

Auch bei den Rezeptoren finden sich Unterschiede: Eine deutliche Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptor I kann bei MIA PaCa-2, PANC-1 und BxPC3 nachgewiesen werden. Dagegen zeichnet sich bei dem TGF- $\beta$ -Rezeptor II neben der kräftigen Bande bei PANC-1 und BxPC3 bei MIA PaCa-2 nur eine etwas unterhalb der erwarteten Bande von 4,6 kb gelegene schwache Bande ab (Abbildung 4).

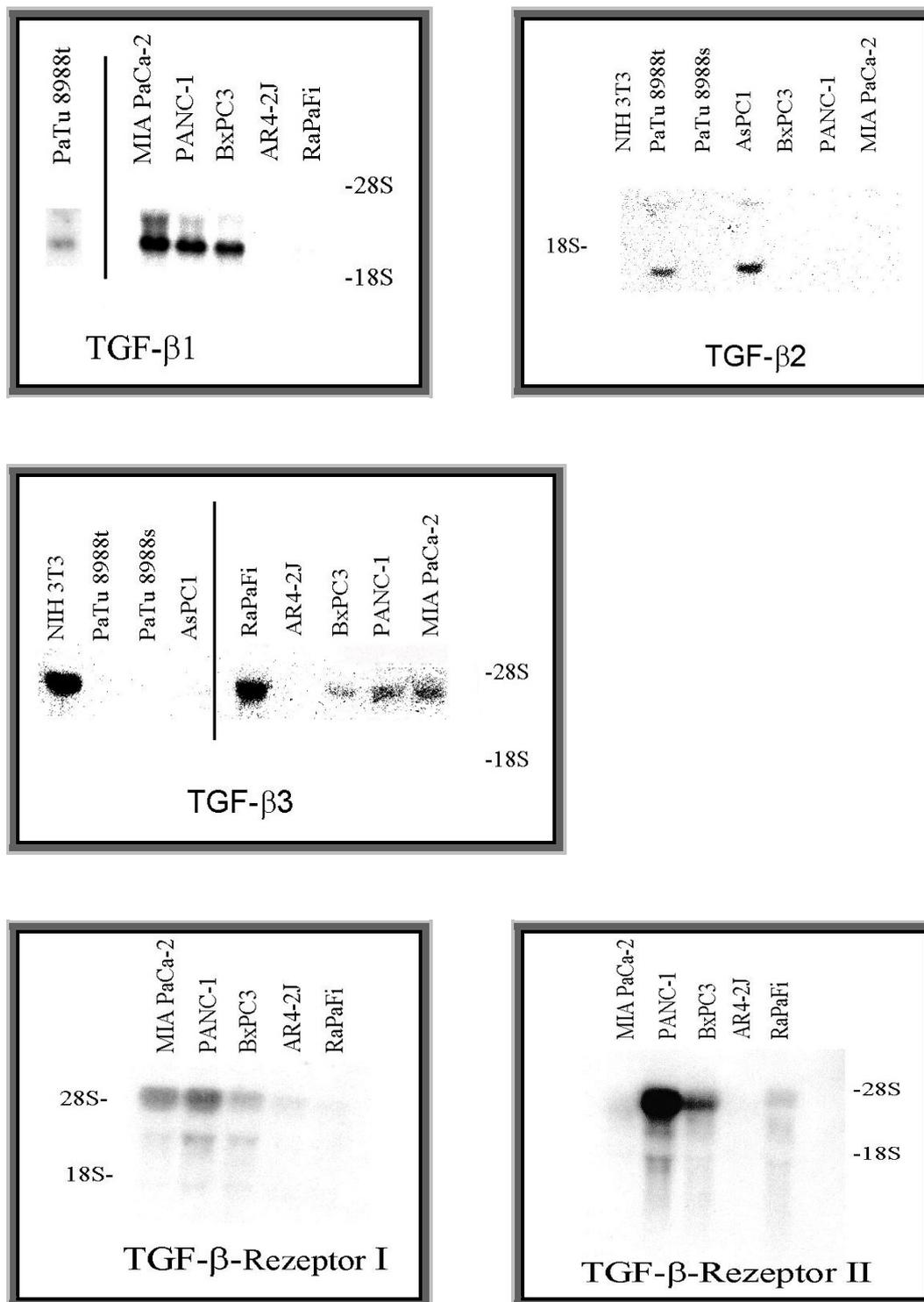


Abbildung 4: Hybridisierungen verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien und Ratten- bzw. Mausfibroblasten mit cDNA's von TGF-β1 bis TGF-β3 und der TGF-β-Rezeptoren I und II.

### **III.II.III Weitere Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren**

#### **III.II.III.I Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) und Activine**

BMP-2, BMP-4 und BMP-7 werden in allen humanen Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert, BMP-2 äußerst schwach (ohne Abbildung), BMP-4 und BMP-7 dagegen mit deutlichen Expressionsunterschieden zwischen den einzelnen Zelllinien: Eine starke Expression von BMP-4 kann bei AsPC1 und PaTu 8988t nachgewiesen werden, eine mittelstarke bei MIA PaCa-2, PANC-1, AR4-2J und PaTu 8988s, während bei der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3 und den Fibroblasten BMP-4 nur schwach exprimiert wird. Nach Hybridisierung mit der humanen cDNA-Sonde für BMP-7 zeigen MIA PaCa-2, PANC-1 und AsPC1 eine deutliche Bande, PaTu 8988s, PaTu 8988t und BxPC3 eine etwas schwächere. Bei den Mausfibroblasten kann keine Expression von BMP-7 nachgewiesen werden (Abbildung 5).

Ein weiteres Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie ist Activin. Die Isoform Activin  $\beta$ B (eine aus Maus-cDNA isolierte Sonde) wird von MIA PaCa-2, BxPC3, PANC-1 und AR4-2J sehr schwach exprimiert, bei den Rattenpankreasfibroblasten ist keine Expression nachweisbar. Activin  $\beta$ C (ebenfalls eine Maussonde) ist bei keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar (ohne Abbildungen).

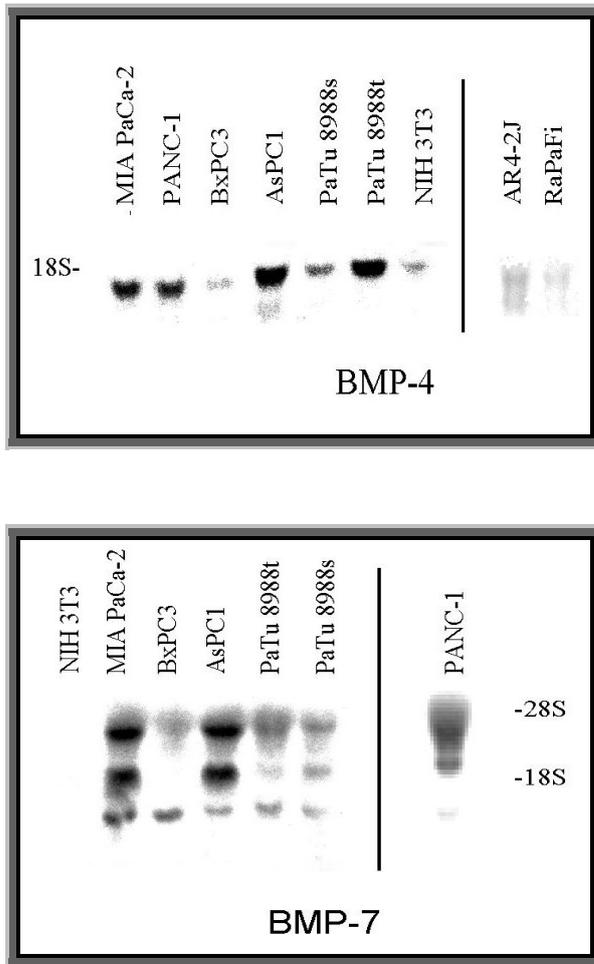


Abbildung 5: Hybridisierung von Northern Blots verschiedener Zelllinien mit BMP-4 (Xenopus-sonde) und BMP-7 (humane Sonde).

### III.II.III.II Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)

FGF-2 ist bei Pankreaskarzinomen überexprimiert. Bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien wird FGF-2 am stärksten von MIA PaCa-2 exprimiert, gefolgt von PANC-1 und BxPC3. AR4-2J und die Rattenpankreasfibroblasten zeigen keine Expression (Abbildung 6).

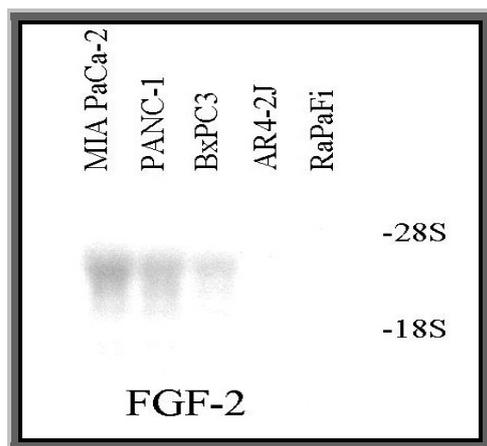


Abbildung 6: Hybridisierung der Gesamt-RNA der Zelllinien MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3, AR4-2J und Rattenpankreasfibroblasten mit spezifischer FGF-2-cDNA.

### III.II.III.III Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)

Die IGF-1-mRNA wird von den Zelllinien AsPC1 und PaTu 8988t stark und von PANC-1 etwas schwächer exprimiert. Bei PaTu 8988s, MIA PaCa-2, BxPC3 und NIH 3T3 liegt die Expression unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 7).

IGF-2 (humane cDNA) wird nur von der Rattenpankreasarkzinomzelllinie AR4-2J stark exprimiert. Bei den Rattenfibroblasten und den humanen Zelllinien MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3 ist die Expression auf den Northern Blots kaum sichtbar (Abbildung 7).

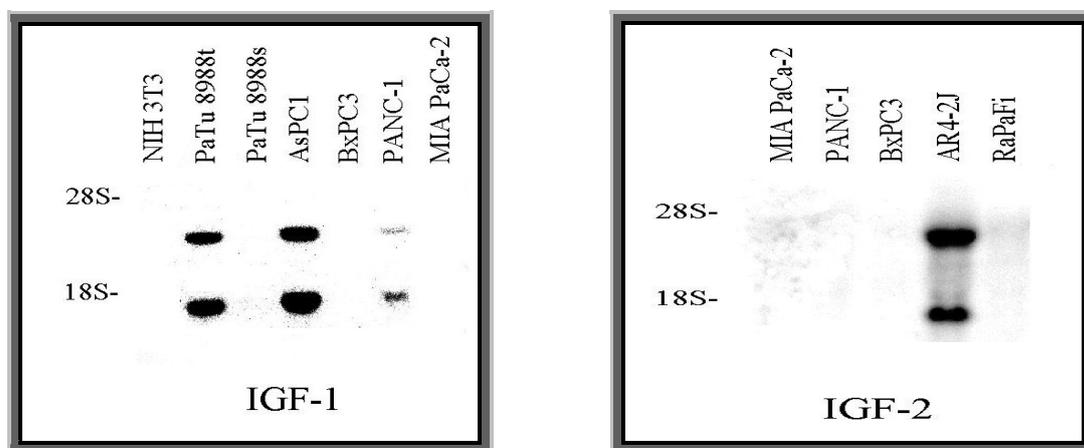


Abbildung 7: Hybridisierung der Gesamt-RNA verschiedener Zelllinien mit der Maus-Sonde für IGF-1 bzw. der humanen Sonde für IGF-2.

### III.II.III.IV EGF, TGF- $\alpha$ und Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

EGF-mRNA kann bei keiner der untersuchten Zelllinien im Northern Blot nachgewiesen werden. Die Expression von TGF- $\alpha$  ist in allen untersuchten Zelllinien mittelstark ohne deutliche Expressionsunterschiede (ohne Abbildung). Im Gegensatz dazu zeigen sich beim EGFR deutliche Unterschiede zum einen zwischen den einzelnen Zelllinien, zum anderen auch in der Bandenintensität. Eine starke Expression des EGFR ist bei der Zelllinie AsPC1 nachweisbar, eine mittlere bei PaTu 8988t, PANC-1 und BxPC3 und eine schwache bei PaTu 8988s und MIA PaCa-2 (Abbildung 8). Bei NIH 3T3 kann keine Expression nachgewiesen werden. Auffällig sind die Expressionsunterschiede zwischen der in der Literatur beschriebenen 10,5 und 5,8 kb Bande, d. h. daß die 10,5 kb große Bande von mehr Zelllinien exprimiert wird als die 5,8 kb große Bande und auch die Intensität unterschiedlich ist. Daneben zeigen sich noch zwei weitere Banden mit einer Größe von 4,5 und 1,7 kb, die durch Abbaubanden, Kreuzhybridisierung oder Isoformen zustande gekommen sein können.

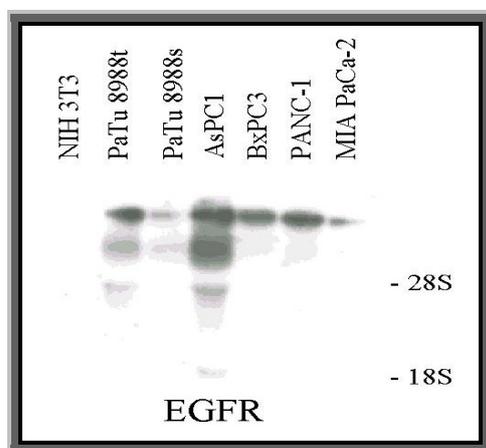


Abbildung 8: Bestimmung der mRNA-Konzentration verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien mit spezifischer EGFR-cDNA. Neben den erwarteten Banden von 5,8 und 10,5 kb Größe zeigen sich weitere Banden.

### III.II.III.V Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und HGF-Rezeptor c-met

HGF wird nur von den beiden untersuchten Fibroblastenzelllinien (Maus und Ratte) exprimiert, nicht dagegen von den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (ohne Abbildung). Gleichzeitig mit HGF exprimieren die NIH 3T3-Fibroblasten auch den HGF-Rezeptor c-met. C-met wird - allerdings schwächer - auch in den Pankreaskarzinomzelllinien in unterschiedlicher Intensität exprimiert: Die Stärke der Expression nimmt von AsPC1 über BxPC3 und AR4-2J ab, bei PaTu 8988s und PaTu 8988t ist die Bande kaum mehr sichtbar (Abbildung 9).

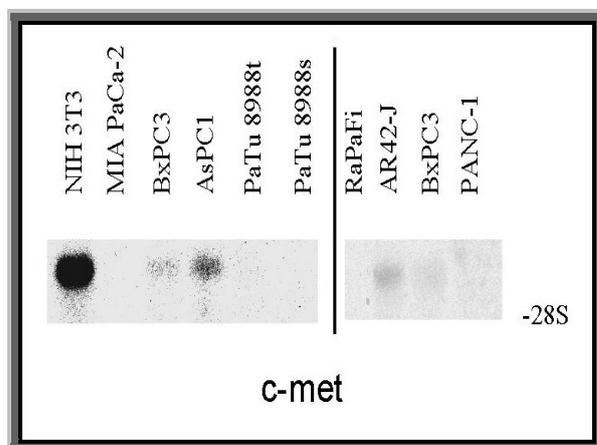


Abbildung 9: Hybridisierung von verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien, Maus- und Rattenpankreasfibroblasten mit dem HGF-Rezeptor c-met.

### III.II.IV Transkriptionsfaktoren

C-myc wie auch c-jun sind bei allen untersuchten Zelllinien nachweisbar, wenn sie auch zum Teil sehr schwach exprimiert werden. Auffällig ist die starke Expression beider Transkriptionsfaktoren bei MIA PaCa-2- und PANC-1-Zellen (Abbildung 10).

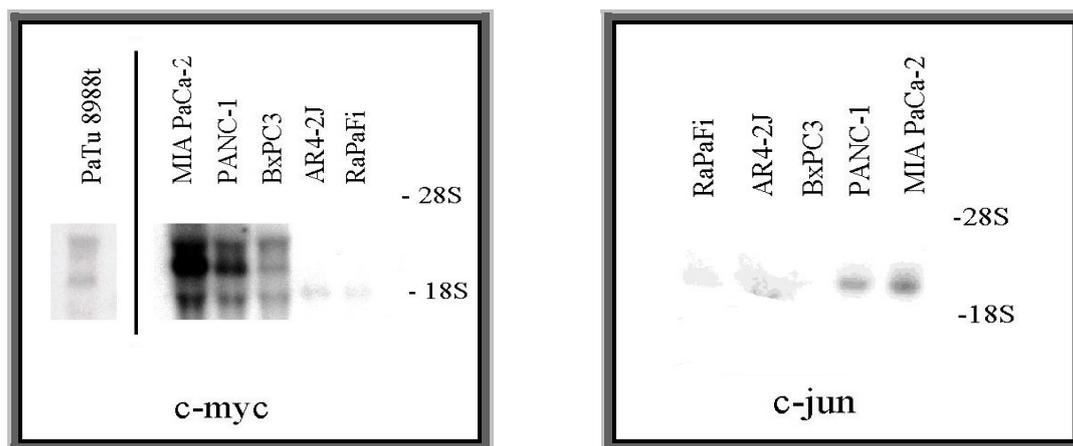


Abbildung 10: Die schwache Expression von c-myc durch die Zelllinien AR4-2J und die Rattenpankreasfibroblasten ist nach 7 Tagen Exposition kaum sichtbar, während sich bei den Pankreaskarzinomzelllinien bereits eine deutliche Bande abzeichnet. Auch die Hybridisierung mit c-jun (Maus-cDNA) ergibt Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien.

C-fos wird von der Rattenpankreaskarzinomzelllinie AR4-2J und den Rattenpankreasfibroblasten stärker exprimiert als von den humanen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC3, MIA PaCa-2, PaTu 8988s und PANC-1, bei denen die Bande kaum sichtbar ist (Abbildung 11).

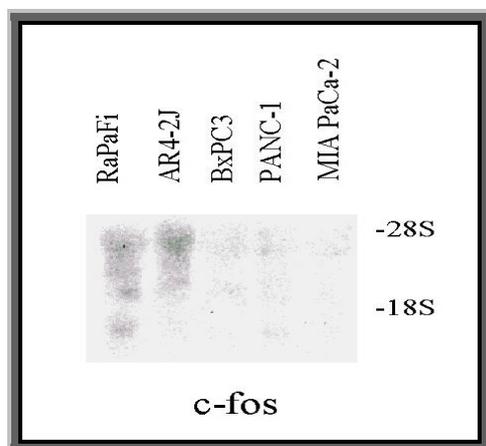


Abbildung 11: Analyse der Expression von c-fos bei verschiedenen Zelllinien.

### III.II.V Phosphoinositol-3-Kinasen

Die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) ist ein Enzym, das über Ras- und andere Proteine aktiviert wird und über die Phosphorylierung von IP3 eine wichtige Rolle in der Signalübermittlung spielt. Die PI3K besteht aus zwei Untereinheiten: P85, die eine regulatorische Rolle spielt und mit  $\beta$ -Catenin interagiert und p110, die die katalytische Antwort bewirkt.

Die stärkste Expression von p85 $\alpha$  zeigen PaTu 8988t, PaTu 8988s und AsPC1, jedoch weisen auch PANC-1, MIA PaCa-2, BxPC3 und NIH 3T3 ein deutliches Signal auf (Abbildung 12).

P110 $\alpha$  wird dagegen in MIA PaCa-2 und PANC-1 etwas stärker als in BxPC3 und PaTu 8988t exprimiert. In AR4-2J, AsPC1 und PaTu 8988s ist P110 $\alpha$  nur sehr schwach, in den Fibroblasten nicht nachweisbar (ohne Abbildung).

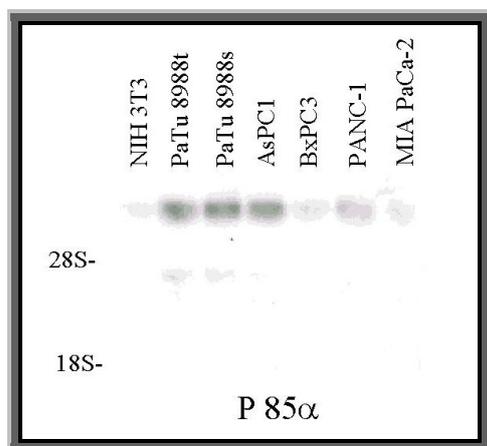


Abbildung 12: Hybridisierung der Northern Blots verschiedener Zelllinien mit p 85 $\alpha$ .

### III.II.VI Kollagene der Typen I und III

Der große Anteil extrazellulärer Matrix, der in Pankreaskarzinomen beobachtet werden kann, wirft die Frage auf, welche Zellen den Ursprungsort der EZM darstellen. Kollagene stellen die Hauptbestandteile dieser Matrix dar. Kollagen Typ I und Kollagen Typ III werden stark von den Rattenpankreasfibroblasten exprimiert, bei Kollagen Typ I kann auch bei den Karzinomzelllinien AR4-2J, BxPC3, PANC-1 und MIA PaCa-2 ein schwaches Signal nachgewiesen werden (Abbildung 13).

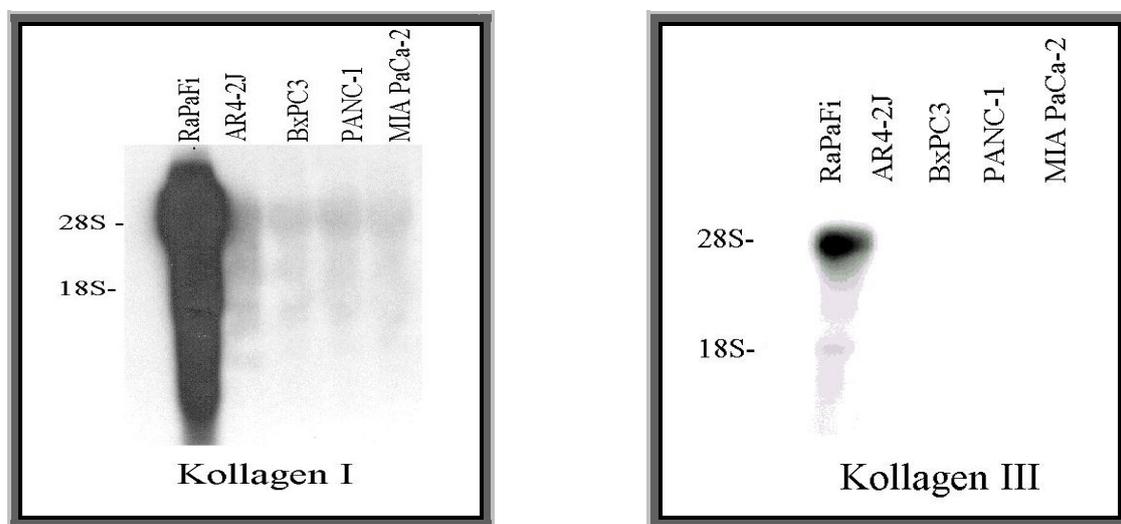


Abbildung 13: Hybridisierung von Northern Blots von Rattenpankreasfibroblasten und verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien zur Veranschaulichung der Expression der extrazellulären-Matrix-Proteine Kollagen I und III.

Zusammenfassend werden in Tabelle 2 die einzelnen Zelllinien in Bezug auf die Stärke ihrer Expression der analysierten mRNAs dargestellt. Die angegebenen Zahlen stellen keine absoluten Werte dar, sondern ergeben sich aus densitometrisch bestimmten Dichteunterschieden der Expressionen der einzelnen Zelllinien. Die Werte wurden anhand der 18S-Hybridisierung normalisiert um Unterschiede in der Menge der RNA auszugleichen. Nach der Stärke des Bandensignals wurden dann die Werte in sechs Kategorien (eins bis sechs) eingeteilt (siehe unten).

Tabelle 2: Vergleich der Expressionsunterschiede bestimmter mRNAs verschiedener Zelllinien. Die Tabelle 2 zeigt in der linken vertikalen Spalte die Hybridisierungssonden, in der ersten horizontalen Zeile die einzelnen Zelllinien.

	MIA PaCa-2	PANC-1	BxPC3	AR4-2J	AsPC1	PaTu 8988s	PaTu 8988t	NIH 3T3	RaPaFi
<b>E-Cadherin</b>	-	-	5	-	4	5	-	-	-
<b>Catenin <math>\alpha</math></b>	3	3	2	2	2	2	4	3	2
<b>Catenin <math>\beta</math></b>	4	4	4	3	4	4	6	3	2
<b>Catenin <math>\gamma</math></b>	2	5	5	-	5	4	3	-	-

	MIA PaCa-2	PANC-1	BxPC3	AR4-2J	AsPC1	PaTu 8988s	PaTu 8988t	NIH 3T3	RaPaFi
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	4	4	4	-	xxx	xxx	4	xxx	1
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	-	1	-	-	3	-	3	-	-
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b>	2	2	2	1	1	-	1	5	5
<b>TGF-<math>\beta</math>-RI</b>	4	5	3	1	xxx	xxx	xxx	xxx	1
<b>TGF-<math>\beta</math>-RII</b>	1	6	4	-	xxx	xxx	xxx	xxx	2
<b>BMP-2</b>	1	2	2	xxx	1	1	1	1	xxx
<b>BMP-4</b>	3	3	2	3	4	3	4	2	2
<b>BMP-7</b>	4	4	2	xxx	4	3	3	-	xxx
<b>Activin <math>\beta</math>B</b>	1	1	1	1	xxx	xxx	xxx	xxx	-
<b>Activin <math>\beta</math>C</b>	-	-	-	-	-	xxx	xxx	xxx	-

	MIA PaCa-2	PANC-1	BxPC3	AR4-2J	AsPC1	PaTu 8988s	PaTu 8988t	NIH 3T3	RaPaFi
<b>IGF-1</b>	-	2	-	xxx	4	-	3	-	xxx
<b>IGF-2</b>	1	1	1	5	xxx	xxx	xxx	xxx	1
<b>FGF-2</b>	4	4	3	-	xxx	xxx	xxx	xxx	-
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	2	3	3	2	xxx	2	2	xxx	2
<b>EGF</b>	-	-	-	xxx	xxx	-	-	xxx	xxx
<b>EGFR</b>	2	4	4	xxx	5	2	4	-	xxx
<b>c-met</b>	-	-	2	3	3	1	1	4	-
<b>HGF</b>	-	-	-	xxx	-	-	-	4	1

	MIA PaCa-2	PANC-1	BxPC3	AR4-2J	AsPC1	PaTu 8988s	PaTu 8988t	NIH 3T3	RaPaFi
<b>c-fos</b>	2	2	2	3	xxx	xxx	xxx	xxx	3
<b>c-jun</b>	4	4	2	2	xxx	xxx	xxx	xxx	2
<b>c-myc</b>	5	4	3	2	xxx	xxx	3	2	2

Erläuterungen: 6 = extrem starke Bande  
 5 = sehr starke Bande  
 4 = starke Bande  
 3 = mittelstarke Bande  
 2 = schwache Bande  
 1 = kaum erkennbare Bande  
 - = keine erkennbare Bande  
 xxx = (noch) nicht untersucht

### **III.III Stimulation bzw. Inhibition einzelner Zelllinien**

#### **III.III.I Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 oder Inhibition mit anti-TGF- $\beta$ - Rezeptor II-Antikörpern**

Nach Ermittlung der optimalen Stimulationsdauer wurde den Zelllinien MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3, PaTu 8988t bei Zellkonfluenz zusammen mit einem Medienwechsel TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 10 ng/ml für 18 (PaTu 8988t) oder 24 Stunden (MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3) zugegeben und anschließend sofort die RNA extrahiert.

Der blockierende Antikörper gegen den TGF- $\beta$ -R II wurde über 24 Stunden in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ml bei MIA PaCa-2, PANC-1 und BxPC3 zugegeben.

In einer Zeitreihe wurde die Zelllinie PANC-1 in Wachstumsmedium mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) über 5, 15 oder 28 Stunden behandelt, als Vergleich diente eine in Wachstumsmedium alleine gezogene Kontrolle.

Die Stimulation der Zelllinie PANC-1 mit TGF- $\beta$ 1 zeigt nach 5 Stunden eine Steigerung der mRNA-Menge von TIEG, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ -R I und c-fos. Nach 28 Stunden kann im Vergleich mit dem 5- und 15-Stunden-Wert eine weitere Steigerung der Expression bei TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3, TIEG und TGF- $\beta$ -R I beobachtet werden, bei TGF- $\beta$ 2 und c-fos dagegen schon eine Verminderung (Abbildung 14). Auf die Expression von BMP-2 läßt sich kein Effekt nachweisen (TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 und TGF- $\beta$ -R I ohne Abbildungen).

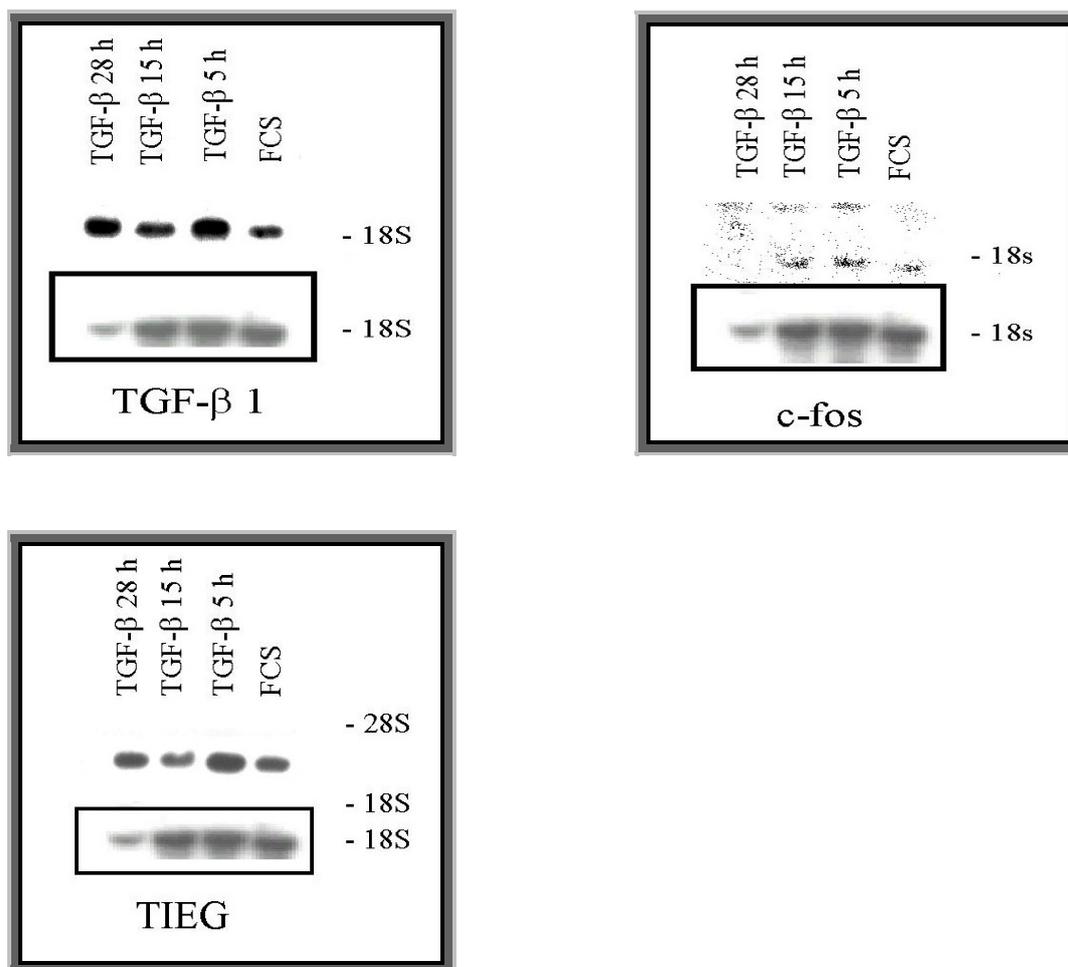


Abbildung 14: Stimulation der Zelllinie PANC-1 mit TGF- $\beta$  über verschiedene Zeiträume (5, 15 und 28 Stunden) und Hybridisierung mit TGF- $\beta$ 1-, c-fos- und TIEG-spezifischen Oligonukleotiden. Als Beladungskontrolle ist die 18S-Hybridisierung des gleichen Northern Blots in dem gesonderten Kasten zu sehen.

Bei MIA PaCa-2 lassen sich in diesem Versuch weder durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 noch durch die Gabe von neutralisierenden anti-TGF- $\beta$ -Rezeptor II-Antikörpern Veränderungen der mRNA-Expression der Gene von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 oder TGF- $\beta$ -R I bzw. TGF- $\beta$ -R II nachweisen. Auch bei PANC-1 sind keine Effekte durch die Inkubation mit neutralisierenden TGF- $\beta$ -Rezeptor II-Antikörpern bezüglich der Expressionen oben genannter Gene nachweisbar. Des weiteren können bei beiden Zelllinien weder durch Stimulation mit TGF- $\beta$  noch durch Inhibition mit den anti-TGF- $\beta$ -Rezeptor II-Antikörpern signifikante Expressionsänderungen von Wachstumsfaktoren wie Activin  $\beta$ C, FGF-2, IGF-1 und IGF-2, HGF und seines Rezeptors c-met beobachtet werden. Ebenso wenig sind Änderungen bei den Zell-Zell-Adhäsionskomponenten wie

E-Cadherin oder den Cateninen oder bei den Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun oder c-myc (ohne Abbildungen) zu beobachten.

Bei BxPC3 wird durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine deutliche Steigerung der Expression von TGF- $\beta$ 3 bewirkt, durch den neutralisierenden anti-TGF- $\beta$ -RII-Antikörper eine Verminderung der TGF- $\beta$ 3-Expression (Abbildung 15). Auf die Expressionen von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ -R I oder TGF- $\beta$ -R II läßt sich kein Einfluß nachweisen. Auch c-fos wird nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 verstärkt exprimiert (Abbildung 15). Durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 kann die FGF-2-Expression nicht signifikant gesteigert, jedoch durch den anti-TGF- $\beta$ -R II-Antikörper die FGF-2-Expression um ca. 25 % vermindert werden (Abbildung 15). Keinen Einfluß übt TGF- $\beta$  in BxPC3-Zellen auf die Expression von BMP-2, Activin  $\beta$ C oder die Komponenten des E-Cadherin-Catenin-Systems aus.

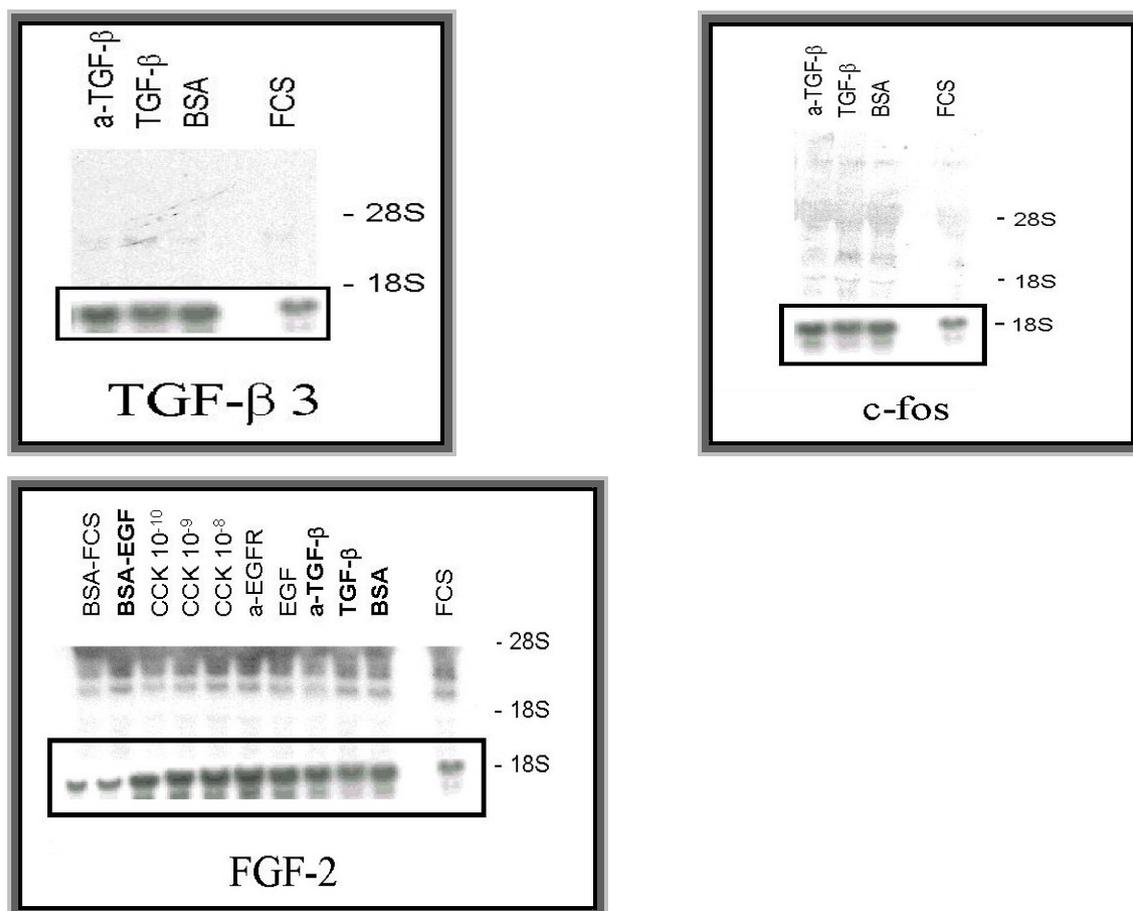


Abbildung 15: Stimulation von BxPC3 mit TGF- $\beta$  und Hybridisierung mit TGF- $\beta$ 3, c-fos und FGF-2. Zur Veranschaulichung wurden die durch Wachstumsfaktoren, neutralisierende anti-TGF- $\beta$ -Rezeptor-Antikörper oder Nährmedium ohne FCS (BSA-Medium) bewirkten Veränderungen durch Fettdruck hervorgehoben (siehe III.III.II).

$\alpha$ -TGF- $\beta$  steht für einen monoklonalen Antikörper gegen TGF- $\beta$ . CCK wurde in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-8}$  bis  $10^{-10}$  M) zugegeben.

Die 18S-Hybridisierung des jeweiligen Northern Blots zur Normalisierung der Intensitäten ist gesondert in einem Kästchen unterhalb der beschriebenen Hybridisierung sichtbar.

Die jeweils untersuchte Zelllinie wurde in Nährmedium (mit oder ohne 10 % FCS) mit verschiedenen Stoffen (Wachstumsfaktoren oder Hormonen) stimuliert oder mit neutralisierenden Antikörpern die Aktivierung eines Rezeptors inhibiert. Die RNA's wurden dann auf einem gemeinsamen Northern Blot verarbeitet. Die relevant veränderten Expressionen wurden im Gegensatz zu den unveränderten Expressionen durch Fettdruck gekennzeichnet.

### ***III.III.II Stimulation mit EGF oder Inhibition mit anti-EGFR-Antikörpern***

Um den Einfluß des Wachstumsfaktors EGF auf die Genexpression von Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde EGF den Zelllinien MIA PaCa-2, PANC-1 und BxPC3 in einer Konzentration von 20 ng/ml Kulturmedium zugegeben und die Zelllinien 24 Stunden mit diesem Wachstumsfaktor stimuliert. Um den Einfluß von in FCS enthaltenen Faktoren auszuschließen, wurden die Zellen in einem weiteren Versuch zuerst in 1%igem BSA-Medium über 49 Stunden synchronisiert und danach in diesem Medium für 4 Stunden mit EGF stimuliert (siehe Material und Methodik). Anderen Zellen dieser drei Zelllinien wurde ein anti-EGFR-Antikörper (67 µg/ml), der eine Aktivierung des Rezeptors durch Liganden unterband, für 24 Stunden in Medium mit 10 % FCS zugegeben. PaTu 8988t wurde 24 Stunden in BSA inkubiert und dann entweder mit EGF (20 ng/ml) alleine oder mit EGF in Kombination mit IGF-1 (je 20 ng/ml) 18 Stunden stimuliert.

Nach Stimulierung von synchronisierten MIA PaCa-2 mit EGF kann eine Verstärkung der Expressionen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, FGF-2 und IGF-2 beobachtet werden (Abbildung 16). Auch bei der Zelllinie BxPC3 kann durch Zugabe von EGF zu ruhenden Zellen eine stärkere Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, E-Cadherin, FGF-2, BMP-2, TGF- $\beta$ 1 und der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II nachgewiesen werden (Abbildungen 15 und 17 – BMP-2 ohne Abbildung). In Kulturmedium mit 10 % FCS zeigen weder EGF noch neutralisierende anti-EGFR-Antikörper einen im Northern Blot nachweisbaren Einfluß auf die Expression der TGF- $\beta$ -Superfamilie (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, Activin  $\beta$ C, BMP-2) bzw. der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II oder auf die untersuchten Zelladhäsionsmoleküle (E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Catenin). Ebenso bleiben die Stimulationsversuche mit EGF in Kulturmedium mit 10 % FCS auf die Expression weiterer Wachstumsfaktoren wie FGF-2, IGF-1 und IGF-2, HGF und seines Rezeptors c-met oder der Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun und c-myc ohne Veränderung der Genexpressionen - mit einer Ausnahme: Bei PANC-1 wird durch EGF eine Verringerung der  $\gamma$ -Catenin-mRNA-Konzentration festgestellt (Abbildung 18). Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien MIA PaCa-2

und BxPC3 bewirkt die Zugabe von EGF zu synchronisierten PANC-1-Zellen keine Heraufregulierung der Expressionen der Catenine, sondern sogar eine Herunterregulierung von  $\gamma$ -Catenin (Abbildung 18). Die Genexpression von FGF-2, die im ruhenden Zustand vermindert wird, kann durch Zugabe von EGF (bzw. FCS – siehe III.III.IV) wieder stimuliert werden (Abbildung 18).

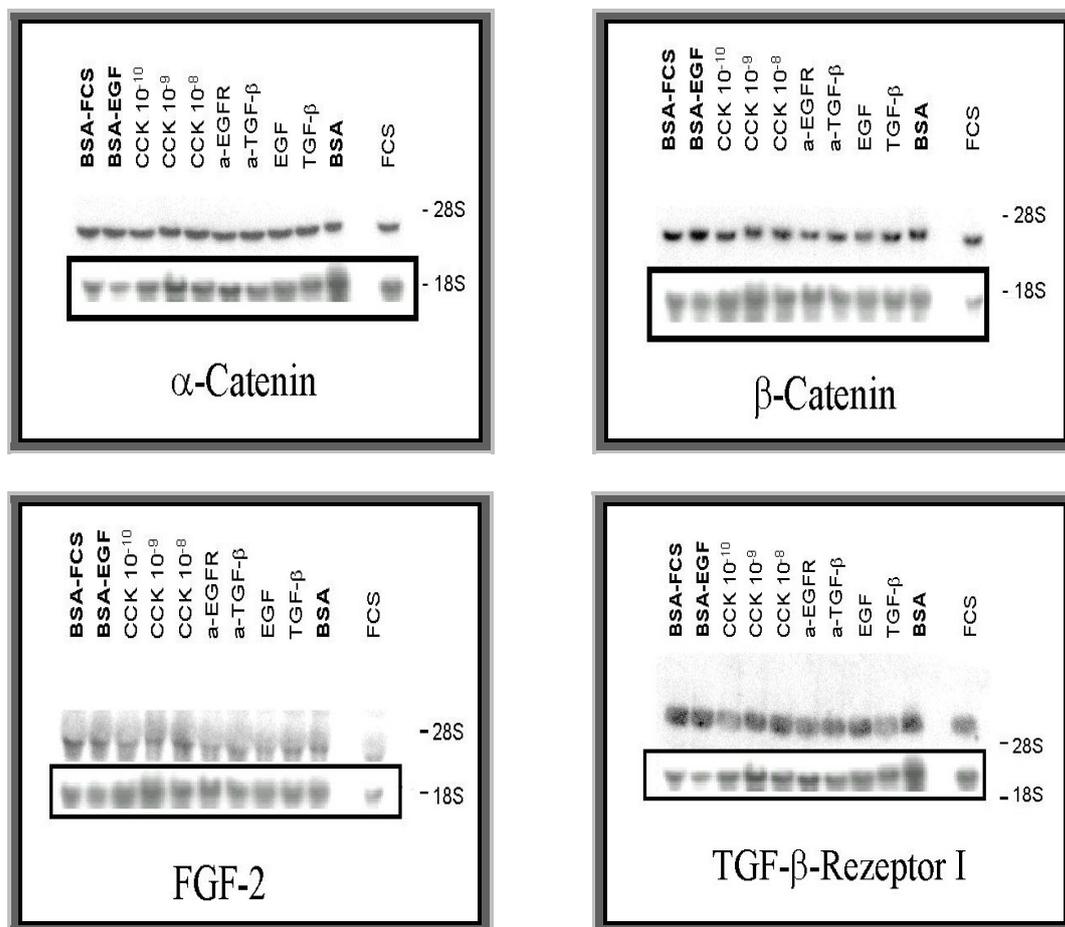


Abbildung 16: Hybridisierungen der Northern Blots der Zelllinie MIA PaCa-2 mit  $\alpha$ -Catenin-,  $\beta$ -Catenin-, FGF-2- und TGF- $\beta$ -Rezeptor I-spezifischen Sonden. Die Zelllinie wurde in Medium mit oder ohne 10 % FCS kultiviert. Ebenso wurde der Effekt der Zugabe von EGF bzw. des neutralisierenden anti-EGFR-Antikörpers zu diesen Nährmedien auf die oben angegebenen Expressionen dargestellt. a-TGF- $\beta$  steht für einen monoklonalen Antikörper gegen TGF- $\beta$ , a-EGFR für einen Antikörper, der den EGFR blockiert. Bei CCK wurden verschiedene Konzentrationen zugegeben ( $10^{-8}$  bis  $10^{-10}$  M).

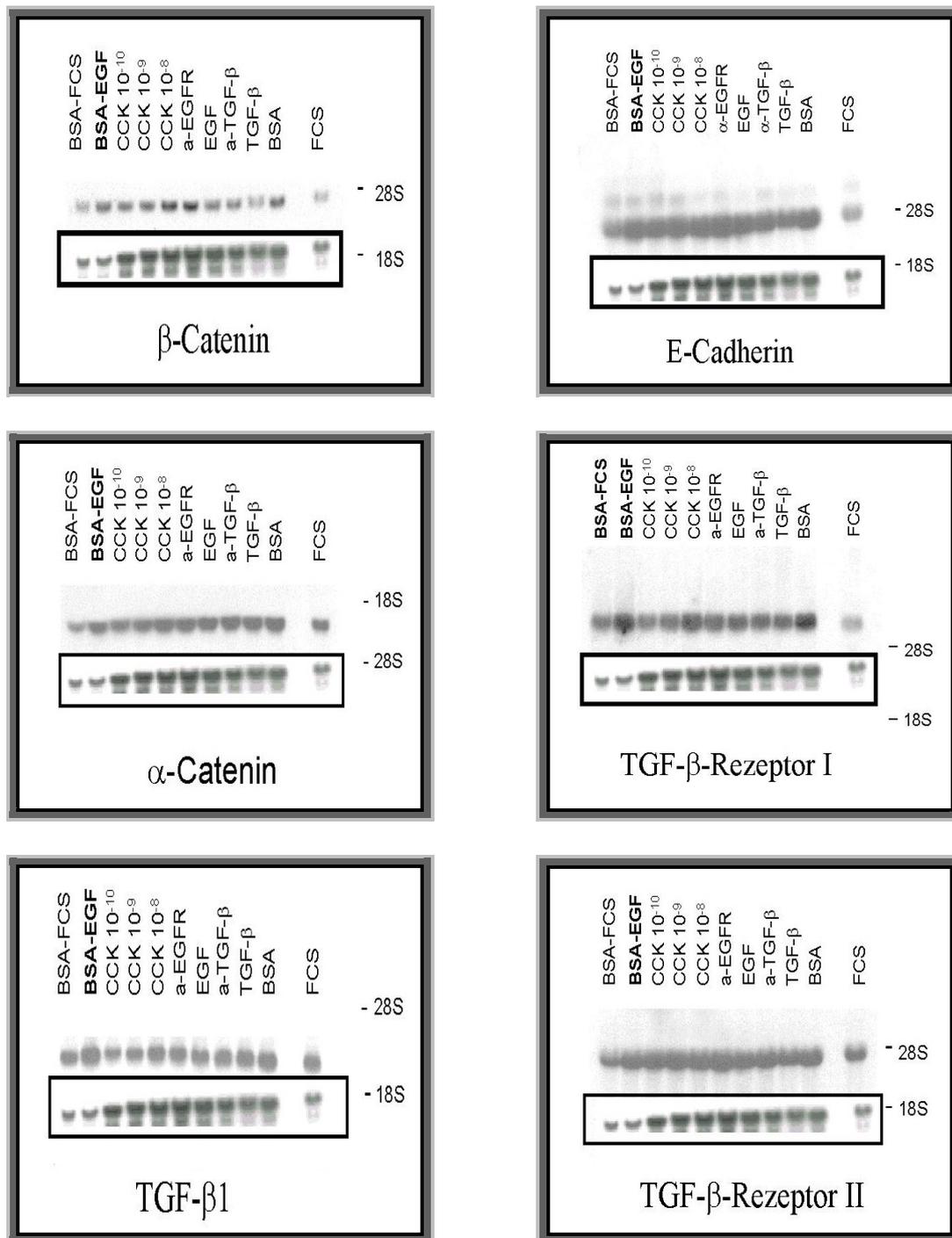


Abbildung 17: Bestimmung der mRNA-Konzentrationen von E-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin, TGF- $\beta$ 1 und den TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II bei der Zelllinie BxPc3, die in Medium ohne oder mit 10 % FCS kultiviert wurde. Aufzeigen der Auswirkung auf die Veränderung der Genexpression durch Zugabe von EGF bzw. des neutralisierenden anti-EGFR-Antikörpers.

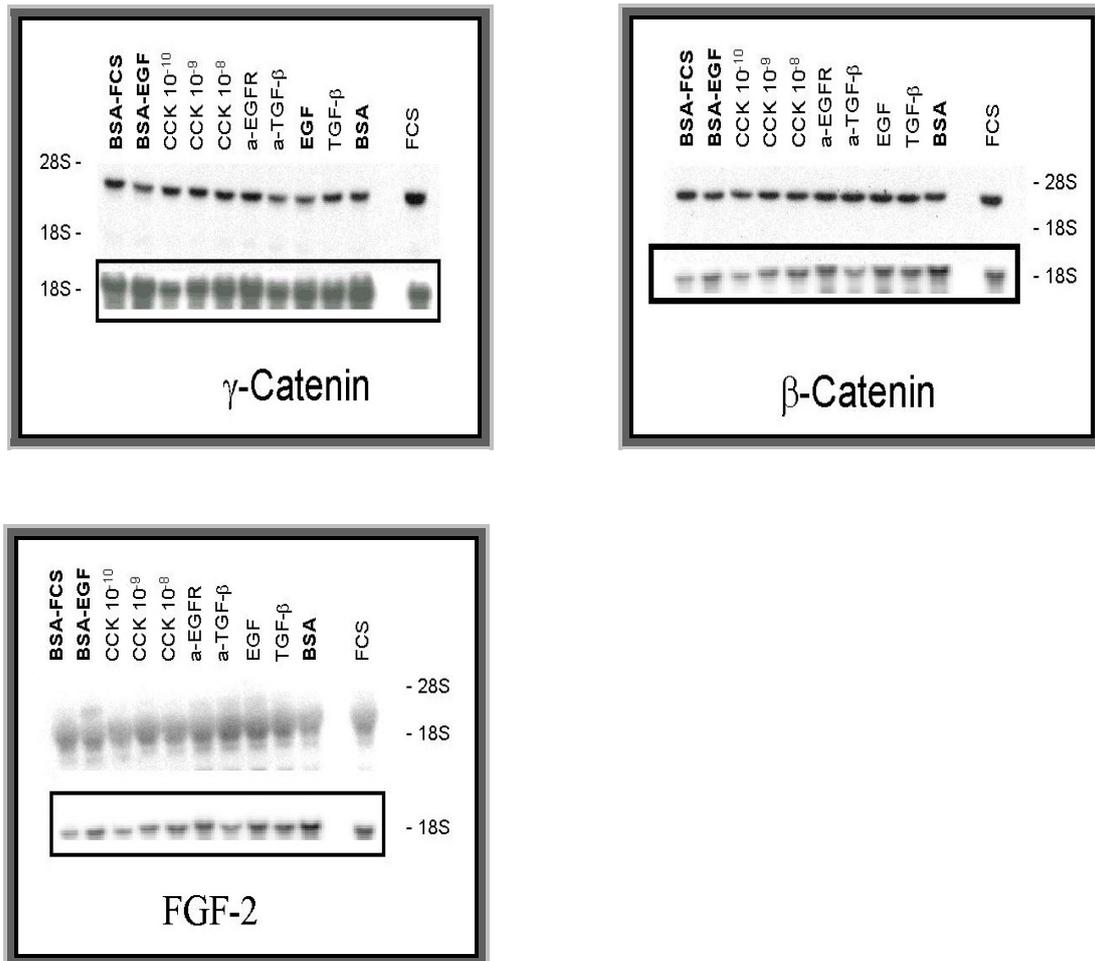


Abbildung 18: Hybridisierung der Northern Blots der Zelllinie PANC-1 mit  $\gamma$ -Catenin-,  $\beta$ -Catenin- und FGF-2-Sonden. Es zeigt sich eine Herunterregulierung von  $\gamma$ -Catenin durch EGF und eine Heraufregulierung durch FGF-2.

Bei PaTu 8988t wird nach Kultivierung der Zellen in BSA durch Inkubation mit EGF die  $\beta$ -Catenin-Expression deutlich herunterreguliert, durch EGF in Kombination mit IGF-1 kann dieser Effekt wieder abgeschwächt werden (Abbildung 19). Keinen Einfluß haben EGF bzw. EGF/IGF-1 auf die Expressionen von c-fos und TGF- $\beta$ 1 (ohne Abbildungen).

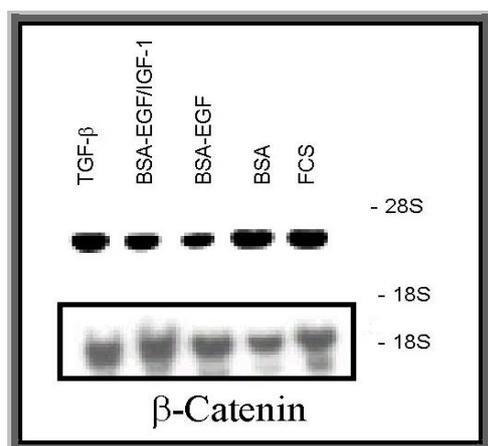


Abbildung 19: Kultivierung synchronisierter Zellen der Zelllinie PaTu 8988t in Nährmedium mit oder ohne FCS und Stimulation mit EGF alleine (BSA-EGF) oder EGF in Kombination mit IGF-1 (BSA-EGF/IGF-1) und Hybridisierung mit einer  $\beta$ -Catenin-Sonde.

### III.III.III Stimulation mit Cholezystokinin (CCK)

Cholezystokinin, ein Hormon, das die Enzymsekretion des Pankreas reguliert, wurde den Zelllinien MIA PaCa-2, PANC-1 und BxPC3 in einer Konzentration von  $10^{-8}$  bis  $10^{-10}$  molar in 10 % FCS-enthaltendem Medium zugegeben. Die Stimulationszeit betrug 24 Stunden.

Es zeigt sich bei keiner Zelllinie (MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC3) ein Einfluß von CCK auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 bis TGF- $\beta$ 3, der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II, BMP-2, Activin  $\beta$ C oder anderer Wachstumsfaktoren wie FGF-2, IGF-1, IGF-2 und HGF bzw. seines Rezeptors c-met. Ebenso bleibt die Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin und der Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun oder c-myc unbeeinflusst (ohne Abbildungen).

## IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Gene zu analysieren, die für Komponenten des E-Cadherin-vermittelten Adhäsionskomplexes kodieren. Darüber hinaus sollte mittels verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden, welche Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren exprimiert werden und welche Veränderungen die Stimulationen mit Wachstumsfaktoren auf die Genexpression bewirken.

Die mit Hilfe von kultivierten Karzinomzellen gewonnenen Daten können nur Hinweise geben auf die Vorgänge, die sich in den Organen abspielen. Man kann davon ausgehen, daß es sich bei der Regulation der Organfunktion um ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedenster Faktoren handelt. Die Wirkungen dieses Netzwerkes verschiedener Wachstumsfaktoren kann sich von den Effekten der einzelnen Faktoren signifikant unterscheiden. Bevor jedoch diese sehr vielschichtigen Interaktionen verstanden werden können, muß die Wirkung der Einzelkomponenten untersucht werden. Mit Hilfe der Hybridisierung von Northern Blots wurde die Expression ausgesuchter Gene in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Den Schwerpunkt bildeten die Komponenten des E-Cadherin-Zelladhäsionskomplexes und die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren beta (TGF- $\beta$ ). Die Expressionen der Gene wurden aufgrund der Intensität der radioaktiven Signale der Hybridisierungen in sechs Stärkegrade (nicht nachweisbare bis sehr starke Expression) eingeteilt und die Daten der Zelllinien miteinander verglichen. In dem zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien mit Wachstumsfaktoren oder Hormonen stimuliert und die Auswirkungen auf die Expression der Gene des E-Cadherin-Adhäsionskomplexes untersucht.

Zu berücksichtigen ist, daß die angegebenen Expressionsstärken keine absoluten Zahlen darstellen, sondern sich aus dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien ergeben. Bei der Interpretation der Daten muß weiter berücksichtigt werden, daß die RNA-Menge alleine nicht als Anhalt für die Proteinmenge dienen kann, da neben der Präsenz der einzelnen mRNA's auch eine Regelung der Translationseffizienz und/oder eine Regelung der Proteinstabilität sowie -funktionalität durch Phosphorylierungen, Acetylierungen etc. eine Diskrepanz

zwischen Expressions- und Proteinebene bewirken können. Ebenso können keine Aussagen über die Funktionsfähigkeit der durch die untersuchten mRNAs kodierten Proteine gemacht werden. Das Vorhandensein von Punktmutationen bzw. kleiner Deletionen kann in der Northern Blot-Hybridisierung nicht entdeckt werden. Zu bedenken ist weiterhin, daß in einigen Fällen heterologe Sonden eingesetzt wurden, die zwar auf die Spezifität für die entsprechende menschliche mRNA kontrolliert wurden, jedoch im Vergleich zu einer homologen Sonde weniger sensitiv sein können.

#### ***IV.1 E-Cadherin-Expression in Pankreaskarzinomgewebe***

Karzinomzellen wachsen im Gegensatz zu gesunden Zellen nicht in einem selbstlimitierenden Zellverband, sondern haben Mechanismen entwickelt um die natürlichen Wachstumsbeschränkungen zu umgehen. Diese umfassen z. B. eine autokrine Produktion von stimulierenden Wachstumsfaktoren oder eine Herunterregulation von Zelladhäsionsproteinen. Auch bei Pankreaskarzinomen konnte in immunhistochemischen Arbeiten von Pignatelli et al. 1994 (112) und Weinl et al. 1996 (139) auf Proteinebene eine verminderte Expression von E-Cadherin bei Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden. Unsere exemplarischen Untersuchungen an zwei Pankreaskarzinomgeweben bezüglich der Genexpression von E-Cadherin und Cateninen weisen darauf hin, daß diese Veränderungen nicht nur E-Cadherin sondern auch die Catenine betreffen und bereits auf mRNA-Ebene verursacht werden. Im Vergleich zu den untersuchten Kontrollgeweben wurde in beiden Pankreaskarzinomgeweben E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin vermindert,  $\gamma$ -Catenin dagegen verstärkt exprimiert (Abbildung 1). Diese Daten dienen zusammen mit den Ergebnissen der bisher erschienenen Literatur als Ausgangspunkt der Fragestellung, ob bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien das E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionssystem bereits auf Genexpressions-Ebene verändert ist. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad bzw. Metastasierungspotential der Zelllinien und der Expression der Cadherin/Catenin-Gene ergab.

#### ***IV.II Expression von E-Cadherin und Cateninen***

Für die Adhäsion von Zellen aneinander sind nach bisherigem Wissen die Komponenten der Zonulae adhaerentes E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin von größter Wichtigkeit. Obwohl der Verlust der Zelladhäsion alleine nicht zu Invasivität oder Metastasierung führt (49), scheint er in bereits entarteten Zellen einer der dafür entscheidenden Schritte zu sein. Eine Dissoziation der E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexe kann eine Loslösung einzelner Zellen aus dem Zellverband bewirken und damit bei der Pathogenese der Metastasierung und der Invasivität von Malignomen eine Rolle spielen (129,140).

Bei Pankreaskarzinomen konnte durch eine Herunterregulation von E-Cadherin durch Behandlung mit E-Cadherin-Antisense Oligonukleotiden eine verstärkte Migration durch die Basalmembran (129), ein erhöhtes Metastasierungspotential (19) und eine vermehrte peritoneale Aussaat (40) nachgewiesen werden. Eine inverse Korrelation von E-Cadherin mit dem Differenzierungsgrad, der Gefäßinvasion und der Metastasierung wurde nicht nur bei Pankreaskarzinomen beschrieben, sondern konnte auch bei anderen Karzinomen wie z. B. hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen werden (36). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, daß E-Cadherin von den Zelllinien BxPC3, AsPC1 und PaTu 8988s exprimiert wird, nicht jedoch von MIA PaCa-2, PANC-1, PaTu 8988t und der Rattenpankreaskarzinomzelllinie AR4-2J. In Kenntnis des Malignitätsgrades der untersuchten Zelllinien bedeutet dies, daß sich aus der alleinigen Betrachtung der nachweisbaren Expression des E-Cadheringens keine eindeutige Korrelation bezüglich einer Verminderung der Invasivität bzw. einem geringeren Metastasierungsverhalten der verschiedenen Zelllinien im Nacktmausmodell ableiten läßt. Während ein E-Cadherin-Verlust für eine hohe Invasivität der Zelllinien spricht, ist der Umkehrschluß nur bedingt zulässig: Das Vorhandensein von E-Cadherin ist nicht ausreichend als Hinweis für eine geringere Invasivität, ein geringeres Metastasierungsverhalten oder eine gute Prognose. Dies läßt sich mit Hilfe der Zelllinien BxPC3, AsPC1 und PaTu 8988s belegen, die trotz eines E-Cadherin-Nachweises stark metastasieren.

Weinel und Kollegen vermuteten bei AsPC1 einen defekten E-Cadherin-Catenin-Komplex, da die Zelllinie trotz Nachweises von E-Cadherin eine hohe Zellmotilität aufwies und vermuteten die Ursache in dem Fehlen von einem oder mehreren Cateninen (139). Unsere Experimente belegen, daß diese Defekte nicht auf der Ebene der Genexpression zu suchen sind, da in AsPC1 die mRNAs aller Catenine nachweisbar waren.

Im Gegensatz zu der differentiellen Expression von E-Cadherin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Catenine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin von allen untersuchten menschlichen Pankreaskarzinomzelllinien (BxPC3, AsPC1, PaTu 8988s, MIA PaCa-2, PANC-1 und PaTu 8988t) exprimiert werden, wenn auch in unterschiedlicher Intensität. Dies bedeutet zum einen, daß diese Zelllinien durch die korrekte Größe der im Northern Blot detektierten mRNAs keine größeren Deletionen in Genen des E-Cadherin/Catenin-System besitzen, zum anderen, daß sich aus dem Nachweis bzw. Fehlen der Expression von E-Cadherin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin keine sichere prognostische Aussage bezüglich der Invasivität und dem Metastasierungspotential von Pankreaskarzinomzelllinien ableiten läßt. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, daß die mRNA-Menge von E-Cadherin bzw. Cateninen nicht automatisch mit der Protein-Menge gleichzusetzen ist. Im Fall von  $\alpha$ -Catenin (bei AsPC1, MIA PaCa-2 und PaTu 8988t) und  $\gamma$ -Catenin (bei PANC-1, MIA PaCa-2 und PaTu 8988t) ist bei hoher mRNA-Menge keine bzw. nur eine geringe Proteinkonzentration nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind bei E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin mRNA- und Proteinkonzentrationen weitgehend proportional. Vor allem bei den Zelllinien, bei denen keine E-Cadherin-mRNA nachweisbar ist (MIA PaCa-2, PaTu 8988t), sind die Proteinkonzentrationen von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Catenin verringert (Dissertation S. Wiest, Universität Ulm). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von Jahwari durch immunhistochemische Untersuchungen an Magenkarzinomen (55). Seine und unsere Daten belegen, daß bestimmte Catenine bei einem Verlust von E-Cadherin gegenüber enzymatischem Abbau instabiler werden.

Neben der Kontrolle der Genexpression, der Translation und der Proteinkonzentration, wird auch die Stabilität und Zusammensetzung des Adhäsionskomplexes reguliert. Die posttranslationellen Modifikationen der

Proteine des Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes wie z. B. der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proteine bestimmen ganz entscheidend die Stabilität des Komplexes. Durch eine verstärkte Phosphorylierung von  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin dissoziiert eine signifikante Menge an  $\alpha$ -Catenin vom Cadherin-Catenin-Komplex und verursacht so ein Abfallen vom Aktin-Zytoskelett (106). Für diese Phosphorylierungen werden neben zytoplasmatischen Kinasen (wie die der Src-Familie) die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor verantwortlich gemacht (49,56 und siehe unten).

In vielen Kolonkarzinomen wird  $\beta$ -Catenin durch eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC vermindert abgebaut. Die dadurch entstehende Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-Konzentration wird für die resultierende Aktivierung von transformierenden Genen und damit für die Tumorprogression verantwortlich gemacht (54). Dies liegt daran, daß vor allem  $\beta$ -Catenin, aber auch  $\gamma$ -Catenin, wichtige Bestandteile von Signalwegen sind. So ist  $\beta$ -Catenin ein wichtiger Effektor im Wnt-Signalweg: Wnt stabilisiert unter anderem die Halbwertszeit des zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenins, welches nach Translokation in den Zellkern die  $\beta$ -Catenin/Lef-1/Tcf-abhängige Genexpression aktiviert (99,118). Zu den Zielgenen dieser Regulatoren gehören zum Beispiel c-jun, c-myc oder Cyclin D1, die wiederum zur Tumorprogression beitragen können (85,135). Bei Pankreaskarzinomen konnte bisher nur in einer Publikation eine Korrelation der Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und der Cyclin-D1-Überexpression (einem Zielgen von  $\beta$ -Catenin/Tcf) mit der Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden (115).

Es werden immer mehr Faktoren bekannt, die die Komponenten des Zell-Zell-Adhäsionssystems beeinflussen: So bewirkt z. B. bereits eine mäßige Überexpression der ILK (Integrin-gebundenen Kinase) einen invasiven Phänotyp, verbunden mit einer Herunterregulation der E-Cadherin-Expression und einer  $\beta$ -Catenin-Translokation in den Zellkern mit Aktivierung des Lef-1/Tcf-Signalweges (99,100). Auch Wachstumsfaktoren beeinflussen entscheidend die Zell-Zell Adhäsion: So erreicht IGF-1 durch eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin eine Dissoziation des E-Cadherin-Catenin-Komplexes (113). Nach IGF-2-Stimulation konnte ebenfalls eine Translokation des  $\beta$ -Catenin-Proteins von der

Plasmamembran in den Kern, die Transkription von  $\beta$ -Catenin/Tcf-3-Zielgenen und eine Degradierung von E-Cadherin beobachtet werden (96). Auch für TGF- $\beta$ 1 (44), FGF-1, FGF-2 (34) und EGF (53) sind Einflüsse auf Zelladhäsionskomponenten beschrieben worden.

Es wird deutlich, daß die Betrachtung der Expression der E-Cadherin- und Catenin-Gene, alleine durch die verschiedenen Aufgaben der einzelnen Komponenten und komplexen nachgeschalteten Veränderungen auf der Proteinebene, nur einen ersten Eindruck der Vielschichtigkeit der Regulation der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion geben kann.

In den durchgeführten Stimulationsversuchen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren konnte mit Ausnahme von EGF kein Einfluß auf die Genexpression der Komponenten des E-Cadherin-Adhäsionssystems nachgewiesen werden. EGF bewirkt unter anderem eine Steigerung der gerichteten Zellmigration (48). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Wirkung von Wachstumsfaktoren primär nicht durch die Modulation der Genexpression des E-Cadherin-Catenin-Systems stattfindet, sondern wahrscheinlich über posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen. Dies wiederum bedeutet, daß die Defekte, die in der Zelladhäsion von Karzinomzellen beobachtet werden können, nicht direkt in der E-Cadherin-Catenin-Expression liegen müssen, sondern auch durch veränderte Regulationsmechanismen des Zusammenhaltes des Komplexes verursacht werden können. Dabei dürfen Punkte wie die Dynamik des Aktinzytoskeletts und die Rolle anderer Mitglieder der Cateninfamilie, wie das regulatorisch wirkende p120<sup>ctn</sup> (98) oder die Interaktionen mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (68,80,144) nicht vergessen werden.

Die Kultivierung der verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien in Minimalmedium ohne Serum führte zu einer Verminderung der Expression einiger Catenine. Erst bei Aufhebung dieses Ruhezustandes durch Stimulation mit EGF oder FCS wird die Expression der Zelladhäsionsmoleküle wieder hochreguliert. Ob es sich dabei um eine spezifische Reaktion handelt oder bei ruhenden Zellen der gesamte Zellstoffwechsel und damit auch die

Zelladhäsionsmoleküle herunterreguliert werden, müssen weitere Arbeiten klären.

#### ***IV.III Expression der TGF- $\beta$ -Wachstumsfaktoren***

TGF- $\beta$  ist ein multifunktionelles Polypeptid, das bei der Regulation verschiedenster zellulärer Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Motilität eine Rolle spielt. Auch bei der Entstehung und Ausbreitung von Karzinomen sind die durch TGF- $\beta$  hervorgerufenen Effekte wesentlich. Die bei verschiedenen Karzinomen überexprimierten TGF- $\beta$ -Isoformen sind nicht nur wegen ihrer Fähigkeit zur epithelial-mesenchymalen Dedifferenzierung und ihrer direkten und indirekten Wirkung auf die Zelladhäsion interessant (siehe unten), sondern auch durch die Arretierung epithelialer Zellen in der nichtproliferativen G1-Phase. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien fehlt die durch TGF- $\beta$  vermittelte Wachstumsinhibition und es wurde bereits 1990 bei Endometriumkarzinomen (18), später auch bei Pankreaskarzinomen zum einen eine Resistenz gegenüber der Wachstumsinhibition durch TGF- $\beta$ , gleichzeitig jedoch eine erhöhte TGF- $\beta$ -Produktion festgestellt (51,101,133). Bei Pankreaskarzinomen ist eine Überexpression von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 und TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ II beschrieben worden (41,42). Mit Ausnahme der Zelllinie MIA PaCa-2, die eine Mutation im Gen des TGF- $\beta$ -Rezeptor II hat, können wir in Übereinstimmung mit der Literatur bei allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Expression von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 und der TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II nachweisen (10,41). Damit besitzen sowohl PANC-1 als auch BxPC3 beide für die Signalübertragung notwendigen Rezeptoren und exprimieren TGF- $\beta$ , so daß möglicherweise eine autokrine Stimulation vorliegt. Doch trotz Überexpression von TGF- $\beta$  reagieren die meisten Pankreaskarzinomzelllinien (die TGF- $\beta$ -sensible Zelllinie PANC-1 ist eine der Ausnahmen) in vitro auf TGF- $\beta$  nicht mit einer Verminderung der Proliferation (46,47). Besonders beim Pankreaskarzinom werden überdurchschnittlich häufig Defekte in der TGF- $\beta$ -Signalkaskade beschrieben. In ca. 55 % der Pankreaskarzinome konnte ein Defekt im Smad4

nachgewiesen werden. Auch bei den Pankreaskarzinomzelllinien sind verschiedene Störungen im TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg bekannt: So hat z. B. MIA PaCa-2 einen defekten TGF- $\beta$ -R II, während BxPC3 und AsPC1 homozygote Smad4-Deletionen aufweisen (50,133).

Oft und Mitarbeiter konnten in Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien fortgeschrittener epithelialer Tumore aufzeigen, daß ein gestörter TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg, zum Beispiel durch einen dominant negativen TGF- $\beta$ -R II oder einen neutralisierenden Antikörper gegen TGF- $\beta$ , die Tumorbildung blockieren oder stark verzögern, die Metastasierung unterdrücken und die Invasivität in vitro aufheben konnte (101).

Da die meisten Pankreaskarzinomzelllinien trotz gestörtem TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg eine vermehrte Expression von TGF- $\beta$  aufweisen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß die überexprimierten TGF- $\beta$ 's in den Karzinomzellen über einen anderen als den bekannten Smad-abhängigen Signaltransduktionsweg invasionsfördernd wirken (31,121). Dieses könnte über eine Smad4-unabhängige Inhibition der ERK-Aktivierung (47) oder durch Interaktionen mit anderen Signalwegen, wie z. B. dem Wnt-Signalweg (77,79) realisiert werden.

Anders als bei epithelialen Zellen bewirkt TGF- $\beta$  in mesenchymalen Zellen eine Proliferation und eine vermehrte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (59,87). Vieles weist darauf hin, daß sich Pankreaskarzinomzellen über die erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  eine für sie günstige Zellmatrix schaffen, die Migration, Invasivität und Metastasierung erleichtert (132): Die Fibroblasten werden durch TGF- $\beta$  zur Herstellung von Kollagen I und III stimuliert und die entstandene Matrix fördert wiederum über eine positive Rückkoppelung sowohl die Fibroblasten (13,59) als auch die Migration von Tumorzellen und damit Invasivität und Metastasierung. Für diese Hypothese spricht, daß gerade Pankreaskarzinome durch eine starke fibrotische Reaktion gekennzeichnet sind. Der Einfluß der Zellmatrix z. B. auf die Zelladhäsion wird durch Untersuchungen verdeutlicht, in denen auf Kollagen I oder Kollagen III kultivierte Pankreaskarzinomzelllinien eine Herunterregulation von E-Cadherin mit der Folge einer verminderten Zelladhäsion und einer verstärkten Migration zeigen (92).

Wie bereits in der Literatur beschrieben (86), konnte in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus gezeigt werden, daß auch menschliche Pankreaskarzinomzellen in der Lage sind, bestimmte EZM-Proteine *in vitro* zu synthetisieren und zu produzieren.

Bei Pankreaskarzinomen, die durch eine starke desmoplastische Reaktion gekennzeichnet sind, gibt es Hinweise darauf, daß wie bei Ito-Zellen in der Leber (3,21) ebenfalls eine Transdifferenzierung von Zellen stattfindet (15): Man findet im Pankreas sogenannte „*Stellate*“-Zellen (2), die EZM-Proteine synthetisieren und nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF-2 oder TGF- $\beta$  eine gesteigerte Kollagensynthese und vermehrt Marker myofibroblastenähnlicher Zellen (wie  $\alpha$ -Glattmuskel-Aktin) aufweisen (75,120). Verschiedene Arbeiten zeigen, daß TGF- $\beta$  auch in Pankreaskarzinomzelllinien eine reversible epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) bewirken kann (22,36,93). Diese EMT ist mit einer gesteigerten Tumorzellmigration, -invasivität und -verbreitung assoziiert und scheint über eine Kooperation mit der Ras-MEK-ERK-Signalkaskade zu erfolgen (36). Der Prozess beinhaltet eine Herunterregulation von E-Cadherin und eine veränderte  $\beta$ -Catenin-regulierte Genexpression (44,128). Dabei scheint es sich um einen indirekten Einfluß zu handeln, da eine Wirkung von TGF- $\beta$  auf die Genexpression von E-Cadherin und Cateninen in der vorliegenden Arbeit bei Pankreaskarzinomzelllinien nicht nachgewiesen werden konnte.

#### Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 bzw. Inhibition mit anti-TGF- $\beta$ -Rezeptor II-Antikörpern

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob TGF- $\beta$  in den untersuchten Zelllinien autokrin seine eigene Expression induzieren kann. Bisher ist bekannt, daß TGF- $\beta$ 1 seine eigene Expression (4,10) und die seiner eigenen Rezeptoren induzieren kann (6,91). Da die Zelllinie PANC-1 eine der Pankreaskarzinomzelllinien ist, die *in vitro* auf eine Stimulation mit TGF- $\beta$  mit einer Wachstumsinhibition reagiert (4,46), wurden die Stimulationsversuche an dieser Zelllinie durchgeführt. Die durchgeführten Stimulationen mit TGF- $\beta$ 1 ergaben nach 5 Stunden eine deutlich gesteigerte Expression von TGF- $\beta$ 1,

TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ -R I und II, c-fos und TIEG. Die Kinetik der Expressionssteigerungen war jedoch unterschiedlich: Während bei TGF- $\beta$ 2 und c-fos die Transkription nach 28 Stunden bereits wieder abfällt, d. h. TGF- $\beta$ 2 und c-fos nur kurzfristig aktiviert werden, ist sie bei TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TIEG und TGF- $\beta$ -R I noch weiter gesteigert. Wir können hier nachweisen, daß TGF- $\beta$ 1 sich selbst, seine Isoform TGF- $\beta$ 2 und seine Rezeptoren autokrin induzieren kann. Der unterschiedliche Zeitverlauf der TGF- $\beta$ 2 Expression legt nahe, daß die Isoformen verschiedene zelluläre Funktionen ausüben, die bis heute noch weitgehend unbekannt sind. Weiterhin ist diese zeitliche Regulation zellspezifisch, da z. B. bei Untersuchungen an AKR-2B-Fibroblasten und Mauskeratinozyten exogen zugeführtes TGF $\beta$ 1 eine Steigerung der TGF- $\beta$ 1-Expression induziert, jedoch zu einer Herunterregulation der TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ 3-mRNA-Mengen führt (8). Diese TGF- $\beta$ -Autoinduktion scheint einen funktionierenden TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweg vorauszusetzen, da bei den anderen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (MIA PaCa-2 und BxPC3), die beide eine Störung des TGF- $\beta$ -Signaltransduktionsweges besitzen (133 und siehe Seiten 51 und 52), weder durch Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 noch durch Inhibition des TGF- $\beta$ -R II ein signifikanter Einfluß auf die Expression von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 oder der beiden TGF- $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen werden konnte. Wie bei der Zelllinie PANC-1 kommt es auch bei BxPC3 zu einer erhöhten Konzentration der TGF- $\beta$ 3-mRNA nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und zu einer Verminderung von TGF- $\beta$ 3 durch Inhibition des Signalweges durch anti-TGF- $\beta$ -RII-Antikörper. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß TGF- $\beta$ 3 im Gegensatz zu TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 einen Signalweg hat, der vom TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ II abhängig, jedoch Smad4-unabhängig ist. Dies würde auch die fehlende Heraufregulierung von TGF- $\beta$ 3 bei der Zelllinie MIA PaCa-2 erklären, da diese durch einen defekten TGF- $\beta$ -R II charakterisiert ist.

Ein weiteres Ziel unserer Experimente war es, den direkten Einfluß von TGF- $\beta$  auf die Expression der Zelladhäsionsmoleküle des E-Cadherin-Catenin-Systems zu untersuchen. Es gibt Hinweise darauf, daß TGF- $\beta$  einen Einfluß auf die Zelladhäsion hat. So konnte bei der Zelllinie NMuMG (epitheliale Zellen aus

Brustdrüsen der Maus) nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden mit TGF- $\beta$  eine Herunterregulation der E-Cadherin-mRNA nachgewiesen werden (93). Wir können eine ähnliche Verringerung der E-Cadherin- oder Cateninexpression durch TGF- $\beta$  bei den hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (u. a. auch der TGF- $\beta$ -responsiven Zelllinie PANC-1) nicht nachweisen.

Die Expression von Protoonkogenen wird unter anderem durch Hormone und Wachstumsfaktoren reguliert. Wie TIEG sind auch einige Transkriptionsfaktoren wie c-jun (110), junB (109), c-fos (27) oder c-myc (27,111) in die frühe Antwortphase nach einer TGF- $\beta$ -Stimulation einbezogen (6). AP-1 ist eine kollektive Bezeichnung für Transkriptionsfaktoren, die aus Jun-, Fos- oder ATF-Untereinheiten zusammengesetzt sind und die verschiedene Zielgene regulieren. Durch Stimulation mit TGF- $\beta$  interagieren Smad-Proteine mit c-Jun und c-Fos um die Transkription zu aktivieren (109,145). Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Expression von c-fos in den Zelllinien PaTu 8988t und BxPC3 nach TGF- $\beta$ 1-Stimulation weist auf eine direkte oder indirekte Beteiligung von TGF- $\beta$  an der Regulation der c-fos-Expression hin. Wegen der bereits angesprochenen Defekte in der TGF $\beta$ -Signalkaskade der BxPC3-Zellen scheint jedoch eine Regulation unabhängig von Smad-Proteinen stattzufinden.

#### ***IV.IV Expression verschiedener Wachstumsfaktoren***

Hauptmerkmale malignen Wachstums sind einerseits eine fehlende Sensitivität gegenüber wachstumslimitierenden und apoptotischen Signalen und andererseits eine Selbstversorgung mit fördernden Wachstumssignalen, d. h. die eigene Herstellung stimulierender Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren. Bei Pankreaskarzinomen sind verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren überexprimiert.

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-1 und -2) sind wichtige Regulatoren von Zellwachstum, Differenzierung und Metabolismus und spielen eine wesentliche Rolle in der Ontogenese und der Regeneration des Pankreas

(9). So bewirkt eine Stimulation verschiedener Zelllinien mit IGF-1 eine veränderte Zellmotilität durch eine Reorganisation von Integrinen (1), eine Aktivierung der MAPK und PI3-Kinase/Akt-Signalwege (97) sowie eine Phosphorylierung von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin (1, 113). IGF-2 induziert dagegen eine schnelle EMT, eine Degradierung von E-Cadherin und eine Transkription der  $\beta$ -Catenin/Tcf-3-Zielgene (96).

Bezüglich der Expression von IGF-1 und IGF-2 stellen sich in dieser Arbeit große Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien dar. IGF-2 wird besonders stark von der Rattenpankreaszelllinie AR4-2J exprimiert, IGF-1 dagegen von PANC-1, AsPC1 und PaTu 8988t. Bei fehlender Expression von IGF-1 können wir den in der Literatur für MIA PaCa-2 beschriebenen autokrinen Loop (40,102) nicht bestätigen. Möglicherweise ist die Diskrepanz der Ergebnisse dadurch zu erklären, daß durch eine häufige Kultivierung der Zelllinien verschiedene Subformen entstanden sind, die von der ursprünglichen Zelllinie abweichen. Bei gut differenzierten Zelllinien wie BxPC3 und PaTu 8988s ist im Gegensatz zu den mäßig bis gering differenzierten Zelllinien mit der Ausnahme von MIA PaCa-2 keine IGF-1-mRNA nachweisbar. Somit scheint eine schwache Korrelation zwischen der IGF-1-Expression und dem Differenzierungsgrad zu bestehen und die erhöhte IGF-1-Expression einen Wachstumsvorteil für wenig differenzierte Pankreaszelllinien darzustellen.

Zu den in Pankreaszelllinien überexprimierten Wachstumsfaktoren gehören auch FGF-1 und FGF-2 (74,143), deren Überexpression mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium, einem verstärkten Metastasierungspotential (19) und einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten korrelieren (142). Die Stimulation mit FGF bewirkt bei bestimmten Pankreaszelllinien eine Phosphorylierung von E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin und hat damit möglicherweise einen Einfluß auf die Zelladhäsionskomponenten (34,35). Wir können nachweisen, daß alle untersuchten humanen Pankreaszelllinien FGF-2-mRNA enthalten. Da die Expressionsstärke von FGF-2 von MIA PaCa-2 über PANC-1 zu BxPC3 abnimmt, kann eine Korrelation der FGF-2-Expression mit abnehmendem Differenzierungsgrad angenommen werden.

Sowohl der EGFR als auch TGF- $\alpha$  werden in geringen Mengen in gesundem Pankreasgewebe exprimiert, in (Pankreas-)Karzinomen jedoch überexprimiert (72,73). Verantwortlich für die damit assoziierte erhöhte Invasions- und Metastasierungstendenz wird eine autokrine Stimulation des EGFR durch TGF- $\alpha$  gemacht, der die Aktivierung des Ras-Raf-MEK-MAPK-Signaltransduktionsweges folgt, was unter anderem zu einem Migrations- oder Proliferationsvorteil führt (48). EGF bewirkt zudem in einigen Zellarten eine Phosphorylierung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin und eine Dissoziation von Aktin,  $\alpha$ -Actinin und Vinculin vom E-Cadherin-Catenin-Komplex (53). In Übereinstimmung mit der Literatur exprimieren alle von uns untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien EGF-Rezeptor-mRNA und TGF- $\alpha$ -mRNA (103). Die von Korc et al. 1992 (73) neben Überexpressionen von EGFR und TGF- $\alpha$  erhöhte EGF-Expression in Pankreaskarzinomen können wir in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien nicht nachweisen. Eine Korrelation von TGF- $\alpha$  bzw. dem EGFR mit dem Differenzierungsgrad der untersuchten Zelllinien kann in dieser Arbeit nicht abgeleitet werden. Es scheint, daß bei zunehmender Entartung der einzelnen Karzinomzelllinien diese unabhängiger von autokrinen TGF- $\alpha$ -Stimulationen werden.

## **V. Zusammenfassung:**

Das Pankreaskarzinom ist durch eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion gekennzeichnet und zählt durch seine starke Invasivität und Metastasierung und damit verbundenen sehr kurzen mittleren Überlebenszeit zu den bösartigsten Karzinomen unserer Zeit. Einer veränderten Zell-Zell-Adhäsion wird ein bedeutender Einfluß auf die Invasivität und Metastasierung von Karzinomen zugeschrieben. Der E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplex spielt dabei eine zentrale Rolle.

In dieser Arbeit sollte einerseits die Expression der E-Cadherin/Catenin-Zelladhäsionsmoleküle in sechs verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien analysiert sowie andererseits der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Expression von E-Cadherin und Cateninen mittels Northern Blot-Hybridisierungen ermittelt werden.

Dabei zeigt sich, daß E-Cadherin in mindestens der Hälfte der Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert wird, wohingegen die mRNAs der Catenine in unterschiedlicher Intensität von allen untersuchten Zelllinien synthetisiert werden. Bei Betrachtung der invasiven Eigenschaften und des Differenzierungsgrades der Pankreaskarzinomzellen bestätigt sich die erhöhte Invasivität der Zelllinien bei einem Verlust der E-Cadherinexpression. Jedoch kann aufgrund der Expression von E-Cadherin sowie der Catenine nicht auf eine geringe Metastasierungswahrscheinlichkeit geschlossen werden. Ursache für die gestörte Funktionalität des E-Cadherin/Catenin-Zelladhäsionssystems können neben Veränderungen auf Genebene vor allem posttranslationelle Veränderungen der Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Komplexes sein.

Durch die Analyse der Expression von Wachstumsfaktoren konnte sowohl für IGF-1 als auch für FGF-2 eine Korrelation der Expression mit einer Verringerung des Differenzierungsgrades der Pankreaskarzinomzelllinien aufgezeigt werden.

Mit Ausnahme der Zelllinie MIA PaCa-2 konnte in allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien eine Expression der transformierenden Wachstumsfaktoren beta (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3) sowie der TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I und II nachgewiesen werden. Die autokrine Induktion der Expression von TGF- $\beta$  und seiner Rezeptoren ist abhängig von der

Funktionalität des Smad-abhängigen TGF- $\beta$ -Signalweges. Nur im Fall der TGF- $\beta$ 1-induzierten Expression von TGF- $\beta$ 3 konnte eine Unabhängigkeit von Smad4 gezeigt werden.

Die durch TGF- $\beta$  hervorgerufene positive Beeinflussung der Migration und Metastasierung von Karzinomzellen scheint dagegen durch einen Smad-unabhängigen Weg zustande zu kommen, da dieses Phänomen auch in Smad4-defekten Zelllinien zu beobachten ist. Vieles weist darauf hin, daß sich die Pankreaskarzinomzelllinien über die erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  eine für sie günstige Zellmatrix schaffen, die Migration, Invasivität und Metastasierung erleichtert.

Ein direkter Einfluß von TGF- $\beta$  auf die Expression der Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes konnte nicht nachgewiesen werden, und ebenso konnte keine Korrelation der TGF- $\beta$ -mRNA-Konzentrationen mit dem Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsgrad der Zelllinien gefunden werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß das Vorhandensein von E-Cadherin sowie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin keinen verlässlichen Hinweis auf eine Verhinderung der Metastasierung von Pankreaskarzinomen bietet. Die Expression von E-Cadherin sowie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin werden in Pankreaskarzinomzellen von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , EGF und IGF nicht signifikant beeinflusst.

## VI. Literaturverzeichnis

- 1 Andre F., Rigot V., Thimonier J., Montixi C., Parat F., Pommier G., Marvaldi J., Luis J.: Integrins and e-cadherin cooperate with IGF-1 to induce migration of epithelial colonic cells. *Int J Cancer* 83: 497-505 (1999)
- 2 Apte M.V., Haber P.S., Darby S.J., Rodgers S.C., McCaughan G.W., Korsten M.A., Pirola R.C., Wilson J.S.: Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44: 534-541 (1999)
- 3 Bachem M.G., Sell K.-M., Melchior R., Kropf J., Eller T., Gressner A.M.: Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 63: 123-130 (1993)
- 4 Baldwin R.L., Korc M.: Growth inhibition of human pancreatic carcinoma cells by transforming growth factor beta-1. *Growth factors* 8: 23-34 (1993)
- 5 Baldwin R.L., Friess H., Yokoyama M., Lopez M.E., Kobrin M.S., Büchler M.W., Korc M.: Attenuated ALK5 receptor expression in human pancreatic cancer: correlation with resistance to growth inhibition. *Int J Cancer* 67: 283–288 (1996)
- 6 Barnard J.A., Lyons R.M., Moses H.L.: The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . *Bioch Biophys Acta* 1032: 79-87 (1990)

- 7 Barton C.M., Hall P.A., Hughes C.M., Gullick W.J., Lemoine N.R.: Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 163: 111-116 (1991)
- 8 Bascom C.C., Wolfshohl J.F., Correy R.J., Madisen L., Webb N.R., Purchio A.R., Derynck R., Moses H.L.: Complex regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Mol and Cell Biol* 9: 5508–5515 (1989)
- 9 Baserga R., Hongo A., Rubini M., Prisco M., Valentini B.: The IGF-1 receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332: F105-F126 (1997)
- 10 Beauchamp R.D., Lyons R.M., Yang E.Y., Coffey R.J., Moses H.L.: Expression of and response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* 5: 369-380 (1990)
- 11 Beavon I.R.: The e-cadherin-catenin complex in tumour metastasis. Structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 36: 1607-1620 (2000)
- 12 Behrens J., Mareel M.M., van Roy F.M., Birchmeier W.: Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 108: 2435-2447 (1989)
- 13 Beraoka H., Sawada T., Yamashita Y., Nakata B., Ohira M., Ishikawa T., Nishino H., Hirakawa K.: TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cellular invasion. *Int J Oncol* 19:709-715 (2001)

- 14           Bhattacharyya E., Panchal A., Wilkins T.J., de Ondarza J., Hootman S.R.: Insulin, transforming growth factors, and substrates modulate growth of guinea pig pancreatic duct cells in vitro. *Gastroenterol* 109: 944-952 (1995)
- 15           Bhowmick N.A., Ghiassi M., Bakin A., Aakree M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L., Moses H.L.: Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27-36 (2001)
- 16           Bockman D.E.: Toward understanding pancreatic disease: from architecture to cell signaling. *Pancreas* 11: 324-329 (1994)
- 17           Border W.A., Ruoslahti E.: Transforming growth factor- $\beta$  in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1-7 (1992)
- 18           Boyd J.A., Kaufman D.G.: Expression of transforming growth factor beta 1 by human endometrial carcinoma cell lines: inverse correlation with effects on growth rate and morphology. *Cancer Res* 50: 3394-3399 (1990)
- 19           Bruns C.J., Harbison M.T., Kuniyasu H., Eue I., Fidler I.J.: In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1: 50-62 (1999)
- 20           Butz S., Kemler R.: Distinct cadherin-catenin complexes in calcium-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Letters* 355: 195-200 (1994)

- 21 Casini A., Pinzani M., Milani S., Grappone C., Galli G., Jezequel A.M., Schuppan D., Rotella C.M., Surrenti C.: Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor  $\beta$ 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterol* 105: 245-253 (1993)
- 22 Caulin C., Scholl F.G., Frontelo P., Gamallo C., Quintanilla M.: Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor- $\beta$ 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell growth and differentiation* 6: 1027-1035 (1995)
- 23 Chen R.-H., Ebner R., Derynck R.: Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- $\beta$  activities. *Science* 260: 1344-1348 (1993)
- 24 Chen Y.F., Pan G.-Z., Hou X., Liu T.-H., Chen J., Yanaihara C., Yanaihara N.: Epidermal growth factor and its receptors in human pancreatic carcinoma. *Pancreas* 5: 278-283 (1990)
- 25 Chiao P.J., Hunt K.K., Grau A.M., Abramian A., Fleming J., Zhang W., Breslin T., Abbruzzese J. L., Evans D. B.: Tumor suppressor gene Smad4/DPC4, its downstream target genes, and regulation of cell cycle. *Ann N Y Acad Sci* 880: 31-37 (1999)
- 26 Christophe J.: Pancreatic tumoral cell line AR42J: an ampicrine model. *Am J Physiol* 266: G963-G971 (1994)
- 27 Coffey R.J., Bascom C.C., Sipes N.J., Graves-Deal R., Weissman B.E., Moses H.L.: Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor  $\beta$ . *Mol Cell Biol* 8: 3088-3093 (1988)
- 28 Debruyne P., Vermaulen S., Mareel M.: The role of the e-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol Berg* 62: 393-402 (1999)

- 29 Denkler S., Prunier C., Ferrand N., Gauthier J.M., Atfi A.: C-Jun inhibits transforming growth factor beta-mediated transcription by repressing Smad3 transcriptional activity. *J Biol Chem* 275: 28858-28865 (2000)
- 30 Derynck R.: Transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell* 54: 593-595 (1988)
- 31 Detjen K., Fenrich M.C., Logsdon C.D.: Transfected cholecystokinin receptors mediate growth inhibitory effects on human pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterol* 112: 952-959 (1997)
- 32 Dietrich J.-B.: AR4-2J cells: a model to study polypeptide hormone receptors. *Bioscience Reports* 16: 273-287 (1996)
- 33 Ebert M., Yokoyama M., Friess H., Büchler M.W., Korc M.: Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 54: 5775-5778 (1994)
- 34 El-Hariry I., Pignatelli M., Lemoine N.R.: FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 94: 652-661 (2001a)
- 35 El-Hariry I., Pignatelli M., Lemoine N.R.: FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 84: 1656-1663 (2001b)
- 36 Ellenrieder V., Hendler S.F., Boeck W., Seufferlein T., Menke A., Ruhland C., Adler G., Gress T.M.: 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: 4222-4228 (2001)

- 37 Elsässer H.-P., Lehr U., Agricola B., Kern H.F.: Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch* 61: 295-306 (1992)
- 38 Endo K., Ueda T., Ueyama J., Ohta T., Terada T.: Immunoreactive e-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 31: 558-565 (2000)
- 39 Foletta V.C., Segal D.H., Cohen D.R.: Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 63: 139-152 (1998)
- 40 Freeman J.W., Mattingly C.A., Stodel W.E.: Increased tumorigenicity in the human pancreatic cell line MIA PaCa-2 is associated with an aberrant regulation of an IGF-1 autocrine loop and lack of expression of the TGF- $\beta$ type RII receptor. *J Cell Physiol* 165: 155-163 (1995)
- 41 Friess H., Yamanaka Y., Büchler M., Beger H.G., Kobrin M.S., Baldwin R.L., Korc M.: Enhanced expression of the type II transforming growth factor  $\beta$ receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression. *Cancer Res* 53: 2704-2707 (1993a)
- 42 Friess H., Yamanaka Y., Büchler M., Ebert M., Beger H.G., Gold L.I., Korc M.: Enhanced expression of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroentrol* 105: 1846-1856 (1993b)

- 43 Frixen U.H., Behrens J., Sachs M., Eberle G., Voss B., Warda A., Loechner D., Birchmeier W.: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113: 173-185 (1991)
- 44 Fujimoto K., Sheng H., Shao J., Beauchamp R.D.: Transforming growth factor-beta1 promotes invasiveness after cellular transformation with activated Ras in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 266: 239-249 (2001)
- 45 Furuyama H., Arii S., Mori A., Imamura M.: Role of E-cadherin in peritoneal dissemination of the pancreatic cancer cell line, panc-1, through regulation of cell to cell contact. *Cancer Lett* 157: 201-209 (2000)
- 46 Geng M.M., Ellenrieder V., Wallrapp C., Müller-Pillasch F., Sommer G., Adler G., Gress T.M.: Use of representational difference analysis to study the effect of TGF $\beta$  on the expression profile of a pancreatic cancer cell line. *Genes, Chromosomes and Cancer* 26: 1-10 (1999)
- 47 Giehl K., Seidel B., Gierschik P., Adler G., Menke A.: TGF $\beta$ 1 represses proliferation of pancreatic carcinoma cells which correlates with Smad4-independent inhibition of ERK activation. *Oncogene* 19: 4531-4541 (2000)
- 48 Giehl K., Skripczynski B., Mansard A., Menke A., Gierschik P.: growth factor-dependent activation of the ras-raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19: 2930-2942 (2000)

- 49 Glukhova M., Deugnier M.-A., Thiery J.P.: Tumour progression: the role of cadherins and integrines. *Molecular Medicine Today* 84–89 (1995)
- 50 Goggins M., Shekher M., Turnacioglu K., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E.: Genetic alterations of the transforming growth factor  $\beta$  receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 58: 5329-5332 (1998)
- 51 Gold L.I.: The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10: 303-360 (1999)
- 52 Hall P.A., Lemoine N.R.: Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J Pathol* 166: 97-103 (1992)
- 53 Hazan R.B., Norton L.: The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 9078-9084 (1998)
- 54 Henderson B.R.: Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2: 653-660 (2000)
- 55 Hocevar B.A., Howe P.H.: Regulation of AP-1 activity by TGF-beta. *Methods Mol Biol* 142: 97-108 (2000)
- 56 Hoschuetzky Heinz., Aberle H., Kemler R.:  $\beta$ -Catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127: 1375-1380 (1994)
- 57 Hülken J., Birchmeier W., Behrens J.: E-cadherin und APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127: 2061-2069 (1994)

- 58 Humphrey P.A., Zhu X., Zarnegar R., Swanson P.E., Ratliff T.L., Vollmer R.T., Day M.L.: Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 147: 386-396 (1995)
- 59 Igotz R.A., Massagues J.: Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4345 (1986)
- 60 Ishiwata T., Bergmann U., Kornmann M., Lopez M., Beger H.G., Korc M.: Altered expression of insulin-like growth factor II receptor in human pancreatic cancer. *Pancreas* 15: 367-373 (1997)
- 61 Ivanovic V., Melman A., Davis-Joseph B., Valcic M., Geliebter J.: Elevated plasma levels of TGF- $\beta$ 1 in patients with invasive prostate cancer. *Nature Medicine* 1: 282-283 (1995)
- 62 Jawhari A., Jordan S., Poole S., Browne P., Pignatelli M., Farthing M.J.G.: Abnormal immunoreactivity of the e-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterol* 112: 46-54 (1997)
- 63 Jiang W.G., Hiscox S.: Hepatocyte growth factor/scatter factor, a cytokine playing multiple and converse roles. *Histol Histopathol* 12: 537-555 (1997)
- 64 Karayiannakis A., Syrigos K.N., Chatzigianni E., Papanikolaou S., Alexiou D., Kalahanis N., Rosenberg T., Bastoinis E.: Aberrant e-cadherin expression associated with loss of differentiation and advanced stage in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 18: 4177-4180 (1998)
- 65 Karin M., Liu Z., Zandi E.: AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246 (1997)

- 66 Kermorgant S., Walker F., Hormi K., Dessirier V., Lewin M.J.M., Lehy T.: Developmental expression and functionality of hepatocyte growth factor and c-met in human fetal digestive tissues. *Gastroenterol* 112: 1635-1647 (1997)
- 67 Kiehne K., Herzig K.-H., Fölsch U.R.: C-met expression in pancreatic cancer and effects of hepatocyte growth factor on pancreatic cancer cell growth. *Pancreas* 15: 35-40 (1997)
- 68 Kim S.H., Li Z., Sacks D.B.: E-cadherin-mediated cell-cell-attachment activates Cdc42. *J Biol Chem (US)* 275: 36999-36705 (2000)
- 69 Kleeff J., Ishiwata T., Maruyama H., Friess H., Truong P., Büchler M.W., Falb D., Korc M.: The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 18: 5363-5372 (1999)
- 70 Kleeff J., Maruyama H., Friess H., Buchler M.W., Falb D., Korc M.: Smad6 suppresses TGF-beta-induced growth inhibition in COLO-357 pancreatic cancer cells and is overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 268-273 (1999)
- 71 Knudsen K.A., Soler A.P., Johnson K.R., Wheelock M.J.: Interaction of  $\alpha$ -actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via  $\alpha$ -catenin. *J Cell Biol* 130: 67-77 (1995)
- 72 Korc M.: Growth factors and pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 9: 87-91 (1991)

- 73 Korc M., Chandrasekar B., Yamanaka Y., Friess H., Büchler M., Beger H.G.: Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 90: 1352-1360 (1992)
- 74 Kornmann M., Beger H.G., Korc M.: Role of fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 17: 169-175 (1998)
- 75 Kruse M.L., Hildebrand P.B., Timke C., Fölsch U.R., Schmidt W.E.: TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 30: 47-52 (2000)
- 76 Kuniyasu H., Yasui W., Yokozaki H., Kitadai Y., Tahara E.: Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 55: 72-75 (1993)
- 77 Labbe E., Letamendia A., Attisano L.: Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8358-8363 (2000)
- 78 Lemoine N.R., Hughes C.M., Barton C.M., Poulson R., Jeffery R.E., Klöppel G., Hall P.A., Gullick W.J.: The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 166: 7-12 (1992)
- 79 Letamendia A., Labbe E., Attisano L.: Transcriptional regulation by smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am* 81-A Suppl 1: 31-39 (2001)

- 80 Li Z., Kim S.H., Higgins J.M., Brenner M.B., Sacks D.B.: IQGAP1 and calmodulin modulate e-cadherin function. *J Biol Chem* 274: 37885-37892 (1999)
- 81 Liehr R.-M., Melnykovich G., Solomon T.E.: Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines Panc-1 and Mia Paca-2. *Gastroenterol* 98: 1666-1674 (1990)
- 82 Lin H.Y., Lodish H.F.: Receptors for the TGF- $\beta$  superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends in cell biology* 3: 14-19 (1993)
- 83 Liu D., Nigam A.K., Nasim M.M., Stamp G.W.H., Hirano S., Takeichi M.: Transfection of E-cadherin into a human colon carcinoma cell line induces differentiation and inhibits growth in vitro. *Gut* 34: 627-630 (1993)
- 84 Liu N., Furukawa T., Kobari M., Tsao M.-S.: Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 153: 263-269 (1998)
- 85 Lo Muzio L.: A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 152-165 (2001)
- 86 Löhr M., Trautmann B., Göttler M., Peters S., Zauner I., Baillet B., Klöppel G.: Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer* 69: 144-151 (1994)
- 87 Lohr M., Schmidt C., Ringel J., Kluth M., Müller P., Nizze H., Jesnowski R.: Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 61: 550-555 (2001)

- 88 Madden M.E., Sarras M.P.: Morphological and biochemical characterization of a human pancreatic ductal cell line (PANC-1). *Pancreas* 3: 512-528 (1988)
- 89 Madden M.E., Heaton K.M., Huff J.K., Sarras M.P.: Comparative analysis of a human pancreatic undifferentiated cell line (MIA PaCa-2) to acinar and ductal cells. *Pancreas* 5: 529-537 (1989)
- 90 Massague J.: The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641 (1990)
- 91 Menke A., Gerling I., Giehl K., Vogelmann R., Reinshagen M., Adler G.: Transforming growth factor- $\beta$ -induced upregulation of transforming growth factor- $\beta$  receptor expression in pancreatic regeneration. *Biochem Biophys Acta* 1449: 178-185 (1999)
- 92 Menke A., Philippi C., Vogelmann R., Seidel B., Lutz M.P., Adler G., Wedlich D.: Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 61: 3508-3517 (2001)
- 93 Miettinen P.J., Ebner R., Lopez A.R., Derynck R.: TGF- $\beta$  induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127: 2021-2036 (1994)
- 94 Miyazono K.: TGF-beta/SMAD signaling and its involvement in tumor progression. *Biol Pharm Bull* 23:1125-1130 (2000)
- 95 Miyazono K., ten Dijke P., Heldin C.H.: TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75: 115-157 (2000)

- 96 Morali O.G., Delmas V., Moore R., Jeanney C., Thiery J.P., Larue L.: IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20: 4942-4950 (2001)
- 97 Nair P.N., De Armond D.T., Adamo M.L., Strodel W.E., Freeman J.W.: Aberrant expression and activation of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) are mediated by an induction of IGF-1R promoter activity and stabilization of IGF-1R mRNA and contributes to growth factor independence and increased survival of the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Oncogene* 20: 8203-8214 (2001)
- 98 Nollet F., Berx G., van Roy F.: The role of the e-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2: 77-85 (2000)
- 99 Novak A., Dedhar S.: Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* 56: 523-537 (1999)
- 100 Novak A., Hsu S.C., Leung-Hagesteijn C., Redeva G., Papkoff J., Montesano R., Roskelley C., Grosschedl R., Dedhar S.: Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4374-4379 (1998)
- 101 Oft M., Heider K.-H., Beug H.: TGF- $\beta$  signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Current Biology* 8: 1243-1252 (1998)

- 102 Ohmura E., Okada M., Onoda N., Kamiya Y., Murakami H., Tsushima T., Shizume K.: Insulin-like growth factor I and transforming growth factor  $\alpha$  as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* 50: 103-107 (1990)
- 103 Oikawa T., Hitomi J., Kono A., Kaneko E., Yamaguchi K.: Frequent expression of genes for receptor tyrosine kinases and their ligands in human pancreatic cancer cells. *Int J Pancreatol* 18: 15-23 (1995)
- 104 Okuno H., Suzuki T., Yoshida T., Hashimoto Y., Curran T., Iba H.: Inhibition of jun transformation by a mutated fos gene: design of an anti-oncogene. *Oncogene* 6: 1491-1497 (1991)
- 105 Oyama T., Kanai Y., Ochiai A., Akimoto S., Oda T., Yanagihara K., Nagafuchi A., Tsukita S., Shibamoto S., Ito F., Takeichi M., Matsuda H., Hirohashi S.: A truncated  $\beta$ -catenin disrupts the interaction between e-cadherin and  $\alpha$ -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res* 54: 6282-6287 (1994)
- 106 Ozawa M., Kemler R.: Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of  $\alpha$ -catenin from the E-cadherin complex. *J Biol Chem* 273: 6166 –6170 (1998)
- 107 Paciucci R., Vila M.R., Adell T., Diaz V.M., Tora M., Nakamura T., Real F.X.: Activation of the urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system and redistribution of E-Cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing met. *Am J Pathol* 153: 201-212 (1998)
- 108 Perl A.-K., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H., Christofori G.: A causal role for e-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392: 190-193 (1998)

- 109 Peron P.: Potentiation of Smad transactivation by jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in rat hepatocytes. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation. *J Biol Chem* 276: 10524-10531 (2001)
- 110 Pertovaara L., Sistonen L., Bos T.J., Vogt P.K., Keski-Oja J., Alitalo K.: Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor  $\beta$  stimulation. *Mol Cell Biol* 9: 1255-1262 (1989)
- 111 Pietenpol J.A., Holt J.T., Stein R.W., Moses H.L.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3758-3762 (1990)
- 112 Pignatelli M., Ansari T.W., Gunter P., Liu D., Hirano S., Takeichi M., Klöppel G., Lemoine N.R. Loss of membrane E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J of Pathol* 174: 243-248 (1994)
- 113 Playford M.P., Bicknell D., Bodmer W.F., Macaulay V.M.: Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12103-12108 (2000)
- 114 Poston G.J., Gillespie J., Guillou P.J.: Biology of pancreatic cancer. *Gut* 32: 800-812 (1991)

- 115 Qiao Q., Ramadani M., Gansauge S., Gansauge F., Leder G., Beger H.G.: Reduced membranous and ectopic cytoplasmic expression of beta-catenin correlates with cyclin D1 overexpression and poor prognosis in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 95: 194-197 (2001)
- 116 Qing J., Zhang Y., Derynck R.: Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta-induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. *J Biol Chem* 275: 38802-38812 (2000)
- 117 Di Renzo M.F., Poulsom R., Olivero M., Comoglio P.M., Lemoine N.R.: Expression of the met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 55: 1129-1138 (1995)
- 118 Sakanaka C., Sun T.Q., Williams L.T.: New steps in the Wnt/beta-catenin signal transduction pathway. *Recent Prog Horm Res* 55: 225-236 (2000)
- 119 Sakorafas G.H., Tsiotou A.G., Tsiotos G.G.: Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev* 26: 29-52 (2000)
- 120 Schneider E., Schmid-Kotsas A., Zhao J., Weidenbach H., Schmid R.M., Menke A., Adler G., Waltenberger J., Grunert A., Bachem M.G.: Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C532-C543 (2001)

- 121 Schwarte-Waldhoff I., Volpert O.V., Bouck N.P., Sipos B., Hahn S.A., Klein-Scory S., Luttgies J., Klöppel G., Graeven U., Eilert-Micus C., Hintelmann A., Schmiegel W.: Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 9624-9629 (2000)
- 122 Shaulian E., Karin M.: AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-2400 (2001)
- 123 Shimoyama Y., Nagafuchi A., Fujita S., Gotoh M., Takeichi M., Tsukita S., Hirohashi S.: Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of  $\alpha$ -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res* 52: 5770-5774 (1992)
- 124 Shiozaki H., Tahara H., Oka H., Miyata M., Kobayashi K., Tamura S., Iihara K., Doki Y., Hirano S., Takeichi M., Mori T.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J of Pathol* 139: 17-23 (1991)
- 125 Smith J.P., Kramer S.T., Solomon T.E.: CCK stimulates growth of six human pancreatic cancer cell lines in serum-free medium. *Reg Peptides* 32: 341-349 (1991)
- 126 Smith J.P., Yelamarty R.V., Kramer S.T., Cheung J.Y.: Effects of cholecystinin on cytosolic calcium in pancreatic duct segments and ductal cells. *Am J Physiol* 264: G1177-G1183 (1993)
- 127 Smith J.P., Liu G., Sounararajan V., McLaughlin P.J., Zagon I.S.: Identification and characterisation of CCK-B/gastrin receptors in human pancreatic cancer cell lines. *Am J Physiol* 266: R277-R283 (1994)
- 128 Stockinger A., Eger A., Wolf J., Beug H., Foisner R.: E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154: 1185-1196 (2001)

- 129 Takao S., Che X., Fukudome T., Natsugoe S., Ozawa M., Aikou T.: Down-regulation of e-cadherin by antisense oligonucleotide enhances basement membrane invasion of pancreatic carcinoma cells. *Hum Cell* 13: 15-21 (2000)
- 130 Takeichi M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (Washington)* 251: 1451-1455 (1991)
- 131 Tan M.H., Nowak N.J., Loo R., Ochi H., Sandberg A.A., Lopez C., Pickren J.W., Berjian R., Douglass H.O., Chu T.M.: Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* 4: 15-23 (1986)
- 132 Verrecchia F., Mauviel A.: Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 118: 211-215 (2002)
- 133 Villanueva A., Garcia C., Paules A.B., Vicente M., Megias M., Reyes G., Villalonga P., Agell N., Lluís F., Bachs O., Capella C.: Disruption of the antiproliferative TGF- $\beta$  signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17: 1969-1978 (1998)
- 134 Vivien D., Wrana J.L.: Ligand-induced recruitment and phosphorylation of reduced TGF- $\beta$  type I receptor. *Experimental Cell Res* 221: 60-65 (1995)
- 135 Waltzer L., Bienz.: The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18: 231-246 (1999)

- 136 Wang Y., Selden A.C., Morgan N., Stamp G.W.H., Hodgson H.J.F.: Hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human mammary epithelium. *Am J Pathol* 144: 675-682 (1994)
- 137 Warshaw A.L., del Castillo C.F.: Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 325: 455-463 (1992)
- 138 Weidner K.M., Behrens J., Vandekerckhove J., Birchmeier W.: Scatter factor: Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol* 111: 2097-2108 (1990)
- 139 Weinel R.J., Neumann K., Kisker O., Rosendahl A.: Expression and potential role of e-cadherin in pancreatic carcinoma. *Int J of Pancreatol* 19: 25-30 (1996)
- 140 Wijnhoven B.P., Dinjens W.N., Pignatelli M.: E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Gr J Surg (England)* 87: 992-1005 (2000)
- 141 Yamanaka Y., Friess H., Büchler M., Beger H.G., Gold L.I., Korc M.: Synthesis and expression of transforming growth factor  $\beta$ -1,  $\beta$ -2, and  $\beta$ -3 in the endocrine and exocrine pancreas. *Diabetes* 42: 746-756 (1993)
- 142 Yamanaka Y., Friess H., Büchler M., Beger H.G., Uchida E., Onda M., Kobrin M.S., Korc M.: Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 53: 5289-5296 (1993)
- 143 Yamazaki K., Nagao T., Yamaguchi T., Saisho H., Kondo Y.: Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2)- associated with tumour proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Arch* 431: 95-101 (1997)

- 144 Yan S., Krebs S., Leister K.J., Wenner C.E.: Perturbation of EGF-activated MEK1 and PKB signal pathways by TGF-beta1 correlates with perturbation of EGF-induced cyclin D1 and DNA synthesis by TGF-beta1 in C3H 10T1/2 cells. *J Cell Physiol* 185: 107-116 (2000)
- 145 Zhang Y., Feng X.H., Derynck R.: Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394: 909-913 (1998)
- 146 Zhurinsky J., Shtutman M., Ben-Ze'ev A.: Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol (United States)* 20: 4238-4252 (2000)

## VII. Danksagung

Ich möchte

- Herrn Prof. Dr. med. G. Adler als meinem Doktorvater für die großzügige Überlassung des Themas,
- Herrn Dr. rer. nat. A. Menke für sein Entgegenkommen, seine gute Betreuung und sofortige Hilfe mit Wort und Tat zu jeder Zeit
- Frau H. Wecklein für ihre Unterweisung und Hilfe im Labor
- meiner Familie und meinen Freunden, v.a. Herrn V. Küspert für Ihre Unterstützung
- meinem Gott für die Ermöglichung von Studium, Beruf und Promotion

von ganzem Herzen danken.

## **VIII. Lebenslauf**

### ***Persönliche Daten:***

Name	Christiane Jung
Geb.datum und -ort	18. Juli 1970 in Böblingen
Anschrift	Pestalozzistraße 50, 86420 Diedorf
Familienstand	ledig, 1 Tochter

### ***Schulbildung:***

1976 - 1980	Grundschule Soldnerschule, Augsburg
1980 - 1983	Gymnasium Maria Ward, Augsburg
1983 - 1987	Reischlesche Wirtschaftsschule, Augsburg

### ***Berufsausbildung:***

1987 - 1989	Ausbildung zur Industriekauffrau bei der Fa. Hoechst, Gersthofen
-------------	--

### ***Weiterbildung:***

1989 - 1992	Bayernkolleg, Augsburg
-------------	------------------------

### ***Hochschulbildung:***

1992 - 1998	Humanmedizin an der Universität Ulm
1994	Ärztliche Vorprüfung
1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### ***Praktisches Jahr:***

1998 - 1999	Universität München, Lehrkrankenhaus Augsburg
-------------	---

**Famulaturen:**

- 1995 Urologie, Universitätsklinik Ulm (5 Wochen)
- 1996 Geburtshilfe/Gynäkologie und Notaufnahme am Basildon Hospital, England (3 und 4 Wochen)
- 1996 Chirurgie und Pädiatrie am Kalongo Hospital, Uganda (6 und 6 Wochen)
- 1997 Allgemeinmedizin Praxis Drs. Hartmann, Ulm (5 Wochen)
- 1997 Chirurgie und Akupunktur am Nanjing Railway Medical College, China (2 und 3 Wochen)

**Berufliche Tätigkeit:**

- 7/99 – 12/00 Ärztin im Praktikum in der Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Augsburg (Direktor Prof. Dr. med. Jens Witte)
- seit 1/01 Assistenzärztin in der Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Augsburg (Direktor Prof. Dr. med. Jens Witte)

Diedorf, den 15.04.2003