

Charakterisierung der Rolle von Smad7 bei der Entstehung und Entwicklung des Pankreaskarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Inga Lisa Zawallich

Betreuer: Prof. Dr. med. Jörg Kleeff

Gutachter:
Prof. Dr. Jonas Rosendahl, Halle (Saale)
Prof. Dr. Martin Loos, Heidelberg

Datum der Verteidigung: 30.09.2024

Referat

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt die häufigste maligne Neoplasie der exokrinen Bauchspeicheldrüse dar. Eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung spielen unter anderem Veränderungen in der TGF- β -Signalkaskade; so zeigt beispielsweise das inhibitorische Protein Smad7 eine erhöhte Expression in PDAC-Geweben bei gleichzeitig gesteigerter Tumorgenität. Das Ziel dieser Arbeit war daher, den Einfluss von Smad7 auf die Pathophysiologie des PDAC sowie seine Interaktion mit anderen Signalkaskaden und Proteinen zu untersuchen. Zunächst konnte im eigenen Patientenkollektiv eine deutlich erhöhte Expression von Smad7 in PDAC-Geweben im Vergleich zu nicht-pathologisch veränderten Pankreasgeweben und Geweben mit chronischer Pankreatitis auf mRNA- sowie Proteinebene gezeigt werden. Zur Untersuchung von Genen, die mit Smad7 interagieren, erfolgte eine in-silico-Analyse der 169 Patientengewebeproben umfassenden Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie mit Hilfe des cBioPortals. Aufgrund ihrer mit *SMAD7* signifikant korrelierenden mRNA-Spiegeln wurden die Gene *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* und *VEGFB* weiter analysiert. Im eigenen Patientenkollektiv zeigten *CASP7*, *CDC25A*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *TP53BP1* und *VEGFB* eine signifikant mit *SMAD7* korrelierte Genexpression. Weiterhin erfolgte der Nachweis einer konstanten Smad7-Expression auf RNA- und Proteinebene in den humanen PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1. Der zur weiteren funktionellen Analyse durchgeführte Smad7-Knockdown mittels RNA-Interferenz hatte in allen untersuchten Zelllinien eine signifikant verminderte Smad7-Expression auf RNA- und Proteinebene zur Folge. Dies führte zu einer geringeren mRNA-Expression von *TGFBR1* in den Zelllinien BxPC-3 und PANC-1 sowie von *SMAD2*, *SMAD4*, *AKT1* und *RHOA* in der Zelllinie PANC-1. Bei den, durch das cBioPortal identifizierten Genen, zeigte sich eine verminderte mRNA-Expression von *MAP3K3* in der Zelllinie BxPC-3, *PDPK1* und *TP53BP1* in BxPC-3 und PANC-1 sowie *TP53* in PANC-1. Anschließend wurde der Einfluss einer TGF- β 1-Stimulation und der Inkubation mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 auf die Zelllinie PANC-1 untersucht. Hier zeigte sich nach alleiniger Stimulation mit TGF- β 1 eine erhöhte *TGFBR1*-mRNA-Expression und nach Kombination von TGF- β 1 und U0126 eine Reduktion der *MAPK3*-mRNA-Expression. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit neben dem inhibitorischen Effekt von Smad7 auf die Expression von Smad2 und Smad4 auch der Einfluss auf die Expression weiterer Schlüsselgene wie *MAP3K3*, *PDPK1*, *TP53* und *TP53BP1* nachgewiesen werden.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese und Karzinogenese	1
1.1.3 Risikofaktoren.....	2
1.1.4 Klinik	2
1.1.5 Diagnostik	3
1.1.6 Therapie.....	3
1.1.7 Prognose	4
1.2 Der Transforming Growth Factor β	4
1.2.1 Funktionen des Transforming Growth Factor β	5
1.2.2 Aktivierung des Transforming Growth Factor β	5
1.2.3 Smad-Proteine als intrazelluläre Signalmoleküle des TGF- β -Signalweges..	5
1.2.4 Smad-unabhängige Signaltransduktion von TGF- β	7
1.2.5 Rolle von TGF- β in der Karzinogenese	7
1.2.6 Rolle von TGF- β in der Karzinogenese des PDAC	8
1.3 Das inhibitorische Smad7.....	8
1.3.1 Aufbau und strukturelle Besonderheiten von Smad7	8
1.3.2 Funktionen und Interaktionen von Smad7	8
1.3.3 Konträre Funktionen von Smad7 im PDAC	10
1.4 Ermittelte Gene in der in-silico-Analyse.....	10
2 Zielstellung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel.....	14
3.1.1 Chemikalien	14
3.1.2 Geräte	16
3.1.3 Hilfsmittel	17
3.1.4 Verwendete Kits	17
3.1.5 Primer	18
3.1.6 Antikörper	19
3.1.7 Lösungen und Puffer	19
3.1.8 Software.....	21
3.2 Patientengewebe.....	21

3.3	Humane PDAC-Zelllinien	22
3.4	Zellkultur	23
3.4.1	Transiente Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA.....	24
3.4.2	Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1 und U0126	25
3.5	Proteinbiochemie.....	25
3.5.1	Proteinisolierung aus Zelllinien	25
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay	25
3.5.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
3.5.4	Semidry-Blotting	26
3.5.5	Immundetektion	27
3.6	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.6.1	RNA-Isolierung	27
3.6.2	RNA-Vermessung.....	28
3.6.3	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	28
3.6.4	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	28
3.7	Histologie	29
3.7.1	Immunhistochemie mit der Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode.....	29
3.7.2	Auswertung der Immunhistochemie.....	31
3.8	Datenbankanalyse mittels des cBioPortals.....	31
3.9	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Klassifikation der untersuchten humanen PDAC-Patientengewebe	34
4.2	Expression von Smad7 in humanen Pankreasgeweben	34
4.2.1	mRNA-Expression von <i>SMAD7</i>	34
4.2.2	Proteinexpression von Smad7	35
4.3	In-silico-mRNA-Expressionsanalyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie mittels des cBioPortals	37
4.3.1	mRNA-Expression der kanonischen TGF- β -Signalkaskade im PDAC	37
4.3.2	Veränderungen der mRNA-Expression von Zielgenen der nicht-kanonischen TGF- β -Signalkaskade.....	38
4.3.3	In-silico-Analyse der mRNA-Expression von verschiedenen Genen im PDAC mittels des cBioPortals.....	39
4.3.4	Korrelationsanalyse der <i>in silico</i> ermittelten Gene im eigenen Patientenkollektiv.....	40
4.4	Expression von Smad7 in humanen PDAC-Zelllinien	41
4.5	Transienter Knockdown von Smad7 durch siRNA in etablierten PDAC-Zelllinien	41
4.5.1	Auswirkung des transienten Smad7-Knockdowns auf die TGF- β -Signalkaskade	42
4.5.2	Auswirkung der Transfektion mit Smad7-siRNA auf die <i>in silico</i> ermittelten Gene	44

4.6	Auswirkungen der Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf die TGF- β -Signalkaskade und <i>VEGFB</i> in der PDAC-Zelllinie PANC-1	45
4.6.1	Auswirkungen der TGF- β 1-Stimulierung auf die MAP-Signalkaskade	48
5	Diskussion.....	50
6	Zusammenfassung.....	64
7	Literaturverzeichnis	66
8	Thesen	80
	Erklärungen	X
	Danksagung	XI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erhöhte mRNA-Expression von <i>SMAD7</i> in humanen Pankreasgeweben und Vergleich der <i>SMAD7</i> -Expression in den Tumorstadien T1 bis T4.....	34
Abbildung 2: Nachweis von Smad7 in nicht pathologisch verändertem Pankreasgewebe.	35
Abbildung 3: Nachweis von Smad7 in Geweben mit chronischer Pankreatitis.	35
Abbildung 4: Nachweis von Smad7 in PDAC-Geweben.....	36
Abbildung 5: Immunhistochemischer Smad7-Nachweis in humanen Pankreasgewebe.	36
Abbildung 6: Oncoprint der mRNA-Expression der Gene des kanonischen TGF- β -Signalweges.	38
Abbildung 7: Korrelationsdiagramm der mRNA-Expression von <i>SMAD1</i> , <i>SMAD2</i> , <i>SMAD4</i> , <i>TGFBR1</i> und <i>TGFBR2</i> mit <i>SMAD7</i>	38
Abbildung 8: Oncoprint der untersuchten Gene, welche eine zur <i>SMAD7</i> -mRNA-Expression signifikant korrelierende mRNA-Expressionen aufwiesen.	39
Abbildung 9: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression der <i>in silico</i> ermittelten Gene <i>CASP7</i> , <i>CDC25A</i> , <i>E2F8</i> , <i>MAP3K3</i> , <i>MAPK3</i> , <i>PDPK1</i> , <i>STAT5A</i> , <i>TP53BP1</i> und <i>VEGFB</i> in Abhängigkeit der mRNA-Expression von <i>SMAD7</i>	40
Abbildung 10: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression der Gene <i>CASP7</i> , <i>CDC25A</i> , <i>MAP3K3</i> , <i>MAPK3</i> , <i>TP53BP1</i> und <i>VEGFB</i> verglichen mit der <i>SMAD7</i> -mRNA-Expression im eigenen Patientenkollektiv.	41
Abbildung 11: mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1, PANC-1.....	41
Abbildung 12: Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie BxPC-3 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.....	42

- Abbildung 13:** Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie CAPAN-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA..... 42
- Abbildung 14:** Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie PANC-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA..... 42
- Abbildung 15:** Darstellung der PCR-Ergebnisse der Gene *SMAD2*, *SMAD4* und *TGFBR1* in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA. 43
- Abbildung 16:** Einfluss des transienten Knockdowns von Smad7 auf die mRNA-Expression von *AKT1* und *RHOA* in den untersuchten PDAC-Zelllinien..... 43
- Abbildung 17:** Auswirkung der Smad7-siRNA auf die mRNA-Expression von *MAP3K3*, *PDPK1*, *TP53* und *TP53BP1* im Vergleich zur *SMAD7*-mRNA-Expression in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1. 44
- Abbildung 18:** Darstellung der Smad7-Expression nach Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf mRNA- und Proteinebene nach 30 min und 72 h..... 47
- Abbildung 19:** Darstellung der Smad4-Expression nach Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf mRNA- und Proteinebene nach 30 min und 72 h..... 47
- Abbildung 20:** Auswirkung der Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf die mRNA-Expression von *TGFBR1*. 47
- Abbildung 21:** Auswirkung der TGF- β 1-Stimulierung auf die mRNA-Expression von *AKT1* und *RHOA*. 48
- Abbildung 22:** Auswirkung der Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf die *VEGFB*-mRNA-Expression in der Zelllinie PANC-1..... 48
- Abbildung 23:** Auswirkung der TGF- β 1-Stimulierung auf die MAP-Signalkaskade in der Zelllinie PANC-1 auf mRNA- und Proteinebene. 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittels qRT-PCR untersuchte PDAC-Patientengewebe.	22
Tabelle 2: Ergebnisse der Immunhistochemie nach IRS.	36
Tabelle 3: Zusammenfassung der PDAC-Patientendaten des cBioPortals.	37
Tabelle 4: Relative Reduktion der Smad7-mRNA- und -Proteinexpression nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.	42
Tabelle 5: Relative Reduktion der mRNA-Expression der Gene <i>SMAD2</i> , <i>SMAD4</i> und <i>TGFBR1</i> des kanonischen TGF- β -Signalweges nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.	43
Tabelle 6: Relative Reduktion der mRNA-Expression der Gene <i>AKT1</i> und <i>RHOA</i> des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.	44
Tabelle 7: Relative Änderung der mRNA-Expression der <i>in silico</i> ermittelten Gene nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.	45
Tabelle 8: Relative Änderung der mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in der PDAC-Zelllinie PANC-1 30 Minuten nach Stimulation mit rekombinanten TGF- β 1.	46
Tabelle 9: Relative Änderung der mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in der PDAC-Zelllinie PANC-1 72 Stunden nach Stimulation mit TGF- β 1.	46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua monodest.	monodestilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BAMBI	Bone Morphogenic Protein and Activin Membrane-bound Inhibitor
BMP	Bone Morphogenic Proteins
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CA19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
Caspase	Cysteine-dependent Aspartate-specific Protease
cBioPortal	cBioPortal for Cancer Genomics
CDC	Cell Division Cycle
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-]1-propansulfonat
CKD	Cyclin-abhängige Kinase
Co-Smad	common mediator Smad
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nährmischung F-12 Ham
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECL	enhanced Chemoluminescence
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FAMMM	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom
FCS	fötales Kälberserum
FPC	familiäres Pankreaskarzinom
GADD34	Growth-arrest and DNA-damage-inducible Protein 34
GDF	Growth and Differentiation Factors

HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HDAC1	Histondeacetylase 1
HNPCC	hereditäres nicht-polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
Hsp90	heat shock protein 90
I-Smad	inhibitorisches Smad
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
IRS	immunoreaktiver Score
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LAP	Latency Associated Peptide
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin
LTBP	Latent TGF- β -binding Protein
<i>M</i>	Mittelwert
MAD	Mother Against Decapentaplegic
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MAP3K3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 3
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
MEK1/2	mitogen-activated protein kinase kinase family members 1/2
mFOLFIRINOX	modifiziertes FOLFIRINOX-Schema (Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin)
MH	mad homology
mRNA	Messenger-RNA
MSKCC	Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center
npG	nicht-pathologisch verändertes Gewebe
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDPK1	3-Phosphoinositide-dependent Kinase 1
PIGF	Placental Growth Factor
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PP1c	Proteinphosphatase 1c
pRB	Retinoblastom
PVDF	Polyvinylidifluorid

qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
R-Smad	rezeptor-reguliertes Smad
Ras	rat sarcoma
Rho	ras homologue
RHOA	ras homolog gene family member A
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RSEM	Erwartungs-Maximierungs-Algorithmus
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCR-siRNA	scrambled siRNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIK	salt-inducible kinase
siRNA	small interfering RNA
SMA	small body size
SMURF	SMAD ubiquitin regulatory factor
STAT-Proteine	Signal Transducers and Aktivators of Transcription-Proteine
STK 11	Serin-Threonin-Kinase 11
STRAP	Serin/Threonin Kinase Receptor-associated Protein
Tab.	Tabelle
TCGA	The Cancer Genom Atlas Program
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBS	TRIS-gepufferte Saline-Puffer
TBST	TRIS-gepufferte Saline mit Tween 20
TGF	Transforming Growth Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TGF- β R1	Transforming-Growth-Factor- β -Rezeptor-1
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TP53BP1	Tumor Suppressor p53-binding Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate
Ubch7	Ubiquitin-conjugating Enzyme 7
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFB	Vascular Endothelial Growth Factor B
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
YAP65	yes-associated protein 65

1 Einleitung

1.1 Das duktale Adenokarzinom des Pankreas

Mit 95 % ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) das am häufigsten auftretende Malignom der Bauchspeicheldrüse. Seltener ist das Auftreten von endokrinen Tumoren, zystischen Tumoren, azinären Tumoren oder anderen Entitäten. Obwohl in den letzten Jahrzehnten intensiv an der Pathogenese und Therapie des Pankreaskarzinoms geforscht wurde, fehlen nach wie vor valide Tumormarker und Therapiemöglichkeiten, die ein langfristiges und krankheitsfreies Überleben ermöglichen [1].

1.1.1 Epidemiologie

Maligne Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse sind mit circa 18.600 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2017 selten. Aufgrund der ungünstigen Prognose entsprechen Inzidenz und Mortalität einander nahezu. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Frauen 76 Jahre und bei Männern 72 Jahre [2]. Die altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberate zeigt seit den 1990er Jahren auch aufgrund der demographischen Entwicklung einen leichten Anstieg. Infolge unspezifischer Symptome wie Gewichtsverlust, Oberbauchschmerzen und Inappetenz wird das PDAC häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Daher betrug die relative 5-Jahres-Überlebensrate im Jahr 2017 bei beiden Geschlechtern lediglich 9 %. Damit ist das PDAC sowohl bei Frauen und als auch bei Männern die vierthäufigste karzinombedingte Todesursache [2].

1.1.2 Pathogenese und Karzinogenese

Das derzeitige Verständnis der Pathogenese des duktales Pankreaskarzinoms basiert auf einem Progressionsmodell, nach dem sequenzielle Akkumulationen genetischer Aberrationen zur Umwandlung duktales Epithelzellen über präkanzeröse Vorstufen, wie die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), in ein invasives und metastasierendes Karzinom führt [3]. Die Klassifikation der PanINs erfolgt in einem zweistufigen System in geringgradige (low grade, ehemals PanIN 1A, 1B, 2) sowie hochgradige PanIN (high grade PanIN, ehemals PanIN 3), die durch eine Anhäufung genetischer Mutationen und morphologischer Veränderungen charakterisiert sind [4]. Das high grade PanIN stellt ein Carcinoma in situ dar [4]. Als weitere präkanzeröse Läsionen des invasiven pankreatischen duktales Adenokarzinoms gelten die muzinös-zystische Neoplasie (MCN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) [3]. Häufige bekannte

Mutationen betreffen das KRAS-(*Kirsten Rat Sarcoma*-)Onkogen, sowie *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* und andere Tumorsuppressorgene [5]. Die TGF- β -Signalkaskade unterliegt ebenfalls Veränderungen, die zu einem Verlust der antiproliferativen Wirkung von TGF- β sowie zur Überexpression aller drei TGF- β -Isoformen führen [6].

1.1.3 Risikofaktoren

Bei 10 % der an einem PDAC erkrankten Patienten liegt eine familiäre Vorbelastung mit Pankreastumoren vor, z. B. im Rahmen eines familiären Pankreaskarzinoms (FPC) [7]. Verschiedene hereditäre Syndrome erhöhen das Risiko, an einem Pankreastumor zu erkranken, teilweise erheblich. Dazu gehört das Peutz-Jeghers-Syndrom, bei dem eine Mutation der Serin-Threonin-Kinase (STK) 11 zu einem 132-fach erhöhten Risiko führt, an einem PDAC zu erkranken [8]. Weitere hereditäre Syndrome, die mit einer erhöhten Inzidenz von Pankreaskarzinomen einhergehen, sind das hereditäre nicht-polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) und das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom (FAMMM) [9]. Auch Keimbahnmutationen verschiedener Gene, darunter *BRCA1*, *BRCA2* und *PALB-2*, erhöhen ebenfalls das Risiko an einem PDAC zu erkranken [9]. Ein weiterer gesicherter Risikofaktor ist die chronische Pankreatitis (CP). Hierzu gehört zum einen die hereditäre CP mit Mutationen z. B. des *PRSS1*-Gens oder des *CTFR*-Gens bei zystischer Fibrose, zum anderen die mit starkem Alkoholabusus assoziierte CP [10,11]. Unter den modifizierbaren Risikofaktoren gelten vor allem aktives und passives Rauchen, starkes Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 als gesichert [12]. Auch die Exposition gegenüber Pestiziden, Fungiziden und Herbiziden wird als möglicher Risikofaktor diskutiert [13].

1.1.4 Klinik

Das Pankreaskarzinom ist durch das Fehlen spezifischer Frühsymptome gekennzeichnet. Unspezifische Beschwerden, wie epigastrische Schmerzen, Appetitlosigkeit, Völlegefühl und Gewichtsverlust treten erst im fortgeschrittenen Stadium auf. Tumoren im Bereich des Pankreaskopfes können zu einem Verschlussikterus mit einer tastbar vergrößerten Gallenblase (Courvoisier-Zeichen) führen. Die Metastasierung kann unter anderem zum Auftreten von Knochenschmerzen bei Skelettmetastasen sowie zu Husten und Dyspnoe bei Lungenmetastasen führen. Im Rahmen einer Lebermetastasierung kann es zu Leberinsuffizienz, Ikterus und Aszites kommen [14].

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik sollte gemäß den Empfehlungen der S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ in der Fassung von 2021 erfolgen, die als Erstdiagnostik bei neu aufgetretenen Symptomen und Verdacht auf ein Pankreaskarzinom, die Anamnese und körperliche Untersuchung empfiehlt. Als bildgebende Verfahren werden die Sonographie des Abdomens als Methode der ersten Wahl und bei unklaren Befunden eine Computertomographie (CT) des Abdomens mit Kontrastmittel zur Primärdiagnostik empfohlen. Vor einer geplanten Operation sollte eine CT des Oberbauches und des Thorax sowie eine Endosonographie der Pankreasregion als Ausbreitungsdiagnostik durchgeführt werden. Zusätzlich wird eine Magnetresonanztomographie der Leber mit Diffusionswichtung empfohlen, um eventuell vorhandene, aber in der CT des Abdomens nicht diagnostizierte Lebermetastasen zu identifizieren. Ergänzend sollte vor einer geplanten Operation eine Bestimmung der Tumormarker CA19-9 (Carbohydrat-Antigen 19-9) und CEA (Carcinoembryonales Antigen) im peripheren Blut für ein späteres Follow-up durchgeführt werden. Aufgrund der mangelnden Spezifität der Tumormarker für das Pankreaskarzinom sind diese für ein Screening nicht geeignet [15]. Die Klassifikation des Pankreaskarzinoms erfolgt gemäß den TNM-Kriterien und der Stadieneinteilung der 8. Auflage der *Union for International Cancer Control* (UICC) [16].

1.1.6 Therapie

Aufgrund der unspezifischen Symptome des Pankreaskarzinoms weisen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nur 15 – 20 Prozent der Patienten einen resektablen Tumor auf. Bei der Mehrzahl der Patienten (60 – 70 %) liegt dagegen eine primär metastasierte Erkrankung vor [17]. Die Therapie umfasst im Rahmen eines kurativen Ansatzes die radikale chirurgische Resektion mit dem Ziel einer R0-Resektion [15].

Zu den operativen Möglichkeiten für Patienten mit Pankreaskopfkarzinom gehören die partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple-Kausch sowie die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso-Longmire [18]. Bei weiterer Ausdehnung des Karzinoms in Richtung des Pankreaskorpus kann eine totale Pankreatektomie notwendig sein [19]. Tumoren im Bereich des Pankreaskorpus werden mittels einer totalen Duodenopankreatektomie oder einer subtotalen Pankreaslinksresektion behandelt [20]. Letztere kann bei Tumoren im Pankreasschwanz um eine Splenektomie erweitert werden [21]. Die Rate der R0-Resektionen schwankt zwischen < 20 und > 80 %, was u. a. auf eine unzureichend standardisierte histopathologische Klassifikation zurückzuführen ist [22]. Eine adjuvante Chemotherapie ist nach erfolgter R0- bis R1-Resektion indiziert und verlängert das krankheitsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben [23]. Hierfür stehen in

Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten verschiedene Therapieprotokolle zur Verfügung. Bei Patienten mit einem sehr gutem Allgemeinzustand (*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) 0 – 1) kann ein modifiziertes FOLFIRINOX-Schema (mFOLFIRINOX), bestehend aus Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin, eingesetzt werden [24]. Als eine therapeutische Alternative kann eine Monotherapie mit Gemcitabin oder eine Chemotherapie mit 5-Fluoruracil/Folinsäure bei Patienten mit einem schlechteren Allgemeinzustand (ECOG \geq 2) oder Kontraindikationen gegen eine Therapie mit mFOLFIRINOX durchgeführt werden [25]. Auch beim lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom sollte nach neoadjuvanter Therapie eine Resektion als Therapieziel angestrebt werden. Bei Vorliegen von Fernmetastasen oder eines inoperablen Tumors führt eine Chemotherapie mit Gemcitabin zu einer Verlängerung der Überlebenszeit und einer Verbesserung der Lebensqualität [26].

1.1.7 Prognose

Bei Patienten mit einem PDAC beträgt das mediane Überleben nach einer Operation mit R0-Resektion ca. 19 Monate, nach R1-Resektion vermindert sich dieses auf ca. 14 Monate [27]. Postoperativ liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 10 – 20 % [28]. Der Lymphknotenstatus ist neben dem Resektionsstatus und dem Staging einer der wichtigsten Prognoseparameter [29].

1.2 Der Transforming Growth Factor β

Das multifunktionelle Zytokin *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) besitzt vielfältige Funktionen im Rahmen der Embryonalentwicklung, der Differenzierung und Adhärenz von Geweben und Zellen sowie in der Zellmotilität und Apoptose [30].

Die TGF- β -Familie besteht bei Säugetieren aus drei verschiedenen Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 [31]. In TGF- β -Knockout-Mäusen konnten verschiedene Funktionen dieser Zytokine nachgewiesen werden, so spielt TGF- β 1 eine wichtige Rolle bei fibrotischen Erkrankungen. Weiterhin wurde in TGF- β 1-Knockout-Mäusen eine starke Immundefizienz beobachtet [32]. Als weiteres Zytokin der TGF- β -Familie spielt TGF- β 2 eine wichtige Rolle in der kardialen, pulmonalen und urogenitalen Organogenese [33]. TGF- β 3 ist bedeutsam für die Lungenentwicklung und zur Verhinderung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten [34,35]. Alle TGF- β -Isoformen sind hoch konserviert und bis auf wenige bereits erwähnte Ausnahmen in ihrer Wirkung ähnlich [36]. Darüber hinaus sind derzeit mehr als vierzig weitere Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie mit ähnlicher Struktur bekannt [37]. Hierzu zählen u. a. die *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*Growth and Differentiation Factors*, GDF), Activine sowie Inactivine [30].

1.2.1 Funktionen des Transforming Growth Factor β

TGF- β spielt, mit seinen zum Teil gegensätzlichen Funktionen, in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle [38]. Die erste Beschreibung erfolgte durch Roberts et al. 1981, die eine TGF- β -abhängige Stimulation von Fibroblasten während des Nierenwachstums in der Embryogenese nachweisen konnten [39]. TGF- β hat auch einen wichtigen Einfluss auf andere Entwicklungen in dieser Phase. Dies zeigte sich anhand von TGF- β -Knockout-Mäusen, die aufgrund schwerwiegender kardialer und pulmonaler Inflamationsprozesse früh verstarben [40]. Ebenfalls fördert TGF- β durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen die Zellproliferation und -differenzierung von mesenchymalen Stammzellen [41]. Die Sekretion des Zytokins erfolgt abhängig vom Stadium der Embryogenese sowie der Zelldifferenzierung [42,43]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TGF- β eine zentrale Rolle bei der Wundheilung durch Fibroblasten-induzierte Kollagensynthese und Neoangiogenese spielt [44]. TGF- β hat zudem einen wichtigen Einfluss auf die Funktion und Homöostase des Immunsystems durch Hemmung der T-Zellproliferation und Förderung der T-Zell-Differenzierung sowie der T-Zelltoleranz [45]. Als Inhibitor der Zellproliferation ist TGF- β außerdem ein wirksamer Tumorsuppressor, kann jedoch durch Anpassungsprozesse der Zellen während der Tumorgenese auch zur Wachstumsförderung und Verminderung der Immunabwehr beitragen [46,47].

1.2.2 Aktivierung des Transforming Growth Factor β

TGF- β wird in fast allen Zellen als biologisch inaktives Vorläuferprotein, bestehend aus dem Zytokin und einer Prodomäne, gebildet [48]. Nach Spaltung des Prodomänen-Zytokin-Komplexes im Golgi-Apparat erfolgt die Sekretion in den Extrazellulärraum [48]. Dort kann zwischen dem freiem TGF- β als aktive Form und dem inaktivem TGF- β , welches an das *Latency Associated Peptide* (LAP) gebunden ist und somit den *small inactive complex* bildet, unterschieden werden [49]. In der extrazellulären Matrix ist der *small inactive complex* an das *Latent TGF- β -binding Protein* (LTBP) gebunden, welches für die Sekretion und Speicherung von TGF- β notwendig ist [50]. Die Aktivierung des LAP-gebundenen TGF- β erfolgt über verschiedene Mechanismen. So sind verschiedene Proteasen der Extrazellulärmembran wie Integrin, Plasmin und Thrombospondin in der Lage das LAP abzuspalten [51–53].

1.2.3 Smad-Proteine als intrazelluläre Signalmoleküle des TGF- β -Signalweges

Die Smad-Proteine stellen als Transkriptionsfaktoren die Signalmediatoren des TGF- β -Signalweges dar. Diese intrazellulären Proteine wurden erstmals in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und als *Mother Against Decapentaplegic* (MAD)

bezeichnet [54]. Zusammen mit der Genbezeichnung des Proteins *small body size* (SMA) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* resultierte die Bezeichnung *Smad* [55]. Bei Vertebraten wurden bisher neun verschiedene Smad-Proteine beschrieben, die ubiquitär in embryonalen und adulten Zellen exprimiert werden [56,57]. Aufgrund ihrer Rezeptorspezifität sind jedoch nicht alle Smad-Proteine an der zytoplasmatischen Signaltransduktion von TGF- β beteiligt [58].

Die Smad-Proteine werden nach ihrer Funktion in drei verschiedene Klassen unterteilt. Zur Klasse der rezeptorregulierten Smads (R-Smads) gehören Smad2 und Smad3, die direkt vom Transforming-Growth-Factor- β -Rezeptor 1 (TGF- β R1) phosphoryliert und aktiviert werden. Eine weitere Klasse bildet das *common mediator Smad4* (Co-Smad4), das mit den aktivierten R-Smads am TGF- β R1 einen Komplex bildet. Die dritte Klasse umfasst die inhibitorischen Smads 6 und 7 (I-Smads 6 und 7) [59]. Diese sind in der Lage die TGF- β -Signalkaskade durch eine kompetitive Verdrängung der Co-Smads aus dem Smad-Komplex zu unterbrechen [60]. Weitere Inhibitionsmechanismen sind die Hemmung der R-Smad-Phosphorylierung sowie eine direkte Interaktion der I-Smads mit dem TGF- β R1 [60,61]. Die Aktivierung der inhibitorischen Smads erfolgt im Sinne einer negativen Rückkopplung bei Aktivierung der TGF- β -Signalkaskade. Darüber hinaus sind auch andere Wachstumsfaktoren wie Interferon- γ und NF- κ B in der Lage, die I-Smads zu aktivieren [62,63].

Die Smad-abhängige Transduktion des TGF- β -Signals erfolgt durch die Bindung von TGF- β an den TGF- β -Rezeptor 2, was zur Bildung eines transmembranären Komplexes mit dem TGF- β -Rezeptor 1 und dessen intrazellulärem katalytischen Zentrum führt [60]. Anschließend erfolgt die Aktivierung der R-Smads Smad2 und Smad3 durch den TGF- β R1 mittels Phosphorylierung. Daraufhin erfolgt die Bindung von Smad4 an die R-Smads und die Translokation des heteromeren Komplexes in den Nukleus. Dort wird die Transkription der TGF- β -spezifischen Zielgene initiiert [64].

Neben TGF- β können auch andere Kinasen wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinasen) und die Proteinkinase C (PKC) die Smad-Proteine durch eine Phosphorylierung aktivieren [65,66]. Diese Phosphorylierung findet an der *mad homology 2*-(MH2)-Domäne des C-terminalen Endes der Proteine statt, welche die Aktivierungsdomäne der inaktiven Smads darstellt [67]. Als funktionelle Einheit der Smads ermöglicht die N-terminal lokalisierte MH1-Domäne die Translokation der Proteine in den Nukleus und die Bindung an verschiedene Transkriptionsfaktoren [68]. Zwischen der MH1- und der MH2-Domäne befindet sich die so genannte „Linker“-Region, die eine MAP-Kinase enthält. Diese kann die Akkumulation der Smads im Nukleus durch Phosphorylierung inhibieren [69].

1.2.4 Smad-unabhängige Signaltransduktion von TGF- β

Der aktivierte TGF- β -Rezeptorkomplex kann parallel zum Smad-abhängigen (kanonischen) TGF β -Signalweg auch direkt mit anderen Signalmolekülen interagieren und so auch Smad-unabhängig (nicht-kanonisch) TGF β -Signale weiterleiten [70,71]. Zu diesen nicht-kanonischen Signalwegen gehören u. a. die MAPK- und die *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK-) Signalkaskade sowie die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und die Rho-(*ras homologue*-)GTPasen [72,73].

Zwei Zielgene des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges wurden im Rahmen dieser Arbeit *in silico* analysiert. Dazu gehört zum einen die Rho-GTPase RHOA (*ras homolog gene family member A*). Diese übt wichtige Funktionen unter anderem in der Regulation der Zellteilung, Zelladhäsion und Zellmigration sowie in der Onkogenese aus [74]. Zum anderen wurde die Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase B (PKB) analysiert. Bei der untersuchten Unterform handelt es sich um AKT1 (PKB α). Diese reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Zellwachstum und Zelltod [75].

1.2.5 Rolle von TGF- β in der Karzinogenese

TGF- β spielt nicht nur bei physiologischen Prozessen, sondern auch bei der Entstehung von Karzinomen eine wichtige Rolle. Das komplexe Verhalten von TGF- β in Karzinomen wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt. So kann TGF- β in Abhängigkeit vom Stadium der Karzinogenese einerseits als Tumorsuppressor und andererseits als Onkogen wirken [76]. Die tumorsupprimierende Wirkung von TGF- β zeigt sich in unter anderem in einem antiproliferativen Effekt auf Epithelzellen sowie in einer Verminderung des Tumorwachstums und einer Induktion der Apoptose durch die Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) [77,78]. Weiterhin konnte eine Verminderung der Expression des Proto-Onkogens *c-myc* durch TGF- β nachgewiesen werden [79]. Mutationen in der TGF- β -Signalkaskade einschließlich der Smads führen zu einer onkogenen Wirkung von TGF- β , die bei einer Vielzahl von Karzinomen mit einem verstärktem Tumorwachstum und Metastasierung einhergeht [80]. Auch scheint TGF- β in der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) als Voraussetzung für die Migration von Tumorzellen und die Metastasierung eines Karzinoms eine zentrale Rolle zu spielen [81,82]. Des Weiteren kann TGF- β die Neoangiogenese von Tumoren fördern, indem es die Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aus Endothelzellen induziert, wodurch Epithelzellen zur Invasion und Migration angeregt werden [83]. Darüber hinaus unterstützt TGF- β die Tumorprogression durch eine Hemmung der spezifischen Immunantwort in Form einer Inhibition von Neutrophilen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen [47,84,85]. In Abhängigkeit vom Stadium der

Karzinogenese kann TGF- β somit über autokrine und parakrine Metabolite sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromotor wirken [86,87].

1.2.6 Rolle von TGF- β in der Karzinogenese des PDAC

Bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte eine Expression von TGF- β und TGF- β -Rezeptoren sowohl in Karzinomzellen als auch in Stromazellen nachgewiesen werden [88]. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der TGF- β -Expression, dem Tumorstadium sowie einer verminderten Überlebenszeit festgestellt werden [6]. In-vitro-Experimente konnten zudem einen Anstieg der VEGF- und TGF- β 1-Konzentrationen in Tumorzellen nach Stimulation mit TGF- β 1 zeigen [89].

1.3 Das inhibitorische Smad7

Das auf Chromosom 18 lokalisierte inhibitorische Smad7 wurde zuerst in Endothelzellen als TGF- β -Suppressor nachgewiesen und spielt durch die Inhibition der TGF- β -Signalkaskade eine zentrale Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [90].

1.3.1 Aufbau und strukturelle Besonderheiten von Smad7

Wie die anderen Smads besitzt auch Smad7 eine MH2-Domäne, über welche die Bindung des Smads an den TGF- β R1 sowie an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Nukleus erfolgt [91]. Im Gegensatz zu den R-Smads fehlt hier jedoch das C-terminal lokalisierte Ser-Ser-Val/Met-Ser-(SSXS-)Motiv, als Ziel der Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung, wodurch Smad7 ein negativer Regulator des TGF- β -Signalweges darstellt [60]. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Smad-Familie ist die MH1-Domäne von Smad7 am N-terminalen Ende stark verkürzt und hat daher nur wenig Ähnlichkeit mit den MH1-Domänen der R-Smads [92]. Über dieses N-terminale Ende kann eine Bindung an die MH2-Domäne eines weiteren Smad7-Proteins erfolgen, wodurch der inhibitorische Effekt des Smad7/MH2-Komplexes am TGF- β R1 verstärkt wird [92]. Des Weiteren besitzt Smad7 im Gegensatz zu den anderen Smads ein PY-Motiv in seiner Linker-Region, über das eine Assoziation mit den WW-Proteindomänen des Smurf-Proteins stattfindet und eine Ubiquitinierung sowie eine Translokation von Smad7 in das Zytoplasma ermöglicht wird [93,94].

1.3.2 Funktionen und Interaktionen von Smad7

Als Antagonist des TGF- β -Signalweges ist Smad7 in der Lage die TGF- β -Signaltransduktion zu beenden. Dies geschieht vor allem über den TGF- β R1, der als integraler Bestandteil des kanonischen Signalweges das Hauptziel des

inhibitorischen Smad7 zur Unterbrechung der TGF- β -Signalkaskade darstellt [50,95]. So erfolgt nach Stimulation der Zelle mit TGF- β zunächst die Translokation von Smad7 aus dem Nukleus in das Zytoplasma. Durch die Bindung von Smad7 als Pseudosubstrat an den TGF- β R1 wird die weitere Bindung und Phosphorylierung von R-Smads und damit die Signaltransduktion von TGF- β unterbunden [96]. Die Bindung von Smad7 an den Smad2/3-Komplex verhindert dessen Interaktion mit dem TGF- β R1 und damit die weitere intrazelluläre Signalkaskade [97]. Über die Phosphatasen GADD34 (*Growth-arrest and DNA-damage-inducible Protein 34*) und PP1c (Proteinphosphatase 1c) kann Smad7 die TGF- β R1-Aktivität vermindern [98]. Weitere Proteine, die mit Smad7 interagieren und die Aktivität des TGF- β R1 reduzieren, sind unter anderem STRAP (*Serin/Threonin Kinase Receptor-associated Protein*), SIK (*salt-inducible kinase*) und YAP65 (*yes-associated protein 65*) [95,99,100]. Smad7 ist in der Lage, einen Tertiärkomplex mit dem *Bone Morphogenic Protein and Activin Membrane-bound Inhibitor* (BAMBI) und dem TGF- β R1 zu bilden und so die Interaktion und Phosphorylierung zwischen dem TGF- β R1 und Smad3 zu beeinträchtigen [101]. Des Weiteren führt die Aktivierung der TGF- β -Signalkaskade zu einer Interaktion von Smad7 mit der E3-Ubiquitinligase Smurf1/2 im Nukleus [102]. Anschließend transloziert dieser Smurf2/Smad7-Komplex in das Zytoplasma, wo er an den aktivierten TGF- β R1 bindet und zu dessen Proteolyse führt [94,103]. Dieser Prozess wird durch verschiedene Proteine wie dem *heat shock protein 90* (Hsp90) und dem *E2-conjugating enzyme UbcH7* (Ubiquitin-conjugating Enzyme 7) eingeleitet [104,105]. Darüber hinaus ist Smad7 in der Lage das TGF- β -Signal direkt im Nukleus zu inhibieren. Dabei bindet Smad7, im Gegensatz zu den anderen Smads, über die MH2-Domäne an die DNA-Bindungsdomäne des *Plasminogen Activator Inhibitor* (PAI-)1 und verhindert so die Bindung der aktivierten Smads an die DNA [106].

Neben der Rolle als Antagonist des TGF- β -Signalweges scheint Smad7 noch weitere Funktionen auszuüben. So kann es den activin-induzierten Wachstumsstillstand der Zelle inhibieren und damit die Apoptose arretieren [107]. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien eine Induktion der Apoptose durch Smad7, indem es die Translokation von NF- κ B in den Nukleus hemmt [108]. Eine Modulation der Genexpression der Histondeacetylase 1 (HDAC1) und E2F durch Smad7 mit konsekutiver Veränderung des Zellzyklus wurde ebenfalls beschrieben [109]. Die Induktion von Smad7 kann nicht nur durch TGF- β , sondern auch durch andere Zytokine, darunter NF- κ B/RelA und Interferon- γ , erfolgen [62].

1.3.3 Konträre Funktionen von Smad7 im PDAC

Neben seiner Funktion als Antagonist des TGF- β -Signalweges spielt Smad7 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung verschiedener Karzinome. Jedoch divergieren die Studienergebnisse teilweise stark. So zeigte sich eine Assoziation zwischen einer erhöhten Smad7-Expression und einem verminderten Überleben beim Endometrium-, Ösophagus-, kolorektalen-, Magen-, Mamma-, Haut- und hepatozellulären Karzinom [97]. Weiterhin konnte in hepatozellulären Karzinomzelllinien eine verminderte TGF- β -assoziierte EMT und Migration sowie eine längere Überlebenszeit dieser Patienten bei niedrigen Smad7-Expressionsspiegeln nachgewiesen werden [110]. In Prostatakarzinomzelllinien wurde eine verstärkte Smad7-assoziierte Migration der Karzinomzellen beobachtet, während andere Studien eine wichtige Rolle von Smad7 in der TGF- β -induzierten Apoptose postulierten [111,112].

Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte eine Resistenz gegenüber der TGF- β -induzierten Proliferationshemmung und eine konsekutiv gesteigerte Tumorgenität bei erhöhter Smad7-Expression nachgewiesen werden [113]. Zudem führte eine pankreas-spezifische Expression von Smad7 im transgenen Mäusemodell zu duktalem Veränderungen, die einer pankreatischen intraepithelialen Neoplasie ähnelten [114]. Einige Studien konnten eine Modulation von Thioredoxin 1 sowie des Retinoblastom-Proteins durch Smad7 und ein damit einhergehendes gesteigertes Tumorwachstum nachweisen [115,116]. Allerdings konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Lymphknotenmetastasierung und einer schlechteren Prognose bei niedrigen Smad7-Spiegeln im PDAC gezeigt werden [117]. Somit scheint Smad7 eine bedeutende Rolle im PDAC zu spielen, deren Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist.

1.4 Ermittelte Gene in der in-silico-Analyse

Im Rahmen der in-silico-Analyse zeigten die Gene *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* und *VEGFB* eine signifikante Korrelation ihrer mRNA-Expression mit der Expression von *SMAD7* und werden daher an dieser Stelle näher beschrieben.

Die Cystein-Aspartat-Protease Caspase 7 wird durch das Gen *CASP7* kodiert und gehört zusammen mit den Caspasen 3 und 6 zu den Effektor-Caspasen. Nach ihrer Aktivierung durch eine proteolytische Spaltung dient Caspase 7 der Steuerung der Zellapoptose [118].

Die Proteinphosphatase *Cell Division Cycle 25A* (Cdc25A) gehört zur Familie der Cdc25-Phosphasen. Durch die Dephosphorylierung der Cyclin-abhängigen Kinase 2 reguliert Cdc25A den Übergang der Zellteilung von der S-Phase in die G1-Phase [119]. Der Transkriptionsfaktor E2F8 gehört zur Familie der E2F-Proteine, die als Downstream-Effektoren des Retinoblastom-(pRB-)Signalweges dienen, über den sie verschiedene Funktionen im Rahmen der Replikation, Zelldifferenzierung, DNA-Reparatur und Apoptose ausüben [120].

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) sind dreistufige, hochkonservierte Serin/Threonin-Proteinkinase [121]. Die Signaltransduktion beginnt nach Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) in der Zellmembran. Hierdurch aktiviert die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAP3K) durch Phosphorylierung die MAP2K (MAP-Kinase-Kinase), welche die Effektor kinase MAP-Kinase aktiviert [122]. Letztere wird in drei Gruppen unterteilt, zu denen die p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase, die JNK und die ERKs gehören [123]. Durch diese Phosphorylierungskaskade werden Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert, welche vielfältige Zellprozesse wie Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose regulieren [121].

Die *3-Phosphoinositide-dependent Kinase 1* (PDK1) aktiviert als Serin/Threonin-Kinase die Proteinkinase PKB α und ist damit ein Schlüsselenzym in zahlreichen zellulären Regulationsprozessen, dem Zellüberleben und der Zellzykluskontrolle [124]. STAT5a gehört zur Familie der *Signal Transducers and Activators of Transcription Proteins* (STAT-Proteine), die als Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion verschiedener Zytokine spielen [125]. STAT5a dient dabei unter anderem der Signalübertragung von Interleukin-2, -7, -9 und -15 in den Zellkern [126]. Somit reguliert das STAT5a-Protein eine Vielzahl physiologischer Zellfunktionen wie Proliferation und Differenzierung [127]. Zudem wurden für die STAT-Proteinfamilie eine wichtige Funktion bei der Krebsentstehung und -progression, Metastasierung sowie der Resistenz gegenüber onkologischen Therapien nachgewiesen [128].

Das Protein *Tumor Suppressor p53-binding Protein* (TP53BP1) wird durch das *TP53BP1*-Gen kodiert und besitzt verschiedene Funktionen in der DNA-Schadensantwort sowie in der Regulation des Zellzyklus [129]. Durch die Bindung von TP53BP1 an die zentrale Domäne des Tumorsuppressorproteins TP53 wird die transkriptionelle Aktivierung proapoptotischer Gene verstärkt [130]. Als Transkriptionsfaktor induziert p53 verschiedene Gene, die unterschiedliche zelluläre Regulationsprozesse wie Apoptose, Zellzyklusarrest, Seneszenz und DNA-Reparatur steuern [131,132]. In malignen Tumoren ist p53 das am häufigsten durch eine Loss-of-function-Mutation inaktivierte Protein [133].

Der Wachstumsfaktor *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) spielt eine zentrale Rolle als Aktivator der Endothelzellproliferation und damit der Neoangiogenese sowie des Tumorwachstums [134]. Die VEGF-Familie umfasst neben VEGF-B fünf weitere Isoformen (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und *Placental Growth Factor* [PlGF]) [135]. VEGF-B dient vor allem dem Überleben von Gefäßzellen [136].

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Dissertation war es, den Einfluss von Smad7 auf den TGF- β -Signalweg sowie auf weitere Gene und Signalkaskaden im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die Smad7-Expression im eigenen Patientenkollektiv analysiert. Anschließend wurde eine in-silico-Analyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie mit Hilfe des cBioPortals durchgeführt, um den Einfluss von Smad7 auf weitere Gene zu untersuchen. Schließlich wurde der Effekt eines Smad7-Knockdowns durch RNA-Interferenz auf etablierte PDAC-Zelllinien analysiert.

Bei diesen Untersuchungen waren folgende Fragen von besonderer Bedeutung:

Wie unterscheidet sich die Expression von Smad7 im PDAC-Gewebe im Vergleich zu Gewebe mit chronischer Pankreatitis und nicht-pathologisch verändertem Pankreasgewebe?

Ist es möglich, in-vitro-Untersuchungen mit Hilfe von in-silico-Analysen vorzubereiten?

Kann durch die in-silico-Analyse eine mit *SMAD7* korrelierende mRNA-Expression mit anderen Genen nachgewiesen werden?

Wie wird Smad7 in humanen PDAC-Zelllinien exprimiert?

Welche Auswirkungen hat ein Smad7-Knockdown durch siRNA auf den kanonischen und nicht-kanonischen TGF- β -Signalweg im duktalem Adenokarzinom des Pankreas?

Kann durch ein Smad7-Knockdown eine Veränderung der Genexpression der *in silico* identifizierten Gene in humanen PDAC-Zelllinien erzielt werden?

Welche Folgen hat eine Stimulation mit rekombinatem TGF- β 1 auf die TGF- β -Signalkaskade in der PDAC-Zelllinie PANC-1?

Lassen die gewonnenen Daten Rückschlüsse auf die Rolle von Smad7 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel

3.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
0,05 %ige Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, Schottland
1,4-Dithiothreit (DTT) 0,1 M	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
1,4-Dithiothreit (DTT) 1,0 M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
25 %ige Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antibiotikum (10000 Units/mL Penicillin, 10000 µg/mL Streptomycin)	Gibco, Grand Island, USA
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	HoneyWell, Seelze, Deutschland
DEPC-Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM/F-12	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ECL™ Rainbow™ Marker-Full range	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, England
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Entellan® new	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut > 99,8 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FCS	Gibco, Paisley, Schottland
Formaldehyd (ROTI®Histofix 4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HBSS	Gibco, Grand Island, USA
humanes rekombinantes TGF- β 1	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
IPG Buffer, pH 3 – 10	GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Schweden
Magermilchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OPTI-MEM™	Gibco, Grand Island, USA
Pharmalyte™ 3 – 10 for IEF	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Phosphat Buffered Saline	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RNase-freies Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Histol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ROTIPHORESE®NF-Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
TEMED	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Transfektionsmedium (sc-36868)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Transfektionsreagenz (sc-29528)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
TRIZOL® Reagent	Ambion/Invitrogen, Carlsbad, USA
TWEEN	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

U0126	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Urea	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, England
Wasser, steril, RNAase-DNAse-frei	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Geräte

Name	Hersteller
Axiocam® Digitalkamera	Carl Zeiss AG Deutschland GmbH, Jena, Deutschland
Axioplan 2® Mikroskop-System	Carl Zeiss AG Deutschland GmbH, Jena, Deutschland
Biometra Thermozykler T3	Carl Zeiss AG Deutschland GmbH, Jena, Deutschland
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CO ₂ -Inkubator APT-line™ CB	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Feinwaage AX124/E	Ohaus Europe, Greifensee, Schweiz
Kühlsystem WK230 LAUDA	Boehringer, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MR 3003 GD	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikrowelle, Mikromat	AEG, Nürnberg, Deutschland
Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld, Deutschland
pH-Meter	inoLab, Weilheim, Deutschland
Pipette Pipetus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinraumbank HS 12	Heraeus Instruments, Gera, Deutschland
Real-time Cycler Rotor-Gene Q	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Spektrophotometer UV-1602	SHIMADZU EUROPA, Kyoto, Japan

Thermozykler ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot R	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortexmischer VORTEX 2	IKA Laboratory Equipment, Deutschland
Waage LSP-4202	VWR International, Löwen, Brüssel
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Multifuge X3R	Heraeus Instruments, Gera, Deutschland

3.1.3 Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Einmal-Küvetten 1,5 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Einweg-Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebekulturplatten (6-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
PCR Strip Tubes	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
PVDF-Transfermembran (0,45 µm)	GE Healthcare, München, Deutschland
Whatman Blotting Papier	GE Healthcare, München, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.4 Verwendete Kits

Name	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] qPCR Mix Plus (ROX)	Solis BioDyne, Tartu, Estland

REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako, Glostrup, Dänemark
RT ² SYBR® Green ROX™ qPCR Mastermix	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
SuperScript™ II First-Strand Synthesis System	Invitrogen AG, Carlsbad, USA
WesternBright™ ECL-Lösung	Advansta, Mendio Park, USA

3.1.5 Primer

Primer		Sequenz (5'-3')	Basenpaarlänge
18S	Forward	GTAACCCGTTGAACCCATT	151
	Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	
AKT1	Forward	CAG GAT GTG GAC CAA CGT GA	137
	Reverse	AAG GTG CGT TCG ATG ACA GT	
CASP7	Forward	GAG CAC GGA AAA GAC CTG GA	137
	Reverse	GTG AGC ATG GAG ACC ACA CA	
CDC25A	Forward	GGC AAG CGT GTC ATT GTT GT	127
	Reverse	ACA GCT CAG GGT AGT GGA GT	
E2F8	Forward	ACG GGC GAC ACA ATC TCA AC	72
	Reverse	GCT CGG CGT ACT TAT TCT CCT	
MAP3K3	Forward	CGA TCT GTA TGT CGG GGA CG	109
	Reverse	CTC CAC ACG TCT GCT TTC CT	
MAPK3	Forward	ACT CCA AAG CCC TTG ACC TG	114
	Reverse	CCG TCG GGT CAT AGT ACT GC	
P38	Forward	GCA TAA TGG CCG AGC TGT TG	130
	Reverse	TCA TGG CTT GGC ATC CTG TT	
PDPK1	Forward	CAT GCA GGT GTC TTC GTC CT	81
	Reverse	ATG TTG CTG CCT GAC CTC TG	
RHOA	Forward	GAG CCG GTG AAA CCT GAA GA	146
	Reverse	TTC CCA CGT CTA GCT TGC AG	
SMAD2	Forward	GTC CAT CTT GCC ATT CAC GC	106
	Reverse	TTC CTG CCC ATT CTG CTC TC	
SMAD4	Forward	CCA GCT CTG TTA GCC CCA TC	91
	Reverse	TAC TGG CAG GCT GAC TTG TG	
SMAD7	Forward	CCC CAT CAC CTT AGC CGA C	95
	Reverse	GGA CAG TCT GCA GTT GGT TTG	
STAT5A	Forward	ATT CAC CAC GCG GGA TTT CT	136
	Reverse	AGCTTTAGCCAGCACAGGAG	

TP53	Forward	CGC TTC GAG ATG TTC CGA GA	102
	Reverse	CTT CAG GTG GCT GGA GTG AG	
TP53BP1	Forward	AAA TCC TTC AGC CGT GTC GT	85
	Reverse	AGT CAC TAC GAC GCA AAG CA	
VEGFB		keine Angaben durch den Hersteller	k. A.
β-Aktin	Forward	AGG CAC CAG GGC GTG AT	51
	Reverse	GCC CAC ATA GGA ATC CTTCTGAC	

3.1.6 Antikörper

Bezeichnung	Konjunktat	Konzentration	Blockierungspuffer	Hersteller
Akt	Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10000	TBST	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:10000	TBST	Santa Cruz Biotechnology
p44/42 MAPK	Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt	Kaninchen	1:2000	5 % BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK	Kaninchen	1:2000	5 % BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Smad2/3	Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBST	Cell Signaling Technology
Smad4	Kaninchen	1:500	5 % Milchpulver in TBST	Cell Signaling Technology
Smad7	Maus	1:500	5 % Milch in PSB	R&D Systems
β-Aktin	Maus	1: 1000	TBST	Sigma-Aldrich

3.1.7 Lösungen und Puffer

Name	Bestandteile
Blockierungspuffer I	5 % Milchpulver in TBST
Blockierungspuffer II	5 % BSA in TBST
Ladepuffer	2,4 ml 1 M TRIS pH 6,8 0,8 g SDS 4 ml 87 % Glycerin 0,154 g DTT 0,01 % Bromphenolblau in 10 ml Aqua bidestillata

Laufpuffer	50 mM TRIS 384 mM Glycin 0,1 % SDS in 1000 ml Aqua bidestillata
Mastermix zur Herstellung von cDNA (je Probe)	5 µl 5x Puffer 2,5 µl 0,01 M DTT 1 µl 12,5 M dNTP Mix 3 µl 100 ng/µl Random Primer 2,7 µl DEPC-behandeltes-Wasser 0,5 µl 40 U/µl RNasin 0,3 µl 200 U/µl <i>Superscript™ RNase H Reverse Transcriptase</i>
Phosphat-gepufferte Salzlösung	1,4 M NaCl 26,9 mM KCl 42,7 mM Na ₂ HPO ₄ 11,5 mM KH ₂ PO ₄
Proteinextraktionspuffer	7 M Urea 2 M Thiourea 4 % CHAPS 40 mM DTT 0,5 % IPG Puffer pH 3 – 10 1 Tablette Proteinaseinhibitor in 10 ml Aqua bidestillata
RNA-Vermessungspuffer	10 ml DEPC-behandeltes-Wasser 100 µl TRIS HCl pH 7,5
Sammelgel (12 %)	3,3 ml Aqua bidestillata 4,0 ml 30 % Acrylamide (29:1) 2,5 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED
Transferpuffer	50 mM TRIS 380 mM Glycin 20 % Methanol in 2.000 ml Aqua bidestillata
Trenngel (5 %)	1,2 ml Aqua bidestillata 390 µl 30 % Acrylamide (29:1) 750 µl 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 30 µl 10 % SDS 30 µl 10 % APS 1 µl TEMED
TRIS -gepufferte Saline-Puffer (TBS)	10 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 0,1 M NaCl
TRIS -gepufferte Saline mit Tween 20 (TBST)	10 mM TRIS-HCl (pH 7,4) 0,1 M NaCl 0,1 % Tween 20
Waschpuffer	0,1 % Tween 20 in PBS

3.1.8 Software

Name	Hersteller
AxioVision® LE64 4.8.3.	Carl Zeiss AG Deutschland GmbH, Jena, Deutschland
cBioPortal for Cancer Genomics	Center for Molecular Oncology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center http://www.cbioportal.org
ImageJ 1.52e	Wanne Rasband
Primer-BLAST	Ye et al. 2012 [137]
R	The R Foundation for Statistical Computing
Rotor-Gene Q Series Software	Qiagen N.V., Hilden, Deutschland
Software Image Lab™ 6.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

3.2 Patientengewebe

Alle in dieser Arbeit verwendeten Patientengewebe wurden im Rahmen einer Pankreasresektion in der Universitätsklinik und Poliklinik für Viszerale, Gefäß- und Endokrine Chirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen. Die Patienten wurden präoperativ ärztlich über die Studie aufgeklärt und erklärten sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung des Gewebes einverstanden. Die durchgeführten Untersuchungen an menschlichem Gewebe wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (Bearbeitungsnummer 2015-106 und 2019-037). Nach der Entnahme der Patientengewebe wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Alle Gewebeproben wurden durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Halle (Saale) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg untersucht und klassifiziert. Um repräsentative Ergebnisse für die jeweilige Differenzierung zu erhalten, wurden für alle durchgeführten Untersuchungen nur Gewebe verwendet, die eindeutig einer Entität zugeordnet werden konnten. Um die Expression von Smad7 in humanem Pankreasgewebe sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) als auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie zu analysieren, wurden zwei Untersuchungsreihen durchgeführt. In der ersten Untersuchungsreihe wurden insgesamt 57 Gewebeproben auf Ebene der mRNA analysiert. Diese Untersuchungsgruppe lässt sich in 12 Proben mit nicht-pathologisch veränderten Pankreasgewebe (npG), 25 Proben mit CP und 20 PDAC-Gewebeproben unterteilen. Die Tumorklassifikation dieser

PDAC-Gewebeproben erfolgte nach der TNM-Klassifikation (Tab. 1) [16]. In der zweiten Untersuchungsreihe wurden insgesamt 9 Gewebeproben immunhistochemisch auf das Protein Smad7 untersucht. Diese 9 Gewebeproben wurden ebenfalls in drei Gruppen (npG, CP und PDAC) eingeteilt. In jeder Gruppe wurden drei Gewebeproben von jeweils drei verschiedenen Patienten untersucht und die Ergebnisse als Mittelwert aufgeführt.

Tabelle 1: Mittels qRT-PCR untersuchte PDAC-Patientengewebe.

KarzinomID	Alter	Geschlecht	Grading	TNM-Klassifikation
300	71	m	G3	pT2 pN1 M1
1083	70	w	G3	pT1b pN0 M0
1196	71	m	G2 – G3	pT3 pN1a M1
1204	77	m	G2	pT3 pN1b M0
1216	73	w	G2	pT3 pN1b M1
1349	47	m	G3	pT3 pN0 M1
1358	56	w	G3	pT4 pN1 M1
1372	67	w	G3	pT3 pN1b M0
1433	67	m	G3	pT3 pN0 M0
1449	58	m	G3	pT4 pN1 M0
1499	75	w	G1	pT1 pN0 M0
1605	66	m	G2	pT3 pN1 M1
1788	61	w	G3	pT3 pN0 M0
1840	68	w	G3	pT4 pN1b M0
2040	64	m	G3	pT4 pN1 M0
2071	57	m	G2 – G3	pT3 pN1 M1
2157	58	w	G2 – G3	pT2 pN1 M0
2182	73	m	G2	pT3 pN1b M0
2215	65	w	G2	pT1 pN0 M0
2918	70	m	G3	pT3 pN1c M0

3.3 Humane PDAC-Zelllinien

Um den Einfluss von Smad7 auf den TGF- β -Signalweg im duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene humane Pankreaskarzinom-Zelllinien untersucht, die exemplarisch das PDAC und metastasiertes Gewebe repräsentieren.

Die Zelllinien BxPC-3 (ATCC[®] CRL-1687[™]), Capan-1 (ATCC[®] HTB-79[™]) und PANC-1 (ATCC[®] CRL-1469[™]) sind kommerziell erhältlich und wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. Die Zelllinie BxPC-3 wurde aus dem Primärtumor eines duktalem Adenokarzinoms einer 61-jährigen Patientin etabliert. Diese Zellen produzieren Muzin sowie CEA [138]. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zelllinien liegt in der Zelllinie BxPC-3 keine Mutationen des Proto-Onkogen Ras (*rat sarcoma*) vor. Zudem ist in dieser Zelllinie eine homozygote Deletion von *SMAD4* beschreiben [139]. CAPAN-1 ist eine Zelllinie, die aus einer Lebermetastase eines duktalem Pankreaskarzinoms eines 40-jährigen Patienten gewonnen wurde. Die Zellen

besitzen Progesteron- und Östrogenrezeptoren sowie die Fähigkeit zur Muzinbildung [140]. Es konnte eine Punktmutation im *SMAD4*-Gen nachgewiesen werden, die zu einer verminderten Expression von Smad4 führt [139]. Bei der Zelllinie PANC-1 handelt es sich um ein Adenokarzinom des Pankreas duktales Ursprungs eines 56-jährigen Patienten [141]. In dieser Zelllinie zeigten sich keine Alternationen des *SMAD4*-Gens [139]. Alle drei Zelllinien sind epithelial und wachsen adhärent. Eine Mutation von *TP53* liegt in allen verwendeten Zelllinien vor [139].

Die Zelllinie FTC-133 wurde als interne Referenz zum Nachweis der korrekten Amplifikation sowie der Funktionalität des qRT-PCR-Assays verwendet. Diese Zelllinie ist ebenfalls kommerziell erhältlich und wurde von der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Katalog-Nr. 94060901) bezogen. Die Zelllinie FTC-133 wurde aus einer mediastinalen Lymphknotenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Patienten etabliert [142].

3.4 Zellkultur

Die Lagerung der PDAC-Zellen in flüssigem Stickstoff erfolgte in einem Gefriermedium bestehend aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und fötalem Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1:9. Die Reaktivierung erfolgte durch vorsichtiges Erwärmen der Zellen in 37 °C warmem Kulturmedium und 10-minütiges zentrifugieren bei 1200 rpm. Das entstandene Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Alle Zelllinien wurden in einem mit 5 % CO₂-begastem Brutschrank bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Als Kulturmedium wurde für die Zelllinien BxPC-3 und PANC-1 Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium/Nährmischung-F-12-Ham (DMEM/F12) verwendet. Die Zelllinie CAPAN-1 wurde in Roswell-Park-Memorial-Institut-(RPMI-)Medium kultiviert. Beide Nährmedien wurden mit hitzeinaktiviertem FCS zur Nährstoffsubstitution sowie mit Penicillin in einer Konzentration von 100 U/ml und Streptomycin in einer Konzentration von 100 mg/ml zur Verhinderung einer bakteriellen Kontamination versetzt. Der Medienwechsel erfolgte bei allen Zellkulturen im Abstand von zwei bis drei Tagen, bis eine für die weitere Passagierung ausreichende Zelldichte erreicht war. Diese erfolgte je nach Wachstumsverhalten der Zellen alle vier bis sechs Tage bei einer Konfluenz von 80 – 90 %. Dabei wurden die Zellen mit Hanks-Balanced-Salt-Solution (HBSS) gespült und anschließend mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen wurden mit Nährmedium bei 1200 rpm für 10 Minuten sedimentiert und das entstandene Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach erfolgter Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer gemäß Herstellerangaben wurde eine neue Zellkulturflasche mit einem Zielwert von ca.

6,6 x 10³ Zellen/cm³ beimpft. Vor weiteren Versuchen mit den Zellkulturen wurden die verwendeten Zellen mindestens viermal passagiert, um eine Beeinflussung durch die Kryokonservierung auszuschließen. Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Pelletierung erfolgte bei 1200 rpm für 10 Minuten. Pro Kryoröhrchen wurde 1 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in FCS und 10 % DMSO gelöst. Die Zellen wurden dann schrittweise eingefroren, zunächst bei -20 °C für 2 Stunden, dann bei -80°C für 24 Stunden und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 unter ausschließlicher Verwendung steriler oder desinfizierter Materialien durchgeführt.

3.4.1 Transiente Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA

Um eine Reduktion der endogenen Smad7-Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu erreichen, wurden die drei untersuchten PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 mit einer Smad7-spezifischen *small interfering RNA* (siRNA) behandelt.

Bei einer siRNA handelt es sich um ein 20 – 30 nukleotid-langes Ribonukleinsäure-(RNA-)molekül, das für kein Protein kodiert und durch eine Bindung an Messenger-RNA-(mRNA-)Moleküle deren Funktion hemmt. Durch diese mRNA-Interferenz wird die Genexpression inhibiert [143].

Zur Vorbereitung der Transfektion mit siRNA gegen Smad7 wurden jeweils 2 x 10⁵ Zellen mit einem antibiotikafreiem Nährmedium in 6-Well-Platten beimpft. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 – 80 % wurden die Zellen mit dem LeermEDIUM Opti-MEM™ gewaschen. Für den Smad7-Knockdown wurden jeweils 10 nM Smad7-siRNA oder die gleiche Menge unspezifischen siRNA (*scrambled siRNA*, SCR-siRNA) als Negativkontrolle zusammen mit dem Transfektionsreagenz im Transfektionsmedium gelöst und für 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Anschließend wurde dieser Transfektionsmix auf die Zellen gegeben. Nach achtstündiger Inkubation der Zellen erfolgte die Zugabe eines Nährmediums mit zweifach konzentriertem Serum und Antibiotikum. Nach jeweils 24 Stunden wurde das Kultivierungsmedium gewechselt. Nach 72 Stunden wurden Proteine und RNA zur weiteren Analyse aus den Zellen isoliert. Die Spezifität des Smad7-Knockdowns wurde durch die Verwendung einer SCR-siRNA, die mit keinem bekannten humanen Transkript interagiert, gewährleistet.

3.4.2 Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1 und U0126

Die Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1 und dem MEK(mitogen-activated protein kinase kinase family members)1/2-Inhibitor U0126 erfolgte modifiziert nach Principe et. al [144]. Hierfür wurde die Zelllinie PANC-1 als etabliertes PDAC-Modell aufgrund der höchsten Smad7-Expression und des größten Effektes des transienten Smad7-Knockdowns ausgewählt. Zur Vorbereitung der Stimulation wurden jeweils 2×10^5 Zellen mit 2 ml DMEM ohne FCS und 1 % Antibiotikum in 6-Well-Platten beimpft. Nach Bildung eines 70 – 80% konfluenten Zellmonolayers erfolgte die Herstellung von insgesamt fünf verschiedenen Versuchsansätzen. Der erste Ansatz, der als Mediumkontrolle diente, wurde mit DMEM beimpft. Der zweite Ansatz, der als DMSO-Kontrolle diente, wurde mit 10 nM DMSO und DMEM inkubiert. Um eine Inhibition von ERK1/2 zu erreichen, wurde der dritte Zellansatz mit 5 μ mol/ml U0126 in DMEM für 120 Minuten inkubiert und anschließend mit DMEM versehen. Der vierte Ansatz zur Stimulation mit TGF- β 1 wurde mit DMEM gewaschen und anschließend mit 10 ng/ml TGF- β 1 in DMEM inkubiert. Der fünfte Ansatz zur Inhibierung von ERK1/2 und TGF- β 1-Stimulation wurde zunächst mit 5 μ mol/ml U0126 in DMEM für 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM gewaschen und mit 10 ng/ml rekombiniertem TGF- β 1 in DMEM stimuliert. Die Versuchsansätze wurden in zweifacher Ausführung angesetzt und über einen Zeitraum von 30 Minuten und 72 Stunden inkubiert. Alle 24 Stunden wurde das Medium mit 10 ng rekombiniertem TGF- β 1 in DMEM gewechselt. Die Isolation von RNA und Proteinen aus den Zellen erfolgte nach 30 Minuten und nach 72 Stunden.

3.5 Proteinbiochemie

3.5.1 Proteinisolierung aus Zelllinien

Zur Proteinisolierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 % mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail enthaltenden Proteinextraktionspuffer für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension bei 12000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei - 20 °C.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einer Komplexbildung der unpolaren und kationischen Proteinseitenketten im sauren Milieu mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich bei der

Komplexbildung von 465 nm auf 595 nm, woraus sich eine zur Proteinkonzentration proportionale Absorption ergibt [145]. Für diese Methode wurde der *DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories) nach Herstellerangaben verwendet. Als Kalibrationskurve diente eine Standardreihe mit 0 – 20 µg bovinem Serumalbumin (BSA). Als Referenz wurden 0 µg BSA verwendet. Es wurden nur Kalibrationskurven verwendet, die einen durch lineare Regression ermittelten Fehler von unter 1 % aufwiesen.

3.5.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine, nach ihrer Größe, mittels Gelelektrophorese wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli angewendet. Hierbei werden die Proteine durch Hitze denaturiert, während Natriumdodecylsulfat (SDS) an die hydrophoben Regionen der Proteine bindet. Durch die entstehende negative Nettoladung wandern die Proteine, ausschließlich aufgrund ihrer Größe, unterschiedlich schnell durch das Polyacrylamidgel zur positiv geladenen Anode. Die Proteinbanden können mit Hilfe eines Größenmarkers einem Molekulargewicht zugeordnet werden [146]. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels mit der erforderlichen Taschentiefe wurde das Glasplattensystem Mini-PROTEAN-System von Bio-Rad verwendet. Zunächst wurde die Glasplattenapparatur mit Trenngel befüllt. Nach dessen Polymerisation wurde das Sammelgel darauf pipettiert und ein Wellenkamm zur Bildung von Probenaschen für die Proteine eingesetzt. Die vollständige Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Gelelektrophorese wurden, je nach zu detektierendem Protein, 5 – 20 µg jeder Probe im Verhältnis 1:1 mit dem Laemmli-Loading-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 Minuten in einem Schüttler denaturiert, zentrifugiert und auf Eis gelagert. Es folgte das Pipettieren der Proben in die vorbereiteten Taschen des Sammelgels. Zur Detektion des Molekulargewichts erfolgte die Zugabe des Massenmarkers Rainbow™ Molecular Weight Markers. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 120 Minuten bei 10 mA pro Gel im Laufpuffer.

3.5.4 Semidry-Blotting

Zur Durchführung immunologischer Nachweisreaktionen und zum Schutz vor Diffusionsprozessen wurden die mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran im Nasstransferverfahren übertragen. Hierzu wurden die PVDF-Membranen für 1 Minute mit 100 % Methanol rehydriert und zusammen mit dem SDS-PAGE-Gel für 10 Minuten im Transferpuffer equilibriert. Anschließend erfolgte die luftblasenfreie horizontale Ausrichtung von Schwamm, Blottpapier, SDS-Gel, PVDF-Membran, Blottpapier und Schwamm, so dass die negativ

geladenen Proteine in der Blotkammer von der Kathode zur Anode wandern konnten und somit die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer erfolgte für 120 Minuten bei 1 A.

3.5.5 Immundetektion

Für den quantitativen Nachweis verschiedener Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet. Hierzu wurden die mit proteinbeschichteten PVDF-Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in spezifischen Blockpuffern geschwenkt, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen in jeweils drei Waschschritten von jeweils 10 Minuten mit TBS-Tween-Puffer gespült. Die Inkubation der PVDF-Membranen erfolgte, mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper im entsprechenden Blockpuffer verdünnt, bei 4 °C über Nacht. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, folgten wiederum drei Waschschrritte. In einem weiteren Schritt wurden die Membranen mit einem an Meerrettichperoxidase-(HRP-)gekoppelten Sekundärantikörper in TBS-Tween-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit TBST-Puffer gewaschen, um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen. Die indirekte Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Reagent (Advansta) nach Herstellerangaben. Hierbei oxidiert das an die Sekundärantikörper gebundene HRP-Luminol zu 3-Aminophthalat. Die entstehende Lumineszenz (425 nm) wurde mit der Chemilumineszenz-sensitiven Kamera des *ChemiDoc™ Touch Imaging System* (Bio-Rad Laboratories) in Form von Banden dargestellt und fotografiert. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der *Image Lab™ Software*. Zur Normalisierung aller Proben wurde das *housekeeping gene* β -Aktin verwendet.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das kommerziell erhältliche Reagenz TRIzol® von Invitrogen AG nach Herstellerangaben verwendet. TRIzol® besteht aus einer Lösung aus Phenol, zur RNA-Lösung, und Guanidiniumthiocyanat, das zur Zelllyse führt und enthaltene RNasen sowie andere Enzyme inaktiviert [147]. Vor der RNA-Isolierung wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, kultiviert, stimuliert oder mit siRNA versetzt. Bei einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen zunächst mit PSB gewaschen und anschließend mit 1 ml TRIzol® Reagenz behandelt. Diese Zellsuspension wurde mittels Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender

Zentrifugation entstand eine Phasenmischung. Die RNA-enhaltende obere Phase wurde in ein separates Reaktionsgefäß abpipettiert und bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit Ethanol und anschließender Trocknung konnte die RNA als Pellet isoliert werden. In einem weiteren Schritt wurde das RNA-Pellet mit 20 µl RNase-freiem Wasser versetzt und für 5 Minuten bei 60 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C. Bei der RNA-Isolierung aus Tumorgewebe wurde eine Spatelspitze homogenisiertes Gewebe in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol® Reagenz versehen und wie oben beschrieben weiter behandelt.

3.6.2 RNA-Vermessung

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde eine RNA-Suspension aus RNA und RNA-Vermessungspuffer in einer Verdünnung von 1:100 hergestellt. Diese Suspension wurde spektrophotometrisch in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260/280 nm vermessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert (M) berechnet.

3.6.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) wird die gewonnene Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert, um diese mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) weiter analysieren zu können. Hierzu wurde das cDNA-Kit nach Angaben des Herstellers (Invitrogen AG) verwendet. Es wurde jeweils 1 µg RNA verwendet. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

3.6.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Bei der konventionellen PCR werden die spezifischen cDNA-Fragmente, welche durch reverse Transkription hergestellt wurden, durch Oligonukleotidprimern amplifiziert [148]. Dieser Prozess erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten: Hierbei wird in einem ersten Schritt der DNA-Doppelstrang durch Denaturierung in Einzelstränge getrennt. Beim Annealing binden die spezifischen Primer im zweiten Schritt an die DNA. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Sequenz durch die Bindung der thermostabilen DNA-Polymerase Taq-Polymerase, aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, mit Oligonukleotiden verlängert. Die in dieser Arbeit verwendete quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) basiert auf der konventionellen PCR. Hierbei emittiert der verwendete Farbstoff SYBR®Green bzw. EvaGreen® bei jeder Bindung an eine doppelsträngige DNA eine Fluoreszenz. Diese Emission wird bei jedem Zyklus detektiert. Durch die Messung der Emissionsstärke kann die Menge der vorhandenen DNA in Echtzeit bestimmt werden. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde ein

Reaktionsansatz mit 7,5 µl des RT² SYBR[®]Green ROX[™] qPCR Mastermix (Qiagen N.V.) und 1,5 µl der cDNA-Probe für den Primer VEGFB (Qiagen N.V.) verwendet. Der spezifische VEGFB-Primer wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µM verdünnt. Alle weiteren Primer wurden mit dem Tool Primer-BLAST entwickelt und von der Firma Metabion international AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bezogen [137]. Diese Primer wurden mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µM verdünnt und mit 2 µl der cDNA-Probe sowie 4 µl des HOT FIREPo[®] EvaGreen[®] qPCR Plus (ROX) der Firma Solis BioDyne versehen. Alle Reaktionsansätze wurden als Doppelbestimmung in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Detektion von Kontaminationen wurde für jedes Primerpaar zusätzlich eine *no template control* mit nukleasefreiem Wasser anstelle der cDNA-Probe ergänzt. Als interne Kontrolle wurde die cDNA der humanen Schilddrüsenzelllinie FTC-133 für jedes Primerpaar verwendet. Die Normalisierung aller Proben erfolgte mit den *housekeeping genes* 18S und β-Aktin. Die angegebenen Mittelwerte wurden aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Messreihen errechnet. Bei der cDNA-Probe für den Primer VEGFB erfolgte zu Beginn der qRT-PCR die Denaturierung der cDNA und Aktivierung der AmpliTaqGold-Polymerase (Qiagen N.V.) für 15 Minuten bei 95 °C. Bei den übrigen Ansätzen wurde analog für 12 Minuten bei 95 °C mit HOT FIREPo[®]-DNA-Polymerase der Firma Solis BioDyne vorgegangen. Anschließend folgten 40 qRT-PCR-Zyklen, die jeweils aus drei Teilschritten bestanden: (1) Denaturierung der doppelsträngigen DNA (45 s bzw. 15 s bei 95 °C), (2) Annealing mit den Primern (45 s bzw. 20 s bei 60 °C) und (3) Elongation (60 s bzw. 20 s bei 72 °C). Sämtliche Reaktionen fanden im Real-time Cycloer Rotor-Gene Q der Firma Qiagen statt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Rotor-Gene Q Series Software* unter der Verwendung der 2^{-ΔΔCT}-Methode [149]. Hierbei werden die C_T-Werte eines konstant exprimierten *housekeeping gene* mit denen des untersuchten Genes, nach folgender Gleichung, verglichen:

$$\Delta CT = CT (gene\ of\ interest) - CT (housekeeping\ gene)$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (treated\ sample) - \Delta CT (untreated\ sample)$$

3.7 Histologie

3.7.1 Immunhistochemie mit der Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode

Die Proteinexpression von Smad7 in Geweben mit PDAC, CP und npG wurde mittels der Labelled-(Strept-)Avidin-Biotin-(LSAB-)Methode durch immunhistochemische Färbungen von paraffinierten Gewebeschnitten dargestellt. Grundlage diese Methode ist die starke Bindung des Vitamins Biotin an das Glykoprotein Avidin aus Hühnereiweiß bzw. an das Avidin-Analogon Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. In

drei aufeinanderfolgenden Schritten wird zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper aufgetragen, der an das Epitop des spezifischen Antigens bindet. Anschließend erfolgt die Bindung des F_C-Teiles des Primärantikörpers durch einen biotinylierten Sekundärantikörper. Durch Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Streptavidin entsteht ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat. Dieses wird durch die Bildung eines dunkelbraunen, unlöslichen Reaktionsproduktes am Zielantigen, nach Zugabe des Substrates Diaminobenzidin (DAB), sichtbar gemacht. Hierdurch kann die Lokalisation und Expression des Zielproteins im Gewebe untersucht werden [150]. Für diese Methode wurde das REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Kit von Dako GmbH nach Herstellerangaben verwendet. Die Paraffinschnitte wurden zunächst mit Rotihistol entparaffiniert und in einer absteigenden Reihenfolge von Alkoholen, bestehend aus Ethanol 99,8 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 % und bidestilliertem Wasser, rehydriert. Anschließenden wurden die Paraffinschnitte in PBS-Pufferlösung eingestellt. Die Demaskierung des Antigens erfolgte durch dreimaliges Kochen und anschließendes Abkühlen der Objektträger für 20 Minuten bei 4 °C in Zitratpuffer. Nach kurzer Inkubation in PBS wurde die endogene Peroxidase mit Methanol und 3 %igem Wasserstoffperoxid im Verhältnis 4:1 blockiert, um eine Reduktion der Hintergrundfärbung zu erreichen. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der zuvor mit Dako REAL™ Antibody Diluent verdünnt wurde, bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper Smad7 wurde in einem Verhältnis von 1:100 verwendet. Als Negativkontrollen wurden die Gewebeschnitte nur mit dem Dako REAL™ Antibody Diluent behandelt. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert, der als Brückenantikörper diente. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS und die Zugabe der enzymgekoppelten Streptavidin-Peroxidase für 30 Minuten. Die anschließende Inkubation des Substrates, bestehend aus Diaminobenzin und wasserstoffperoxidhaltiger Meerrettichperoxidase, führte zu einer Braunfärbung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach der Entfernung von überschüssigem Substrat mit doppelt destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit 1:5 verdünntem Hämalaun zur nukleären Blaufärbung. Nach einer abschließenden Spülung mit Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte mit bidestilliertem Wasser und einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 96 %, 99,8%) dehydriert und für 4 Minuten in Xylol gelagert. Abschließend wurde die Objektträger mit Entellan eingedeckt und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur gelagert.

3.7.2 Auswertung der Immunhistochemie

Zur fotografischen Dokumentation der histologischen Schnitte wurde das Axioplan 2 Mikroskop-System® in Verbindung mit einer AxioCam Digitalkamera®, beides hergestellt von der Firma Carl Zeiss AG, verwendet. Die Digitalisierung der Aufnahmen erfolgte stets unter denselben Einstellbedingungen und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software AxioVision LE64 4.8.3. Es wurde jeweils ein Übersichtsbild in 10-facher Vergrößerung und jeweils zwölf zufällig ausgewählte Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung angefertigt. Die weitere Auswertung erfolgte anhand des semiquantitativen Immunoreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner [151]. Dieser ergibt sich aus dem Produkt der Färbeintensität der untersuchten Zellen und dem Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen. Die Färbeintensität der immunzytochemisch positiven Zellen wurde mit einem Punktwert von 0 (keine Färbung) bis 3 (starke Färbung) bewertet. Der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen wurde mit Punktwerten zwischen 0 (0 – 20 % gefärbte Zellen) und 4 (80 – 100 % gefärbte Zellen) eingeteilt. Die erhaltenen Werte wurden miteinander multipliziert und als IRS angegeben. Dieser lag zwischen minimal 0 und maximal 12 Punkten. Hierbei zeigt ein Punktwert zwischen 0 und 2 ein negatives Ergebnis an. Ein Punktwert von 3 – 5 Punkten spricht für eine schwach positive und ein Punktwert von 6 – 8 Punkten für eine moderate Färbung. Eine starke Färbung liegt bei einem Punktwert von 9 – 12 Punkten vor. Die randomisiert aufgenommenen Gewebeschnitte wurden von drei qualifizierten Mitarbeitern des Forschungslabors unabhängig voneinander beurteilt. Aus den erzielten Ergebnissen wurde für jeden Gewebeschnitt der Mittelwert gebildet.

3.8 Datenbankanalyse mittels des cBioPortals

Die Grundlage der in-silico-Analyse bildeten die mRNA-Expressionsdaten der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie des *The Cancer Genom Atlas Program* (TCGA), die vom *Eli and Edythe L. Broad Institute of MIT and Harvard* (*Broad Institute*) ausgewertet wurden. Die Studie umfasst insgesamt 186 Gewebeproben von 185 Patienten, die in vier verschiedenen Krankheitsentitäten unterteilt werden konnten. Acht Gewebeproben stammten von Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Pankreas, jeweils eine Probe zeigte ein undifferenziertes Pankreaskarzinom bzw. einen unspezifizierten Pankreastumor. In 176 Gewebeproben wurde ein PDAC nachgewiesen. Für 7 dieser Proben lagen jedoch keine mRNA-Expressionsdaten vor. Daher wurden in der folgenden in-silico-Analyse 169 Gewebeproben von 168 Patienten mit PDAC untersucht. Die Studie wurde über das Webportal *cBioPortal for Cancer Genomics* (cBioPortal) abgerufen. Das cBioPortal wird vom *Center for Molecular Oncology* des *Memorial Sloan Kettering Center* gehostet und stellt multidimensionale Genomdaten verschiedener

maligner Erkrankungen sowie klinische Daten der Probanden der Forschungsgemeinschaft frei zur Verfügung [152,153].

Für die Analyse der mRNA-Expression und der Ko-Expressionen wurden die Gene in Abhängigkeit vom diploiden Datensatz für das untersuchte Gen in eine verminderte und eine erhöhte mRNA-Expression unterteilt. Die quantitative mRNA-Expression wurde anhand der RNA-Sequenzierung unter Verwendung des Erwartungs-Maximierungs-Algorithmus (RSEM) ausgewertet. Als Grenzwert wurde ein Z-Score von $\pm 2,0$ gewählt. Der Z-Score gibt die Entfernung eines bestimmten Datenpunktes vom Mittelwert der Daten als Anzahl der Standardabweichungen an. Hierdurch ist eine Identifizierung von Ausreißern möglich. Als Referenzgruppe diente die durchschnittliche *SMAD7*-Expression in allen diploiden Zellen der untersuchten Population.

Folgende durch das cBioPortal vordefinierte Gene wurden auf ihre Expression im PDAC und ihre mRNA-Korrelation mit *SMAD7* untersucht: *ACVR1, ACVR1B, ACVR1C, ACVR2A, ACVR2B, ACVRL1, ADAM10, ADAM17, AKT1, AKT1S1, AKT2, APAF1, APH1A, APH1B, ARL11, ARDC1, ATM, ATR, AURKA, BAD, BCL2, BCL2L1, BMP10, BMP15, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BRAF, BRCA1, BRCA2, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CCNA1, CCNB1, CCND1, CCND2, CCNE1, CDC25A, CDH1, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, CHEK2, CHUK, CIR1, CSF1, CSF1R, CTBP1, CTBP2, CUL1, CXCL8, CXCR1, CXCR2, DAB2, DIRAS3, DLEC1, DLL1, DLL3, DLL4, DPH1, DTX1, DTX2, DTX3, DTX3L, DTX4, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7, E2F8, EGFR, EIF4E, EIF4EBP1, EIF5A2, EP300, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FANCF, FAS, FBXW7, FGF1, FGF1, FGFR1, FOXO1, FOXO3, GDF11, GDF2, GSK3B, HDAC1, HDAC2, HES1, HES2, HES4, HES5, HES7, HEY1, HEY2, HEYL, HIF1A, HLA-G, HRAS, IGF1, IGF1R, INHA, INHBA, INHBB, INHBC1, ITCH, ITGAV, ITGB3, JAG1, JAG2, JAK1, JAK2, KDM5A, KDR, KIT, KRAS, LFNG, MAML1, MAML2, MAML3, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3, MAP2K4, MAP2K5, MAP3K1, MAP3K2, MAP3K3, MAP3K4, MAP3K5, MAPK1, MAPK12, MAPK14, MAPK3, MAPK4, MAPK6, MAPK7, MAPK8, MAPK9, MDC1, MDM2, MDM4, MFNG, MLH1, MLST8, MMP1, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP2, MMP21, MMP23B, MMP24, MMP25, MMP26, MMP27, MMP28, MMP3, MMP7, MMP9, MSH2, MTOR, MYC, NCOR2, NCSTN, NFKB1, NFKB2, NHBE, Nodal, GDF1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NRARP, NUMB, NUMBL, OPCML, PARP1, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PDPK1, PEG3, PIK3CA, PIK3R1, PIK3R2, PLAGL1, PSEN1, PSEN2, PSENEN, PTEN, PTK2, RAB25, RAD51, RAF1, RASSF1, RB1, RBL1, RBL2, RBPJ, RBPJL, RFNG, RHEB, RICTOR, RPS6, RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KB1, RPS6KB2, RPTOR, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5,*

SMAD6, SMAD7, SMAD9, SNW1, SPARC, SPEN, SPTBN1, SRC, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A, STAT5B, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TGFBRAP1, TP53, TP53BP1, TSC1, TSC2, VEGFA, VEGFB, WFDC2, WWOX, ZFYVE9.

Eine signifikante Ko-Expression mit *SMAD7* wurde angenommen, wenn $p < 0,001$ erreicht wurde. Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson für diese Gene durchgeführt. Alle Daten und Grafiken der in dieser Arbeit verwendeten Studien wurden am 29. Januar 2019 von cbioportal.org abgerufen.

In einem weiteren Schritt wurden die Gene, die in der Korrelationsanalyse ihrer mRNA-Expression, im Vergleich mit der *SMAD7*-mRNA-Expression, einen Korrelationskoeffizienten von $r > 0,3$ und eine Signifikanz von $p < 0,001$ aufwiesen, auf ihre Expression im eigenen Patientenkollektiv untersucht. Dazu wurden die 20 PDAC-Gewebeproben der in Kapitel 3.2 und Tabelle 1 beschriebenen Studiengruppe verwendet. Die analysierten Gene umfassten die Gene *CASP7, CDC25A, MAP3K3, MAPK3* und *TP53BP1*. Darüber hinaus wurde auch die Expression der *VEGFB*-mRNA als Vertreter der VEGF-Wachstumsfaktoren-Familie im eigenen Patientenkollektiv untersucht.

3.9 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm R durchgeführt. Für die Ergebnisse wurden die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der jeweils dreifach wiederholten Tests berechnet. Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte mittels t -Test. Dabei wurden p -Werte $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet. Die Unabhängigkeit der Variablen wurde mittels Chi-Quadrat-Test getestet. Für die Korrelationsanalysen wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse eine Normalverteilung angenommen und der Pearson-Test verwendet. Für die Effektstärke wurden die Effektgrenzen nach Cohen gewählt, wobei der Zusammenhang wie folgt definiert wurde: $r > 0,1$ schwach, $r > 0,3$ mittel und $r > 0,5$ stark [154]. Zur Feststellung eines statistischen Zusammenhanges wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Für die Auswertung der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie (TCGA) des cBioPortals wurde unter der Annahme einer Normalverteilung der Datengrundgesamtheit die Korrelationsanalyse nach Pearson gewählt und zusammen mit der Signifikanz dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Klassifikation der untersuchten humanen PDAC-Patientengewebe

Von den 57 Patientengewebeprobe, die im Rahmen einer Pankreasresektion am Universitätsklinikum Halle entnommen wurden (npG: 12, CP: 25, bestätigtes PDAC: 20), stammten die PDAC-Gewebeprobe von 9 weiblichen (45 %) und 11 männlichen (55 %) Patienten. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Resektion betrug 65,7 Jahre. Mehrheitlich wurden, nach TNM-Klassifikation, fortgeschrittene Tumore im T3- (11 Fälle, 55 %) und T4-Stadium (4 Fälle, 20 %) diagnostiziert. Bei weiteren 3 Fällen lag ein T1-Stadium (15 %) und in 2 Fällen ein T2-Stadium (10 %) vor. Eine Beteiligung der Lymphknoten im Rahmen eines N1-Status konnte in 14 Fällen (70 %) diagnostiziert werden (N0: 6 Fälle, 30 %). Eine Fernmetastasierung und somit ein M1-Stadium wurden in 7 Fällen (35 %) festgestellt (M0-Stadium: 13 Fälle, 65 %). Überwiegend lagen schlecht oder nur mäßig differenzierte Karzinome, mit mehrheitlich G3-Grading (11 Karzinome, 55 %) vor. Zusätzlich lagen 3 Karzinomen mit einem Grading zwischen G2 – G3 (15 %) vor sowie 5 Karzinome mit dem Grading G2 (25 %). Ein G1-Grading ließ sich nur bei einem 1 Karzinom (5 %) bestätigen.

4.2 Expression von Smad7 in humanen Pankreasgeweben

4.2.1 mRNA-Expression von SMAD7

In den untersuchten PDAC-Geweben zeigte sich eine 3,5-fach erhöhte mRNA-Expression von *SMAD7* im Vergleich zu nicht-pathologisch verändertem Pankreasgewebe ($p < 0,001$). Verglichen mit Geweben mit chronischer Pankreatitis war die *SMAD7*-mRNA-Expression in Karzinomgeweben um das 1,9-fache erhöht ($p < 0,001$). In den untersuchten Proben war eine insgesamt erhöhte sowie mit steigendem Tumorstadium von T1 bis T3 zunehmende, relative

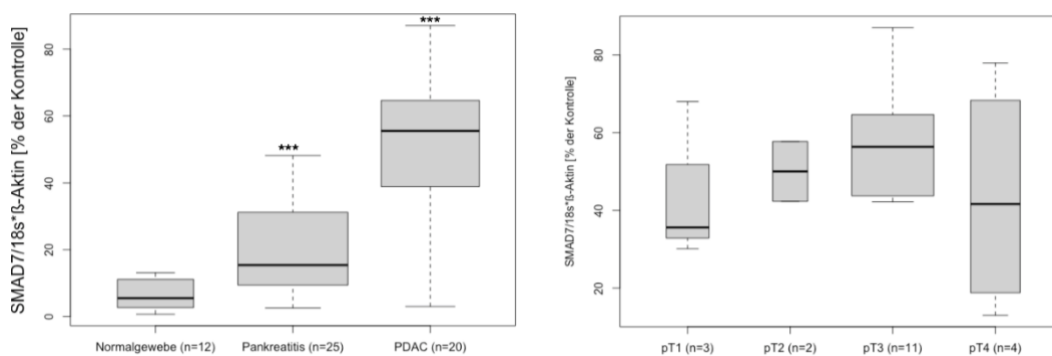


Abbildung 1: Erhöhte mRNA-Expression von *SMAD7* in humanen Pankreasgeweben und Vergleich der *SMAD7*-Expression in den Tumorstadien T1 bis T4 (***) $p < 0,001$).

SMAD7-mRNA-Expression auffällig. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte in dieser Untersuchung jedoch nicht belegt werden ($p = 0,30$ bzw. $p = 0,27$; Abb. 1).

4.2.2 Proteinexpression von Smad7

Das immunhistochemisch untersuchte nicht-pathologisch veränderte Pankreasgewebe zeigte eine homogene, schwache Smad7-Färbung in azinären und duktalem Zellen des Pankreas. Weiterhin wurde eine vorwiegend zytoplasmatische Expression von Smad7 festgestellt. Die Auswertung mittels IRS ergab insgesamt eine schwache Färbung (Punktzahl = 4,71; Abb. 2).

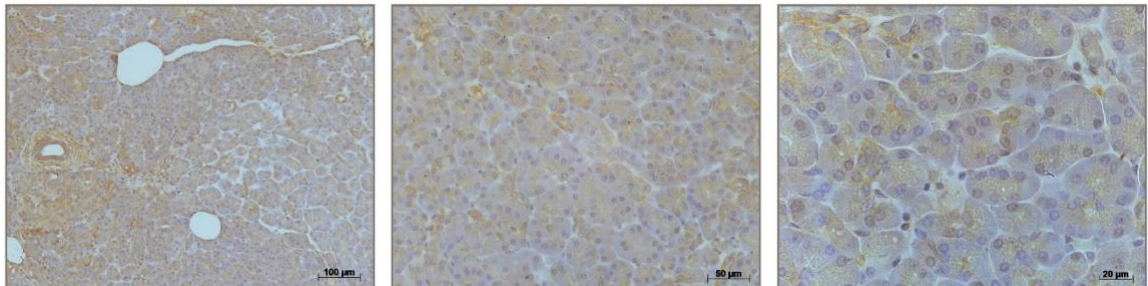


Abbildung 2: Nachweis von Smad7 in nicht pathologisch verändertem Pankreasgewebe.

In Geweben mit chronischer Pankreatitis wurden Smad7-Proteine in moderater Intensität in duktalem Zellen sowie in Stromazellen angefärbt. Auch hier zeigte sich vor allem ein zytoplasmatisches Expressionsmuster mit sehr geringer Anfärbung der Nuklei. Mit einem Punktwert von 6,79 Punkten wurde gemäß IRS eine moderate Färbung nachgewiesen (Abb. 3).

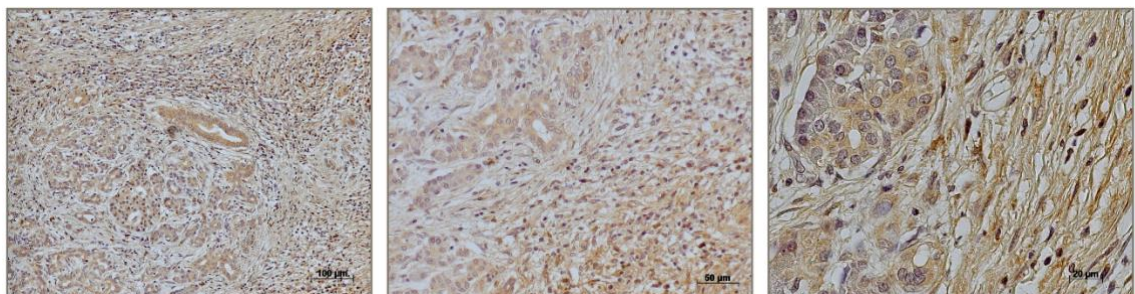


Abbildung 3: Nachweis von Smad7 in Geweben mit chronischer Pankreatitis.

Die PDAC-Gewebeproben zeigten eine starke Färbung der Karzinomzellen sowie der Stromazellen. Es zeigte sich ein starkes zytoplasmatisches und ein moderates nukleäres Expressionsmuster von Smad7. Die Auswertung anhand des IRS ergab mit 10,65 Punkten eine starke Färbung (Abb. 4).

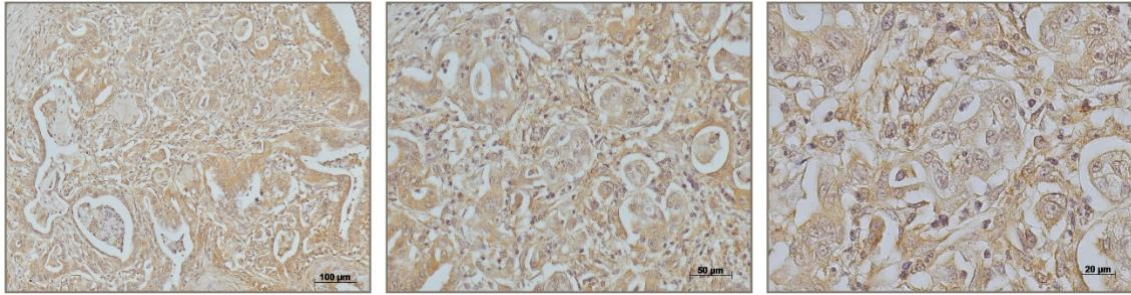


Abbildung 4: Nachweis von Smad7 in PDAC-Geweben.

Die Auswertung der gefärbten Paraffinschnitte nach dem IRS zeigte eine signifikant erhöhte Smad7-Proteinexpression zwischen nicht-pathologisch verändertem Pankreasgewebe und Geweben mit PDAC ($4,71 \pm 2,1$ Punkte bzw. $10,65 \pm 1,7$ Punkte, $p < 0,01$). Der Vergleich zwischen npG und chronischer Pankreatitis zeigte ebenfalls eine signifikant erhöhte Proteinexpression von Smad7 ($4,71 \pm 2,1$ Punkte bzw. $6,79 \pm 2,2$ Punkte, $p < 0,01$). Weiterhin konnte auch eine signifikant höhere Smad7-Expression in PDAC-Geweben im Vergleich zu Geweben mit CP nachgewiesen werden ($6,79 \pm 2,2$ Punkte bzw. $10,65 \pm 1,7$ Punkte, $p < 0,01$; Tab. 2, Abb. 5).

Tabelle 2: Ergebnisse der Immunhistochemie nach IRS.

Gewebeart (je $n = 3$)	Färbeintensität der Braunfärbung (M)	Punktzahl positiv gefärbter Zellen (M)	Gesamtpunktzahl (M)	Ergebnis nach IRS
npG	1,86	2,53	4,71	Schwache Färbung
Chronische Pankreatitis	2,34	2,9	6,79	Moderate Färbung
PDAC-Gewebe	2,9	3,63	10,65	Starke Färbung

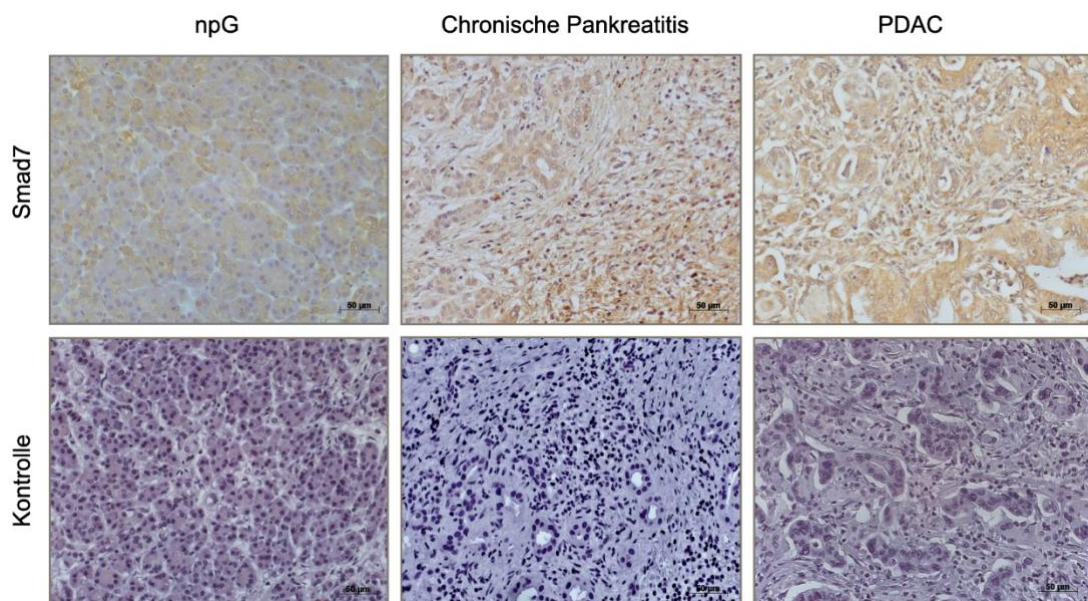


Abbildung 5: Immunhistochemischer Smad7-Nachweis in humanen Pankreasgewebe.

4.3 In-silico-mRNA-Expressionsanalyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie mittels des cBioPortals

Das untersuchte Studienkollektiv der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie (TCGA) des Broad Institute umfasste mRNA-Expressionsdaten von 169 Patientengewebeproben mit diagnostiziertem PDAC. Nach TNM-Klassifikation waren alle Tumorstadien vertreten. Am häufigsten lag ein T3-Stadium mit einer Lymphknotenbeteiligung im Sinne eines N1-Stadiums ohne Fernmetastasierung sowie mit einem G2-Grading vor (Tab. 3).

Tabelle 3: Zusammenfassung der PDAC-Patientendaten des cBioPortals.

Geschlecht, n (%):					
Weiblich	75 (44,3 %)	Männlich	94 (55,7 %)		
Alter bei Erstdiagnose:					
64,9 Jahre					
Stadium, n (%):					
T1	6 (3,6 %)	T3	140 (82,8 %)		
T2	19 (11,2 %)	T4	3 (2,8 %)	k. A.	1 (0,6 %)
Grading, n (%):					
G1	24 (14,2 %)	G3	48 (28,4 %)	Gx	2 (1,2 %)
G2	94 (55,6 %)	G4	1 (0,6 %)		
Lymphknotenstatus, n (%):					
N0	45 (26,6 %)	N1b	4 (2,4 %)	N3	0 (0 %)
N1	124 (69,8 %)	N2	0 (0 %)	Nx	2 (1,2 %)
Metastasen, n (%):					
M0	79 (46,7 %)	M1	4 (2,4 %)	Mx	86 (50,9 %)
Resektionsstatus, n (%):					
R0	99 (58,6 %)	R2	5 (3 %)		
R1	51 (30,2 %)	Rx	14 (8,3 %)		
Krankheitsfreies Überleben:					
14,8 Monate					
Gesamtüberleben:					
16,9 Monate					

4.3.1 mRNA-Expression der kanonischen TGF- β -Signalkaskade im PDAC

Zunächst wurden die Veränderungen der mRNA-Expression der weiteren, an der TGF- β -Signaltransduktion beteiligten Smad-Proteine beim PDAC untersucht. Hier ist auffällig, dass für *SMAD2*, *SMAD4* und *SMAD7* insgesamt die meisten Veränderungen der mRNA-Expressionen festgestellt wurden, diese jedoch überwiegend in Form einer verminderten Expression. Einen signifikanten, schwach positiven Zusammenhang konnte zwischen der mRNA-Expression von *SMAD1* und *SMAD7* nachgewiesen werden ($r = 0,26$, $p < 0,001$, $n = 169$). Die Korrelation nach Pearson zeigte zwischen den Genen *SMAD4*, *TGFBR1* sowie *TGFBR2* und *SMAD7* einen signifikanten, mittleren positiven Zusammenhang der mRNA-Expression ($r = 0,34$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = 0,32$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = 0,41$, $p < 0,001$, $n = 169$). Eine signifikante, stark positive

Korrelation der mRNA-Expression bestand zwischen den Genen *SMAD2* und *SMAD7* ($r = 0,52$, $p < 0,001$, $n = 169$). Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression der Gene *SMAD3*, *SMAD5*, *SMAD9* und *SMAD7* nachgewiesen werden (Abb. 6 und 7).

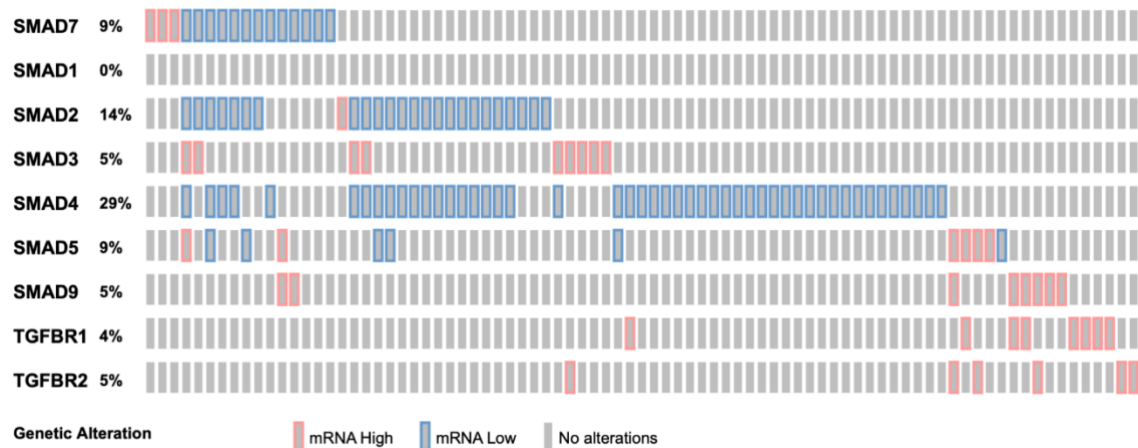


Abbildung 6: Oncoprint der mRNA-Expression der Gene des kanonischen TGF- β -Signalweges. Rote Felder stellen eine erhöhte (Z-Score $\geq 2,0$), blaue Felder eine verminderte (Z-Score $\leq 2,0$) und graue Felder eine unveränderte mRNA-Expression dar. Nicht alternierte Gewebeproben werden nicht dargestellt. Abgerufen von cbiportal.org.

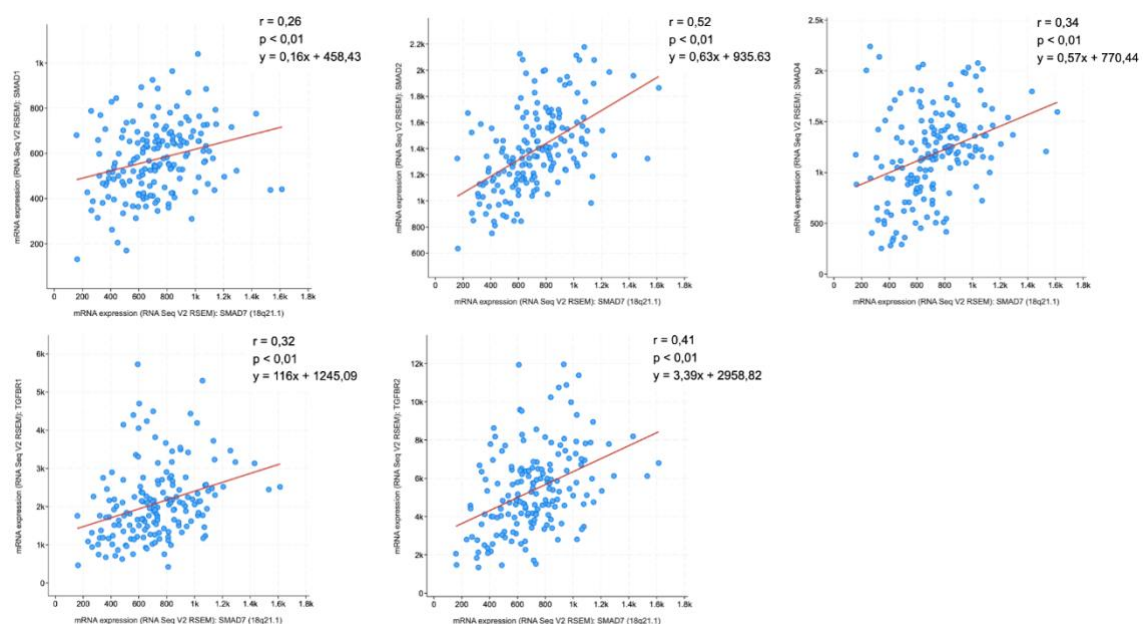


Abbildung 7: Korrelationsdiagramm der mRNA-Expression von *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD4*, *TGFBR1* und *TGFBR2* mit *SMAD7*. Abgerufen von cbiportal.org.

4.3.2 Veränderungen der mRNA-Expression von Zielgenen der nicht-kanonischen TGF- β -Signalkaskade

Anschließend wurden zwei Zielgene des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges auf eine Korrelation der mRNA-Expression mit *SMAD7* im PDAC untersucht. Zum einem

wurde die Rho-GTPase RHOA, zum anderen die Unterform AKT1 der Proteinkinase B analysiert. Es konnte keine signifikante Korrelation nach Pearson zwischen der mRNA-Expression von *RHOA* und *AKT1* mit *SMAD7* nachgewiesen werden ($r = 0,13$, $p = 0,1$, $n = 169$; $r = -0,01$, $p = 0,89$, $n = 169$).

4.3.3 In-silico-Analyse der mRNA-Expression von verschiedenen Genen im PDAC mittels des cBioPortals

Von den 285 in der in-silico-Analyse untersuchten Genen zeigten 9 Gene (*CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1*, *VEGFB*) eine zu *SMAD7* signifikant ($p < 0,001$) korrelierende mRNA-Expression im PDAC (Abb. 8 und 9).

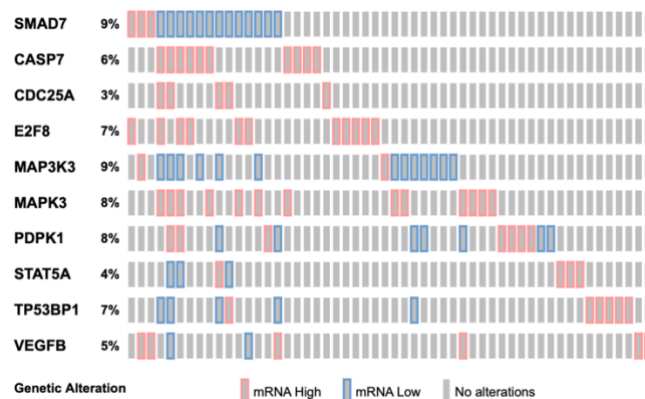


Abbildung 8: Oncoprint der untersuchten Gene, welche eine zur *SMAD7*-mRNA-Expression signifikant korrelierende mRNA-Expressionen aufwiesen. Rote Felder stellen eine erhöhte (Z-Score $\geq 2,0$), blaue Felder eine verminderte (Z-Score $\leq -2,0$) und graue Felder eine unveränderte mRNA-Expression dar. Nicht alternierte Gewebeproben werden nicht dargestellt. Abgerufen von cbioportal.org.

Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte einen signifikanten, mittleren negativen Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *CASP7*, *CDC25A* und *MAPK3* mit *SMAD7* ($r = -0,32$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = -0,4$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = -0,38$, $p < 0,001$, $n = 169$). Weiterhin konnte eine signifikante, schwach negative Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *E2F8* und *SMAD7* nachgewiesen werden ($r = -0,28$, $p < 0,001$, $n = 169$). Ein signifikanter, schwach positiver Zusammenhang konnte zwischen der *STAT5A*- sowie der *VEGFB*-mRNA-Expression und der *SMAD7*-mRNA-Expression gezeigt werden ($r = 0,27$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = 0,22$, $p < 0,001$, $n = 169$). Zwischen der mRNA-Expression von *PDPK1* und *SMAD7* konnte keine Korrelation festgestellt werden ($r = 0,01$, $p = 0,9$, $n = 169$). Dagegen konnte eine signifikante stark positive Korrelation zwischen der *MAP3K3*- und *TP53BP1*-mRNA-Expression sowie der *SMAD7*-mRNA-Expression nachgewiesen werden ($r = 0,56$, $p < 0,001$, $n = 169$; $r = 0,39$, $p < 0,001$, $n = 169$; Abb. 9).

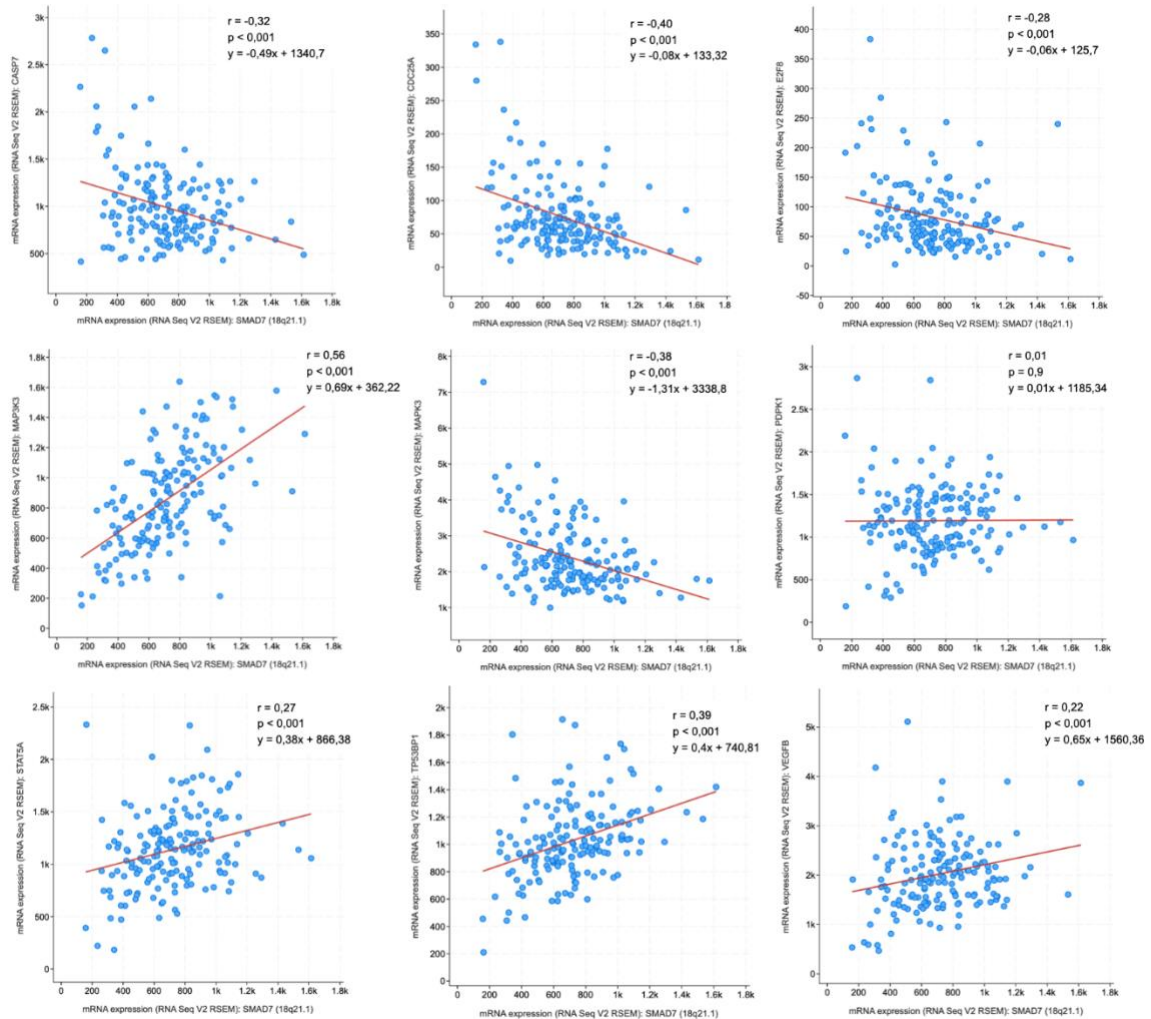


Abbildung 9: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression der *in silico* ermittelten Gene *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* und *VEGFB* in Abhängigkeit der mRNA-Expression von *SMAD7*. Abgerufen von cbiportal.org.

4.3.4 Korrelationsanalyse der *in silico* ermittelten Gene im eigenen Patientenkollektiv

Die Korrelation nach Pearson zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *CDC25A* und *SMAD7* im eigenen Patientenkollektiv ($r = 0,37$, $p = 0,11$, $n = 20$). Eine signifikante, stark positive Korrelation konnte zwischen der mRNA-Expression von *CASP7* und *SMAD7* nachgewiesen werden ($r = 0,57$, $p < 0,01$, $n = 20$). Weiterhin konnte für die Gene *MAP3K3*, *MAPK3*, *TP53BP1* und *VEGFB* ein signifikanter, stark positiver Zusammenhang der jeweiligen mRNA-Expression mit der *SMAD7*-mRNA-Expression ermittelt werden ($r = 0,71$, $p < 0,001$, $n = 20$; $r = 0,82$, $p < 0,001$, $n = 20$; $r = 0,89$, $p < 0,001$, $n = 20$; $r = 0,91$, $p < 0,001$, $n = 20$; Abb. 10).

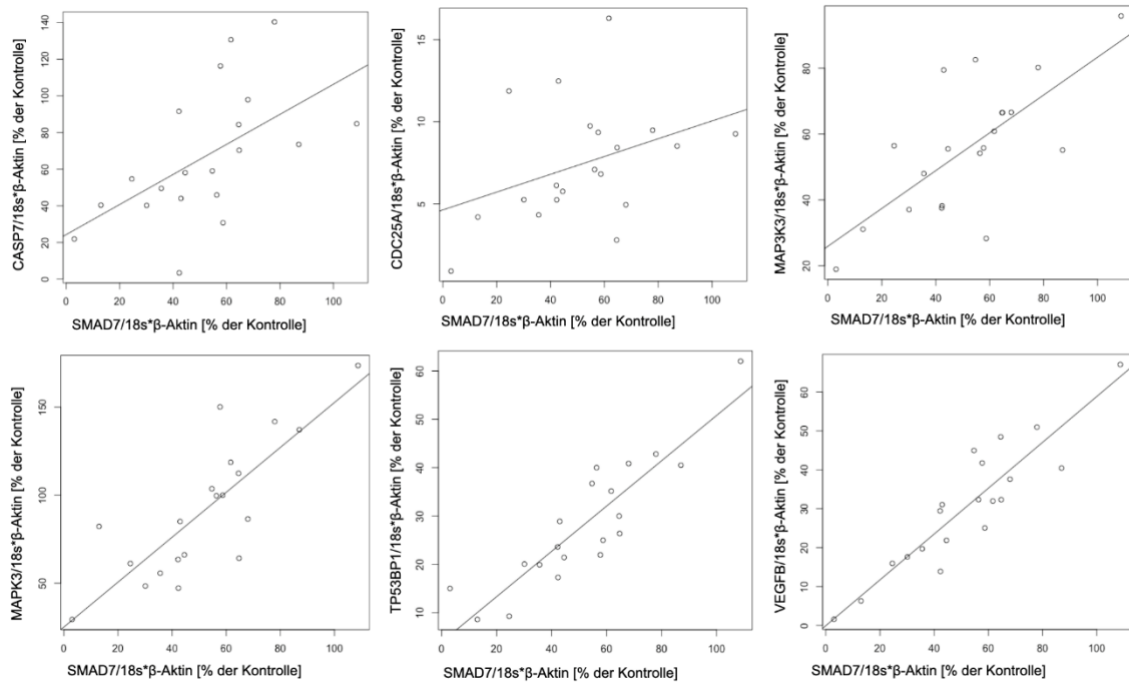


Abbildung 10: Korrelationsanalyse der mRNA-Expression der Gene *CASP7*, *CDC25A*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *TP53BP1* und *VEGFB* verglichen mit der *SMAD7*-mRNA-Expression im eigenen Patientenkollektiv ($n = 20$).

4.4 Expression von Smad7 in humanen PDAC-Zelllinien

In allen drei untersuchten humanen PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 konnte eine Expression von Smad7 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im Vergleich der untersuchten Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede in der Smad7-mRNA- und Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 11).

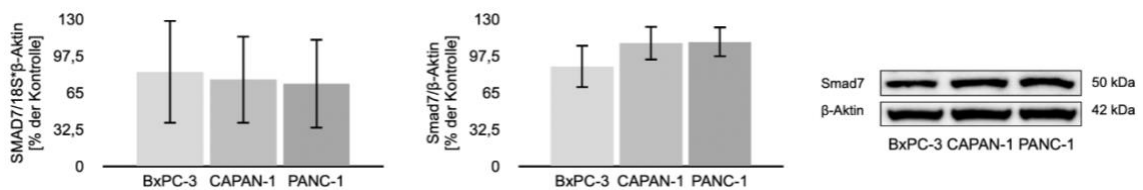


Abbildung 11: mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1, PANC-1.

4.5 Transienter Knockdown von Smad7 durch siRNA in etablierten PDAC-Zelllinien

In allen drei untersuchten, etablierten Zellenlinien zeigte sich nach Transfektion mit Smad7-siRNA eine signifikante, relative Reduktion der Smad7-Expression, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene (Tab. 4, Abb. 12 – 14).

Tabelle 4: Relative Reduktion der Smad7-mRNA- und -Proteinexpression nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.

	Zelllinie		
	BxPC-3	CAPAN-1	PANC-1
SMAD7-mRNA-Expression [% , Referenzbereich]	53,1 (± 27,1)	57,2 (± 8,5)	18,9(± 7,5)
Relative Reduktion [%]	46,9	42,8	81,1
<i>p</i>	0,04	< 0,001	< 0,001
Smad7-Proteinexpression [% , Referenzbereich]	34,8 (± 7,3)	83,7 (± 8,5)	70,2 (± 4,4)
Relative Reduktion [%]	65,2	16,3	29,9
<i>p</i>	0,03	0,03	0,03

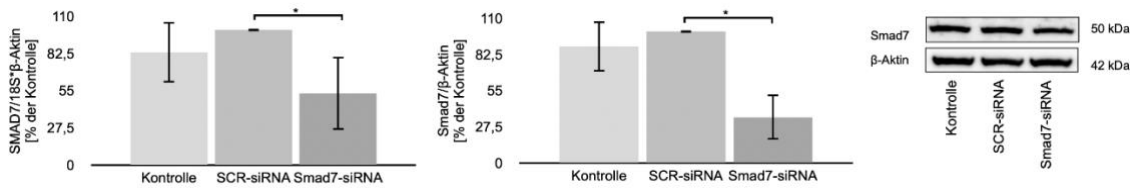


Abbildung 12: Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie BxPC-3 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA (* *p* < 0,05).

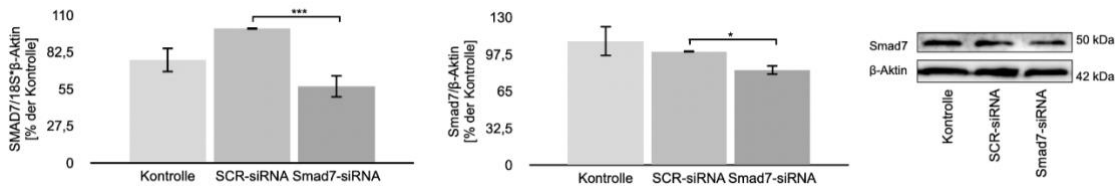


Abbildung 13: Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie CAPAN-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA (* *p* < 0,05, *** *p* < 0,001).

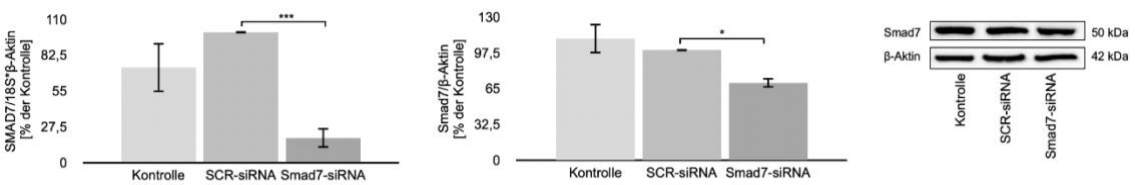


Abbildung 14: Darstellung der PCR- und Western-Blot-Ergebnisse der PDAC-Zelllinie PANC-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA (* *p* < 0,05, *** *p* < 0,001).

4.5.1 Auswirkung des transienten Smad7-Knockdowns auf die TGF-β-Signalkaskade

Im Rahmen des kanonischen TGF-β-Signalweges konnte durch Transfektion mit Smad7-siRNA in der PDAC-Zelllinie PANC-1 eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression der Gene *SMAD4* und *TGFBR1* erzielt werden (Tab. 5, Abb. 15).

Tabelle 5: Relative Reduktion der mRNA-Expression der Gene *SMAD2*, *SMAD4* und *TGFBR1* des kanonischen TGF- β -Signalweges nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.

mRNA-Expression [% , Referenzbereich]	Zelllinie		
	BxPC-3	CAPAN-1	PANC-1
<i>SMAD2</i>	85,4 (\pm 24,4)	104,2 (\pm 44,3)	83,8 (\pm 10,3)
Relative Änderung [%]	- 14,6	+ 4,2	- 16,2
<i>p</i>	0,4	0,9	0,1
<i>SMAD4</i>	51,9 (\pm 45,9)	105,7 (\pm 10,4)	62,8 (\pm 13,9)
Relative Änderung [%]	- 48,1	+ 5,7	- 37,2
<i>p</i>	0,2	0,4	< 0,05
<i>TGFBR1</i>	81,4 (\pm 10,7)	104,6 (\pm 23,9)	77,5 (\pm 9,4)
Relative Änderung [%]	- 18,6	+ 4,6	- 22,5
<i>p</i>	0,09	0,7	0,05

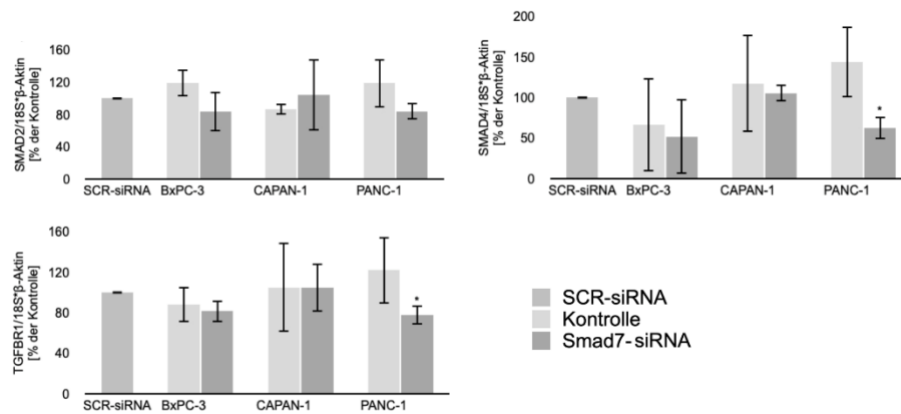


Abbildung 15: Darstellung der PCR-Ergebnisse der Gene *SMAD2*, *SMAD4* und *TGFBR1* in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 nach siRNA-abhängigem Smad7-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA (* $p < 0,05$).

Die Analyse der mRNA-Expression der Downstream-Effektoren *AKT1* und *RHOA* des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges zeigte nach Transfektion mit Smad7-siRNA in der Zelllinie PANC-1 eine signifikante Reduktion der *AKT1*-Expression um 24 % gegenüber der SCR-siRNA. Ebenfalls in der Zelllinie PANC-1 konnte eine signifikante Verminderung der Expression von *RHOA*-mRNA um 21 % im Vergleich zur SCR-siRNA nachgewiesen werden. In den Zelllinien BxPC-3 und CAPAN-1 konnten keine signifikanten Expressionsveränderungen nachgewiesen werden (Abb. 16, Tab. 6).

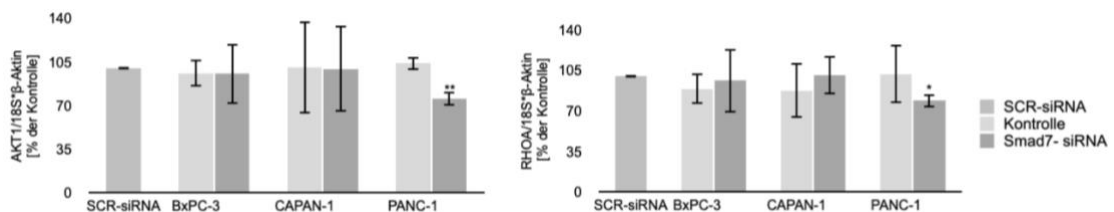


Abbildung 16: Einfluss des transienten Knockdowns von Smad7 auf die mRNA-Expression von *AKT1* und *RHOA* in den untersuchten PDAC-Zelllinien (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Tabelle 6: Relative Reduktion der mRNA-Expression der Gene *AKT1* und *RHOA* des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.

mRNA-Expression [% , Referenzbereich]	Zelllinie		
	BxPC-3	CAPAN-1	PANC-1
<i>AKT1</i>	95,4 (\pm 24,2)	99,4 (\pm 34,6)	75,6 (\pm 5,5)
Relative Änderung [%]	- 4,6	- 0,6	- 24,4
<i>p</i>	0,8	0,9	< 0,01
<i>RHOA</i>	96,1 (\pm 27,4)	100,9 (\pm 16,6)	78,9 (\pm 5,6)
Relative Änderung [%]	- 3,9	+ 0,9	- 21,1
<i>p</i>	0,8	0,9	< 0,05

4.5.2 Auswirkung der Transfektion mit Smad7-siRNA auf die *in silico* ermittelten Gene

In den untersuchten Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 führte die Reduktion der endogenen Smad7-Expression durch siRNA zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Expression von *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *STAT5A* und *VEGFB*. Im Gegensatz dazu konnte durch die Transfektion mit Smad7-siRNA in der Zelllinie BxPC-3 eine signifikante Reduktion der *MAP3K3*-mRNA-Expression erreicht werden. In allen drei untersuchten Zelllinien zeigte sich eine tendenziell verminderte mRNA-Expression von *MAPK3*, jedoch ohne statistische Signifikanz. Zusätzlich konnte die mRNA-Expression von *PDPK1* in der Zelllinie BxPC-3 um 30 % und in der Zelllinie PANC-1 um 28 % reduziert werden. Eine Reduktion der *TP53BP1*-mRNA-Expression um 24,5 % konnte in der Zelllinie PANC-1 erzielt werden, während in den Zelllinien BxPC-3 und CAPAN-1 keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen wurden. Die Transfektion mit Smad7-spezifischer siRNA führte in der Zelllinie PANC-1 zu einer Reduktion der mRNA-Expression von *TP53* um 31,5 % und 12,2 % in der Zelllinie BxPC-3 im Vergleich zur SCR-siRNA. In der Zelllinie CAPAN-1 konnte keine Änderung der *TP53*-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 17, Tab. 7).

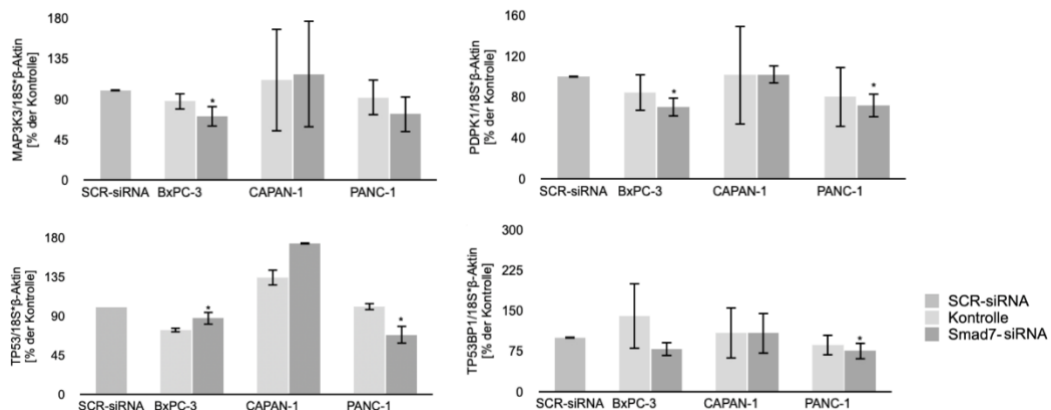


Abbildung 17: Auswirkung der Smad7-siRNA auf die mRNA-Expression von *MAP3K3*, *PDPK1*, *TP53* und *TP53BP1* im Vergleich zur *SMAD7*-mRNA-Expression in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 (* *p* < 0,05).

Tabelle 7: Relative Änderung der mRNA-Expression der *in silico* ermittelten Gene nach Transfektion mit Smad7-siRNA im Vergleich zur Transfektion mit SCR-siRNA.

mRNA-Expression [%; Referenzbereich]	Zelllinie		
	BxPC-3	CAPAN-1	PANC-1
<i>CASP7</i>	146,7 (± 104,6)	108,4 (± 18,6)	118,3 (± 21,2)
Relative Änderung [%]	+ 46,7	+ 8,4	+ 18,3
<i>p</i>	0,5	0,5	0,3
<i>CDC25A</i>	110,8 (± 38,3)	96,8 (±33,01)	106,8 (± 27,4)
Relative Änderung [%]	+ 10,8	- 3,2	+ 6,8
<i>p</i>	0,7	0,9	0,7
<i>E2F8</i>	111 (± 30,9)	88,6 (± 46,3)	110,9 (± 52,2)
Relative Änderung [%]	+ 11	- 11,4	+ 10,9
<i>p</i>	0,6	0,7	0,75
<i>MAP3K3</i>	70,9 (± 11,6)	117,9 (± 59,2)	73,4 (± 20,2)
Relative Änderung [%]	- 29,1	+ 17,9	- 26,6
<i>p</i>	< 0,05	0,7	0,2
<i>MAPK3</i>	85,4 (± 22,3)	74,8 (± 35,2)	79,7 (± 18,1)
Relative Änderung [%]	- 14,6	- 25,2	- 20,3
<i>p</i>	0,4	0,3	0,2
<i>PDPK1</i>	70,2 (± 9,3)	104,9 (± 8,8)	71,7 (± 11,7)
Relative Änderung [%]	- 29,8	+ 4,9	- 28,3
<i>p</i>	< 0,05	0,4	= 0,05
<i>STAT5A</i>	80,8 (± 17,6)	101,8 (± 13,71)	89,8 (± 22,1)
Relative Änderung [%]	- 19,2	+ 1,8	- 10,2
<i>p</i>	0,3	0,8	0,5
<i>TP53</i>	87,8 (± 7,5)	173,7 (± 1,2)	68,5 (± 1,1)
Relative Änderung [%]	- 12,2	+ 73,7	- 31,5
<i>p</i>	< 0,05	0,4	< 0,05
<i>TP53BP1</i>	78,8 (± 13,8)	108,6 (± 38,1)	75,4 (± 15,6)
Relative Änderung [%]	- 21,2	+ 8,6	- 24,6
<i>p</i>	0,1	0,7	< 0,05
<i>VEGFB</i>	80,9 (± 15,2)	112,6 (± 25,5)	89,8 (± 21,7)
Relative Änderung [%]	- 19,1	+ 12,6	- 10,2
<i>p</i>	0,2	0,5	0,5

4.6 Auswirkungen der Stimulierung mit rekombinantem TGF-β1 auf die TGF-β-Signalkaskade und VEGFB in der PDAC-Zelllinie PANC-1

Nach der Stimulation der Zelllinie PANC-1 mit rekombinantem TGF-β1 konnte nach 30 Minuten eine tendenziell erhöhte Smad7-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant (202,1 ± 52,0 %, *p* = 0,07; 161,9 ± 43,6 %, *p* = 0,1). Infolge der Inhibierung der MEK1/2-Phosphorylierung durch U0126 konnte keine signifikante Veränderung der Smad7-Expression auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. Nach alleiniger Inkubation mit U0126 konnte keine signifikante Veränderung sowohl der SMAD7-mRNA-Expression als auch der Smad7-Proteinexpression nachgewiesen werden (Tab. 8, Abb. 18).

Tabelle 8: Relative Änderung der mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in der PDAC-Zelllinie PANC-1 30 Minuten nach Stimulation mit rekombinanten TGF- β 1.

	SMAD7-mRNA-Expression [% , Referenzbereich]	Smad7-Proteinexpression [% , Referenzbereich]
DSMO-Kontrolle	100 (\pm 0)	100 (\pm 0)
Relative Änderung [%]	\pm 0	\pm 0
Medium-Kontrolle	142,1 (\pm 38,5)	82,6 (\pm 1,5)
Relative Änderung [%]	+ 42,1	- 17,4
<i>p</i>	0,2	0,2
U0126	160,9 (\pm 45,5)	78,4 (\pm 24,6)
Relative Änderung [%]	+ 60,9	- 21,6
<i>p</i>	0,2	0,3
TGF- β 1	202,1 (\pm 51,9)	161,99 (\pm 43,6)
Relative Änderung [%]	+ 102,1	+ 61,99
<i>p</i>	0,07	0,1
TGF- β 1 + U0126	335,2 (\pm 190,07)	138,7 (\pm 76,3)
Relative Änderung [%]	+ 235,2	+ 38,7
<i>p</i>	0,2	0,5

Auf mRNA- und Proteinebene konnte 72 Stunden nach der TGF- β 1-Stimulation ebenfalls eine tendenziell erhöhte Smad7-Expression nachgewiesen werden, diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 9, Abb. 18).

Tabelle 9: Relative Änderung der mRNA- und Proteinexpression von Smad7 in der PDAC-Zelllinie PANC-1 72 Stunden nach Stimulation mit TGF- β 1.

	SMAD7-mRNA-Expression [% , Referenzbereich]	Smad7-Proteinexpression [% , Referenzbereich]
DSMO-Kontrolle	100 (\pm 0)	100 (\pm 0)
Relative Änderung [%]	\pm 0	\pm 0
Medium-Kontrolle	164,8 (\pm 80,9)	118,9 (\pm 39,8)
Relative Änderung [%]	+ 64,8	+ 18,9
<i>p</i>	0,6	0,5
U0126	176 (\pm 106,7)	111,3 (\pm 25,7)
Relative Änderung [%]	+ 76	+ 11,3
<i>p</i>	0,3	0,5
TGF- β 1	333,1 (\pm 204,8)	112,5 (\pm 18,1)
Relative Änderung [%]	+ 233,1	+ 12,5
<i>p</i>	0,2	0,4
TGF- β 1 + U0126	356,3 (\pm 250,6)	56,6 (\pm 29,2)
Relative Änderung [%]	+ 256,3	- 43,4
<i>p</i>	0,2	0,06

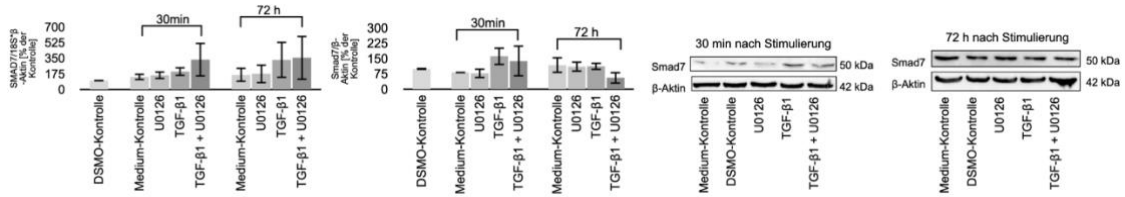


Abbildung 18: Darstellung der Smad7-Expression nach Stimulierung mit rekombinantem TGF-β1 auf mRNA- und Proteinebene nach 30 min und 72 h.

Es zeigte sich, 30 Minuten nach der Stimulierung mit rekombinantem TGF-β1, keine signifikanten Veränderungen der Smad4-Expression weder auf mRNA- noch auf Proteinebene. Nach Stimulation mit rekombinantem TGF-β1 konnte nach 72 Stunden eine tendenzielle Abnahme der Proteinexpression von Smad4 nachgewiesen werden, jedoch ohne statistische Signifikanz ($54,5 \pm 25,5 \%$, $p = 0,09$; Abb. 19).

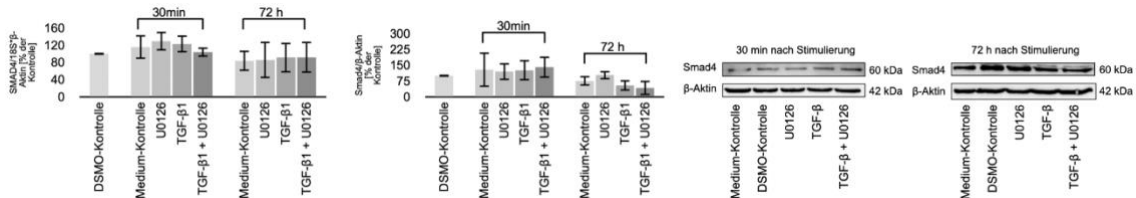


Abbildung 19: Darstellung der Smad4-Expression nach Stimulierung mit rekombinantem TGF-β1 auf mRNA- und Proteinebene nach 30 min und 72 h.

Die Stimulation mit rekombinantem TGF-β1 führte in der Zelllinie PANC-1 nach 30 Minuten zu einer um 36 % erhöhten Expression der *TGFBR1*-mRNA ($136,1 \pm 11,2 \%$, $p = 0,03$). Eine Inkubation mit U0126 oder eine kombinierte Behandlung mit TGF-β1 und U0126 zeigte nach 30 Minuten bzw. nach 72 Stunden keine weiteren signifikanten Veränderungen in der Zelllinie PANC-1 (Abb. 20).

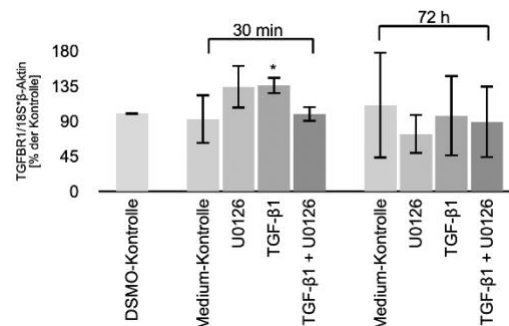


Abbildung 20: Auswirkung der Stimulierung mit rekombinantem TGF-β1 auf die mRNA-Expression von *TGFBR1*.

In der Zelllinie PANC-1 wurden nach Stimulation mit TGF- β 1, Inkubation mit U0126 oder deren Kombination keine signifikanten Veränderungen der *AKT1*- und *RHOA*-mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach 30 Minuten und 72 Stunden festgestellt (Abb. 21).

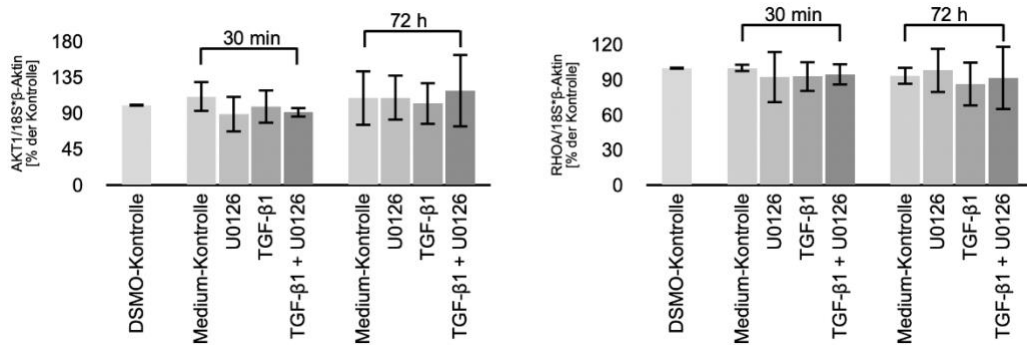


Abbildung 21: Auswirkung der TGF- β 1-Stimulierung auf die mRNA-Expression von *AKT1* und *RHOA* (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Auch die *VEGFB*-mRNA-Expression in der Zelllinie PANC-1 zeigte weder nach TGF- β 1-Stimulation noch nach Inkubation mit U0126 oder deren Kombination signifikante Veränderungen nach 30 Minuten sowie nach 72 Stunden (Abb. 22).

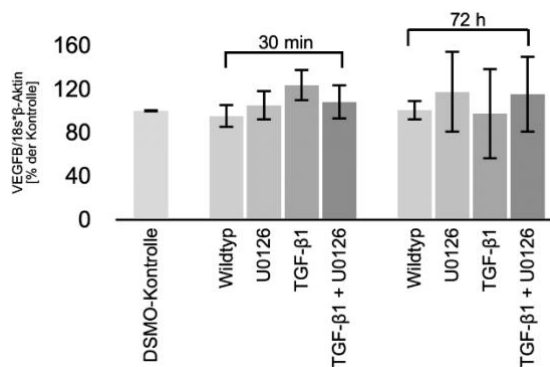


Abbildung 22: Auswirkung der Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 auf die *VEGFB*-mRNA-Expression in der Zelllinie PANC-1.

4.6.1 Auswirkungen der TGF- β 1-Stimulierung auf die MAP-Signalkaskade

Die Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1 in Kombination mit einer Inkubation mit U0126 führte nach 30 Minuten zu einer Reduktion der *MAPK3*-mRNA-Expression um 17,6 % (auf $82,4 \pm 6,7$ %, $p = 0,05$). Dieser Effekt war auch nach 72 Stunden noch nachweisbar ($82,7 \pm 6,9$ %, $p = 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich ebenfalls eine verminderte Expression der *MAPK3*-mRNA nach alleiniger Transfektion mit U0126 sowie nach alleiniger Stimulation mit TGF- β 1, jedoch ohne statistische Signifikanz ($81,2 \pm 10,5$ %, $p = 0,09$; $69,0 \pm 14,0$ %, $p = 0,06$). Die mRNA-Expression

von *MAP3K3* war 30 Minuten nach der Stimulation mit TGF- β 1 in Kombination mit U0126 ebenfalls reduziert; dieses Ergebnis war statistisch nicht signifikant ($86,5 \pm 24,1 \%$, $p = 0,4$). Nach 72 Stunden scheint sich die *MAP3K3*-Expression wieder zu normalisieren ($121,6 \pm 42,3 \%$, $p = 0,5$). Weiterhin zeigte sich nach 30 Minuten eine tendenziell erhöhte *MAP3K3*-mRNA-Expression nach jeweils alleiniger Stimulation mit U0126 oder TGF- β 1 ($115,2 \pm 16,3 \%$, $p = 0,2$; $135,9 \pm 23,6 \%$, $p = 0,1$; Abb. 23). Auf Proteinebene konnte eine starke Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 durch U0126 nach 30 Minuten nachgewiesen werden ($2,5 \pm 0,8 \%$, $p < 0,001$). Dieser Effekt zeigte sich tendenziell auch nach Kombination mit rekombinantem TGF- β 1 ($57,5 \pm 20,6$, $p = 0,07$). Nach 72 Stunden war dieser Effekt auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar. Die nicht-phosphorylierte Form der ERK1/2-Kinase zeigte nach Stimulation mit TGF- β 1 und Inkubation mit U0126 weder nach 30 Minuten noch nach 72 Stunden eine signifikante Veränderung ihrer Expression (Abb. 23).

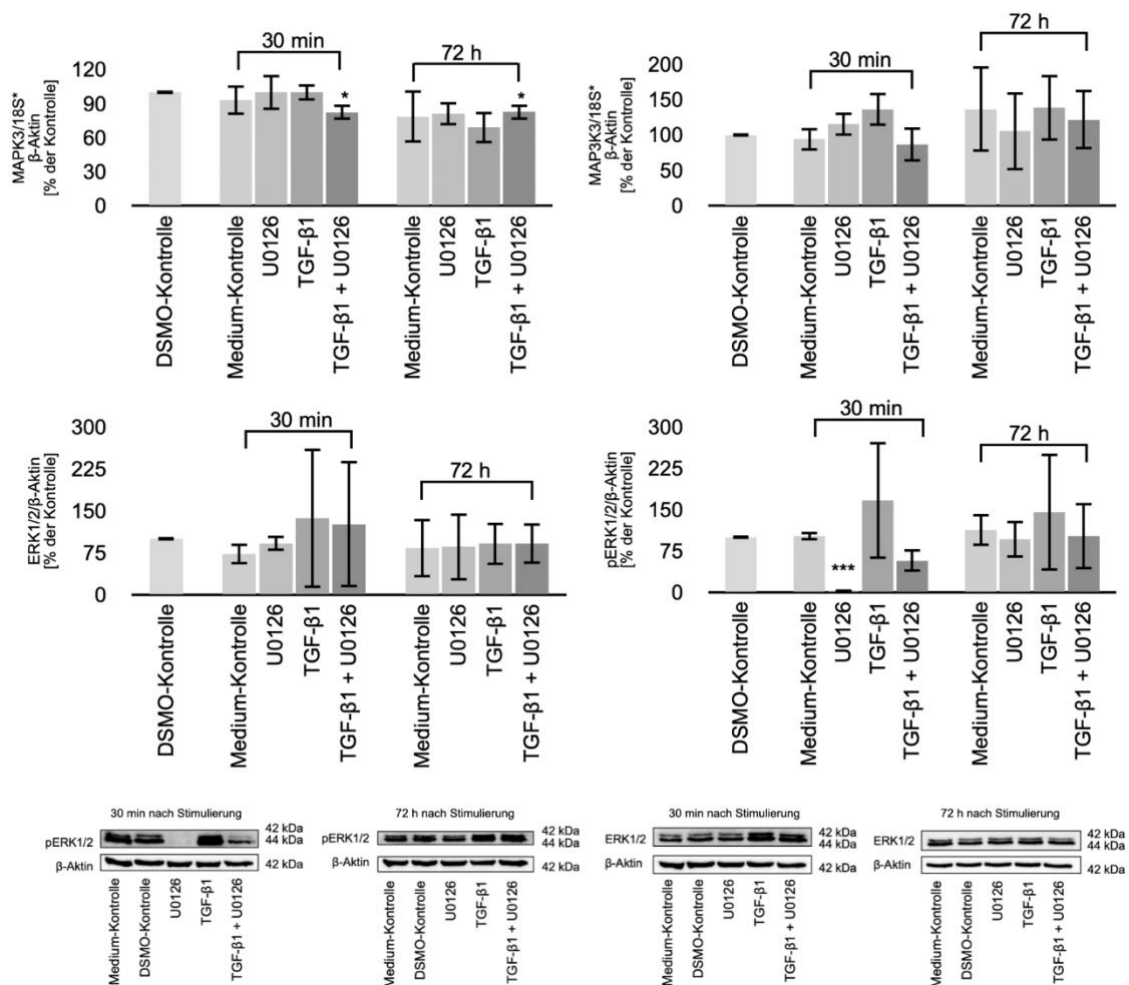


Abbildung 23: Auswirkung der TGF- β 1-Stimulation auf die MAP-Signalkaskade in der Zelllinie PANC-1 auf mRNA- und Proteinebene (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

5 Diskussion

Eine Überexpression des inhibitorischen Smad7 wurde bereits in der Literatur bei verschiedenen malignen Tumoren, wie dem Ösophaguskarzinom, dem Magenkarzinom und dem kolorektalen Karzinom beobachtet [97]. Im Falle des PDAC wurde eine erhöhte Expression des inhibitorischen Smad7 festgestellt, die im Rahmen seiner dichotomen Eigenschaft als Tumorsuppressor und Onkogen mit gesteigerter Tumorgenität einherging [113]. Darüber hinaus gilt der TGF- β -Signalweg als einer der wichtigsten pathophysiologischen Faktoren bei der Entstehung und Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas [6]. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Smad7 auf die TGF- β -Signaltransduktion im PDAC zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde durch verschiedene Methoden der Nachweis einer Überexpression von Smad7 im PDAC erbracht. Es konnte dabei eine 3,5-fach erhöhte mRNA-Expression von *SMAD7* im PDAC im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe nachgewiesen werden. Damit bestätigt diese Arbeit die bereits vorhandene Studienlage mit einem größeren Patientenkollektiv auf mRNA-Ebene [113,117]. Erstmals konnte eine erhöhte Expression von *SMAD7*-mRNA im PDAC im Vergleich zu Gewebe mit CP gezeigt werden. Allerdings konnten keine, statistisch signifikanten, Unterschiede in der *SMAD7*-mRNA-Expression zwischen den einzelnen Tumorstadien T1 bis T4 gezeigt werden. Dies ist wahrscheinlich auf das kleine Studienkollektiv zurückzuführen, da die Teststärke nicht ausreicht, um einen solchen Effekt nachzuweisen. Weitere Analysen mit einer ausreichend großen Versuchspopulation sind notwendig, um eine stadienabhängige Smad7-Expression zu untersuchen.

Immunhistochemisch konnten die vorangegangenen Ergebnisse dieser Studie auf Ebene der mRNA und auch auf Proteinebene bestätigt werden. So konnte in dieser Arbeit ein starkes Anfärben von Smad7 in Karzinom- und Stromazellen mit einem starken zytoplasmatischen und moderaten nukleären Expressionsmuster, in PDAC-Geweben im Gegensatz zu npG, gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen ebenfalls im Einklang mit der aktuellen Literatur [117,155]. Allerdings zeigte die Hälfte des von Singh et al. untersuchten Studienkollektivs keine Smad7-Expression [155]. Dieses Ergebnis konnte in der eigenen Untersuchung weder auf mRNA- noch auf Proteinebene reproduziert werden. So ließ sich in allen in dieser Studie untersuchten PDAC-Geweben ein Nachweis von Smad7 erbringen. Dabei ist zu beachten, dass das eigene untersuchte Studienkollektiv deutlich mehr G2- und G3-klassifizierte Karzinome umfasste als das von Singh et al. analysierte Gewebe [155]. Weiterhin können diese unterschiedlichen Ergebnisse durch untersucherabhängige Einflussfaktoren sowie durch Unterschiede der verwendeten Materialien, insbesondere der Antikörper, bedingt

sein. Der in der eigenen Studie verwendete Score zur Beurteilung immunhistochemischer Färbungen ist aufgrund der untersucherabhängigen Beurteilung fehleranfällig. Der Proteinnachweis von Smad7 in der eigenen Studie bestätigt jedoch die Ergebnisse von Kim et al., die ebenfalls eine erhöhte Expression von Smad7 im Zytoplasma maligner Zellen des Magenkarzinoms nachweisen konnten [156]. Die zytoplasmatische Lokalisation spricht, wie Ito et al. zeigen konnten, für das Vorliegen von Smad7 in seiner aktiven Form [96]. Folglich ist daher zu diskutieren, ob die erhöhte Smad7-Expression beim PDAC durch den negativen Feedback-Mechanismus des TGF- β -Signalweges bedingt ist und somit eine physiologische Reaktion auf das Tumorstadium darstellt. Dies wurde bereits von Osawa et al. für das Ösophaguskarzinom postuliert [157]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die im Vergleich zu npG deutlich erhöhte *SMAD7*-mRNA-Expression in malignem Gewebe. Allerdings ist zu beachten, dass in der hier vorliegenden Studie auch in Geweben mit chronischer Pankreatitis, die als mögliche Karzinomvorstufe gilt, eine erhöhte Expression von *SMAD7*-mRNA nachgewiesen wurde. Somit ist auch eine Funktion von Smad7 als Tumorpromotor zu diskutieren. Folglich sollte in weiteren Arbeiten das Wachstumsverhalten von PDAC-Zellen unter Smad7-Einfluss untersucht werden, um zwischen einer tumorsuppressiven oder einer karzinomfördernden Funktion von Smad7 zu differenzieren.

Weiterhin konnte Smad7 im eigenen Patientenkollektiv und in den etablierten PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 sowie PANC-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ergänzen die bisherigen Untersuchungsergebnisse und validieren die Ergebnisse von Kleeff et al. [113]. Es ist zu beachten, dass alle drei untersuchten Zelllinien aus Tumorgeweben isoliert wurden, wobei PANC-1 und BxPC-3 aus einem Primärtumor und CAPAN-1 aus einer Lebermetastase eines PDAC stammen. Somit wurde nur die pathologische Zellbiologie des PDAC untersucht, jedoch weder Vorläuferläsionen noch npG analysiert. Die Expression von Smad7 konnte bereits in Zelllinien anderer maligner Tumoren, wie dem Kolonkarzinom und dem Schilddrüsenkarzinom gezeigt werden [115,158]. Somit wurde eine Expression von Smad7 in Zelllinien verschiedener maligner Tumoren nachgewiesen, was die Hypothese einer physiologischen Reaktion von Smad7 im Rahmen des negativen Feedback-Mechanismus des TGF- β -Signalweges auf ein malignes Geschehen unterstützt.

Um die Rolle des inhibitorischen Smad7 im PDAC näher zu evaluieren, war es das Ziel, mögliche „Partner“ von Smad7 zu identifizieren. So ist eine Interaktion von Smad7 mit dem NF- κ B-Signalweg bereits aus der Literatur bekannt [62]. Für einen solchen Nachweis eignen sich unter anderem Genomexpressionsanalysen und

Genomsequenzierungen. Mit diesen Methoden ist es möglich, das gesamte Genom eines Gewebes zu untersuchen und so eine Aussage über die quantitative Genexpression zu treffen. Aufgrund sinkender Kosten und der damit einhergehenden zunehmenden Etablierung dieser Methoden sind immer mehr genetische Analysen von malignen Geweben verfügbar [159]. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit in-silico-Analysen weiterführende in-vitro-Studien vorbereiten und somit wichtige Erkenntnisse für die Karzinomforschung liefern können. Um diese Frage zu beantworten, wurde in einer eigenen Untersuchung eine in-silico-Analyse der mRNA-Expressionsdaten der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie (TCGA) des Broad Institute durchgeführt, die über das cBioPortal abrufbar ist. Das cBioPortal des Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center stellt Genomanalysen verschiedenster Studien und Malignome der Forschungsgemeinschaft frei zur Verfügung und ermöglicht so weitere translationale Forschung [152]. Die Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie (TCGA) umfasst mRNA-Expressionsdaten von 169 Gewebeproben mit nachgewiesenem PDAC. Die Normalisierung der mRNA-Daten erfolgte nach dem RSEM-Prinzip mit einem Z-Score von 2,0, wobei der Z-Score die Standardabweichung des gemessenen Wertes von der Referenzgruppe angibt. Dadurch ist es einerseits möglich, die Analyse auf Gene zu konzentrieren deren Expression deutlich vom Mittelwert abweicht und möglicherweise über eine Ko-Expression hinausgeht, andererseits werden Gene mit einer geringeren Standardabweichung nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse spiegeln somit nur die Ausreißer im Untersuchungskollektiv wider. Ein weiterer einschränkender Faktor ist, dass die erhobenen Daten nicht immer einer Normalverteilung folgen, jedoch zur Vereinfachung eine Normalverteilung nach Pearson angenommen wurde. Dies hat zur Folge, dass der gewählte Z-Score weniger zuverlässig ist und folglich falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse möglich sind. Dieser Fehler tritt vor allem bei bimodal verteilten Daten auf und kann auch durch eine Logarithmierung der Daten nicht vollständig ausgeschlossen werden. In der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie wurde die durchschnittliche *SMAD7*-mRNA-Expression in allen diploiden Zellen der untersuchten Population als Referenz verwendet. Ein Vergleich mit nicht-pathologisch verändertem Gewebe war aufgrund des Fehlens von normalem Pankreasgewebe nicht möglich. Somit ist in der hier durchgeführten Studie von einem veränderten Mittelwert im Vergleich zu npG auszugehen. Darüber hinaus können in der multizentrischen Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie Unterschiede in der Patientenpopulation nicht sicher ausgeschlossen werden. Eine generelle Aussage zum Expressionsverhalten von *SMAD7* in der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie ist daher methodenbedingt nicht möglich, jedoch zeigen die Daten eine Tendenz zu einer veränderten *Smad7*-Expression im PDAC. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. In der

Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie waren fortgeschrittene Karzinome im Rahmen eines T3-Stadiums und G2-Gradings, sowie eine lokoregionäre Ausbreitung im Sinne eines N1-Stadiums am häufigsten. Damit entspricht das untersuchte Studienkollektiv dem klinischen Bild eines fortgeschrittenen PDAC bei Diagnosestellung und ähnelt dem eigenen Patientenkollektiv. Im Rahmen der in-silico-Analyse konnte eine veränderte *SMAD7*-mRNA-Expression in einer von zehn Gewebeproben sowie ein überwiegend verminderter *SMAD7*-Spiegel in frühen Tumorstadien nachgewiesen werden. Im eigenen Patientenkollektiv konnte eine erhöhte *SMAD7*-Expression in fortgeschrittenen Karzinomen gezeigt werden. Zu beachten ist, dass für die Genomanalyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie jeweils die gesamte Gewebeprobe verwendet wurde. Somit ist es auch möglich, nicht-pathologisch verändertes Gewebe aus Randbereichen des Tumors mit einzubeziehen. Weiterhin enthielten die untersuchten Gewebeproben aus der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie neben Karzinomzellen des malignen Gewebes auch andere Zellen, wie z. B. Fibroblasten oder Stromazellen. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob Smad7 auch im PDAC als physiologischer Tumorsuppressor fungiert und das Tumorwachstum reduzieren kann. Diese Hypothese wird durch den quantitativen Anstieg der Smad7-Expression in fortgeschrittenen Karzinomen als physiologische Reaktion auf das gesteigerte Tumorwachstum unterstützt. Allerdings wird auch eine pathologische Funktion von Smad7 als Tumorpromotor diskutiert. So konnte bereits bei der chronischen Pankreatitis, die als Präkanzerose für das PDAC gilt, eine erhöhte Expression von Smad7 nachgewiesen werden. Um zwischen einer physiologischen und einer tumorpromotorischen Funktion von Smad7 im PDAC zu unterscheiden, sind weitere funktionelle Untersuchungen notwendig. So sollte unter anderem der Einfluss einer unterschiedlichen Expression von Smad7 auf das Zellwachstum und die Invasivität der Tumorzellen untersucht werden. Weiterhin sollte die Rolle von Smad7 bei der Transformation einer chronischen Pankreatitis in ein invasives Adenokarzinom des Pankreas untersucht werden.

Neben dem inhibitorischen Smad7 sind weitere Smads an der intrazellulären Signaltransduktion des TGF- β -Signalweges beteiligt, unter anderem Smad2 und Smad4. Eine Mutation des als Tumorsuppressor geltenden Co-Smad4 ist eine der häufigsten Alternationen im PDAC [5]. Eine Inaktivitätsmutation von Smad4 ist in mehr als der Hälfte aller Pankreaskarzinome nachweisbar und mit einem signifikant schlechteren Outcome assoziiert [160]. Zudem gilt Smad4 als Transkriptionsregulator für Smad7 [161]. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich in einem Viertel der *in silico* untersuchten Karzinome eine verminderte mRNA-Expression von *SMAD4*. Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von

SMAD4 und *SMAD7* *in silico* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen bereits vorliegende Untersuchungen [155]. Wie bereits in der Literatur beschrieben, spricht dies für eine ähnliche Regulation der Proteine auch im PDAC [90]. Neben Smad4 spielt auch das R-Smad 2 eine wichtige Rolle im kanonischen TGF- β -Signalweg [59]. Im Rahmen der in-silico-Analyse in dieser Studie konnte erstmals eine signifikante, stark positive Korrelation der mRNA-Expressionen von *SMAD2* und *SMAD7* im PDAC gezeigt werden. Weiterhin konnte in der Zelllinie PANC-1 eine deutlich verminderte mRNA-Expression von *SMAD2* und *SMAD4* nach Reduktion der endogenen Smad7-Expression durch RNA-Interferenz erzielt werden. Eine Beteiligung von Smad2 an der TGF- β -abhängigen Induktion von Smad7 konnte bereits in Zelllinien mit humanen, nicht-pathologisch veränderten Leberzellen gezeigt werden [162]. Die bereits in der Literatur beschriebene und durch die vorliegende in-silico-Analyse gestützte Hypothese einer Interaktion von Smad2 und Smad4 mit Smad7 im PDAC konnte somit durch die eigene in-vitro-Untersuchung bekräftigt werden. Dies unterstützt die bereits in der Literatur aufgestellte These einer ähnlichen Regulation von trotz struktureller Unterschiede [161]. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese einer physiologisch erhöhten Smad7-Expression zur Inhibierung des TGF- β -Signalweges als Folge einer erhöhten TGF- β -Stimulation der Tumorzelle. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass nur in der Zelllinie PANC-1 eine Veränderung der *SMAD2*- und *SMAD4*-mRNA-Expression nach Smad7-siRNA beobachtet wurde. Dies kann durch die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien, Primärtumor und Lebermetastase, bedingt sein. Zudem liegt in den Zelllinien CAPAN-1 und BxPC-3 eine *SMAD4*-Mutation vor, die zu einer fehlenden Regulation durch Smad7 führen könnte.

Um die kanonische TGF- β -Signalkaskade zu unterbrechen, ist der TGF- β R1 das Hauptziel des inhibierenden Smad7 [50,95]. Dies geschieht zum einen durch die Hemmung der R-Smad-Phosphorylierung, zum anderen durch eine Degradation des TGF- β R1 über eine Smad7-abhängige SMURF-Aktivierung [60,90,163]. Als Folge eines mutierten TGF- β R1 kommt es zu einer deutlichen Reduktion der TGF- β -Signaltransduktion und der TGF- β -induzierten Genexpression [164]. Solche Mutationen des TGF- β R1 konnten in verschiedenen Karzinomen, wie dem Ösophagus- und dem Ovarialkarzinom, nachgewiesen werden [86]. Beim PDAC ist eine erhöhte TGF- β R1-Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert [165]. In nicht-pathologisch veränderten Granulosazellen konnten Yao et al. eine deutlich erhöhte TGF- β R1-Expression nach Smad7-Knockdown nachweisen [166]. In der eigenen Studie hingegen führte ein Smad7-Knockdown zu einer deutlich verminderten *TGFB1*-mRNA-Expression in den PDAC-Zelllinien BxPC-3 und PANC-1. Diese Ergebnisse der eigenen Studie deuten somit auf eine veränderte Interaktion zwischen

Smad7 und dem TGF- β R1 im Pankreaskarzinom hin, die zu einer Modifikation des negativen Feedbackmechanismus führt. Demnach wäre ein vermindertes Tumorwachstum bei niedrigen Smad7-Spiegeln zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch mehrfach eine erhöhte Expression von Smad7 im PDAC nachgewiesen. Daher ist zu diskutieren, ob die gesteigerte Smad7-Expression über eine erhöhte *TGFBR1*-mRNA-Expression zu einem gesteigerten Tumorwachstum führt und Smad7 konsekutiv als Tumorpromotor im PDAC fungiert. Um die Interaktion zwischen Smad7 und dem TGF- β R1 im PDAC besser zu verstehen, sind daher weitere Untersuchungen notwendig. So sollten zum einen die Folgen einer Überexpression von Smad7 auf die TGF- β R1-Expression sowie die Auswirkungen auf die Zellproliferation und -migration untersucht werden.

Neben der kanonischen Signaltransduktion wurden in dieser Studie auch zwei Zielgene der nicht-kanonischen TGF- β -Signalkaskade im Rahmen der in-silico-Analyse untersucht. Dies ist zum einen die Rho-GTPase *RHOA*, die in Prostatakarzinomzellen sowohl TGF- β als auch Smad7 aktiviert [167]. Diese Studie von Edlund et al. deutet auf eine mögliche Interaktion von Smad7 mit GTPasen hin [167]. In der eigenen molekularbiologischen Untersuchung konnte nach Transfektion mit Smad7-siRNA eine signifikante Reduktion der *RHOA*-mRNA-Expression in PANC-1-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in der in-silico-Analyse keine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *RHOA* und *SMAD7* gezeigt werden. Diese abweichenden Ergebnisse können zum einen methodisch durch den gewählten Z-Score von 2,0 in der in-silico-Analyse bedingt sein, da dieser nur Ausreißer berücksichtigt, zum anderen sind aber auch unspezifische Effekte der siRNA als limitierend zu berücksichtigen, obwohl das durch siRNA erzielte „Gene silencing“ als sehr spezifisch beschrieben wird [168]. So kann eine Überexpression oder eine Suppression von Nicht-Zielgenen trotz Verwendung einer Kontroll-siRNA nicht sicher ausgeschlossen werden [169]. Für ein genaues Verständnis einer möglichen Interaktion zwischen *RHOA* und *SMAD7* sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Als weiteres Target des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges wurde die Serin/Threonin-Proteinkinase *AKT1* untersucht. In der eigenen in-vitro-Studie konnte nach Smad7-Knockdown durch siRNA eine signifikante Reduktion der *AKT1*-mRNA-Expression in PANC-1-Zellen gezeigt werden. Während dieses Ergebnis für eine mögliche Interaktion von *AKT1* und *SMAD7* spricht, zeigte sich in der in-silico-Analyse keine signifikante Korrelation zwischen den mRNA-Expressionen von *AKT1* und *SMAD7*. Der fehlende Nachweis einer signifikanten Korrelation in der in-silico-Analyse kann auch auf eine mangelnde Studienpower zurückzuführen sein. Auch Off-Target-Effekte im Sinne von Kreuzreaktionen mit Sequenzen von

Nicht-Zielgenen im Rahmen der RNA-Interferenz sind möglich. Das Ergebnis der siRNA-Untersuchung kann daher auf eine mögliche Interaktion von Smad7 mit *AKT1* hinweisen, die weiteren Untersuchungen bedarf.

Die weiterhin durchgeführte in-silico-Korrelationsanalyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie zeigte signifikante Veränderungen zwischen der mRNA-Expression von *SMAD7* und *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAPK3*, *MAP3K3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* sowie *VEGFB*.

Die Effektor-Caspase 7 (*CASP7*), die zur Steuerung der Zellapoptose dient, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen als Teil der Tumorgenese verschiedener Karzinome beschrieben: So konnten inaktivierende Genmutationen von *CASP7* als unterstützende Faktoren in der Karzinogenese des Zervixkarzinoms und des Magenkarzinoms identifiziert werden [170,171]. Weiterhin wurden durch Genomanalysen ein schlechteres Überleben von Patienten mit *CASP7*-Polymorphismen im kolorektalem Karzinom nachgewiesen [172]. Auch im PDAC wurden bereits verschiedene Genvarianten von *CASP7* beschrieben [173]. Dies deutet auf weitere, bisher im PDAC unzureichend untersuchte Gene hin. Die in der eigenen Studie durchgeführte in-silico-Analyse zeigte eine negative Korrelation zwischen der *CASP7*- und *SMAD7*-mRNA-Expression. Konträr hierzu konnte im eigenen Patientenkollektiv keine signifikante Korrelation zwischen der Genexpression von *CASP7* und *SMAD7* nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in den siRNA-Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der *CASP7*-mRNA-Expression nach Smad7-Knockdown gezeigt werden. Somit konnten die Ergebnisse der in-silico-Analyse *in vitro* nicht reproduziert werden. Dies kann zum einen durch einen falsch positiven Nachweis einer Korrelation bei Vorliegen einer Koexpression in der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie bedingt sein. Zum anderen ist ein fehlender Effektnachweis aufgrund der geringen Stichprobengröße im eigenen Patientenkollektiv möglich.

Die Phosphatase Cdc25A spielt sowohl bei der Zellproliferation als auch bei der Zellapoptose eine wichtige Rolle [174]. Eine Überexpression von Cdc25A ist in verschiedenen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert, z. B. beim hepatozellulärem Karzinom [175,176]. Diese Überexpression wird hauptsächlich durch eine transkriptionelle und posttranslationale Dysregulation verursacht, die durch eine Mutation des *TP53*-Onkogenes hervorgerufen wird [175]. Im Gegensatz dazu konnte in humanen Pankreaskarzinomzelllinien eine verminderte Cdc25A-Proteinexpression nachgewiesen werden, die eine zelluläre Antwort auf die tumorinduzierte Hyperproliferation des PDAC darstellen könnte [177]. In der eigenen in-silico-Analyse konnte eine inverse Korrelation der mRNA-Expression von *SMAD7* und *CDC25A*

nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden durch die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Stolfi et al. gestützt, die eine niedrigere Expression von CDC25A in Smad7-defizienten kolorektalen Karzinomzellen nachweisen konnten [178]. Im Gegensatz dazu konnte in der Untersuchung des eigenen Patientenkollektivs eine schwach positive Korrelation zwischen der *SMAD7*- und *CDC25A*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Jedoch führte der Knockdown von Smad7 mittels siRNA zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Expression von *CDC25A* in PDAC-Zelllinien. Einerseits kann aufgrund der Literatur, der eigenen in-silico-Analyse sowie der Untersuchung des eigenen Patientenkollektivs ein Zusammenhang zwischen der Expression von Cdc25A und Smad7 vermutet werden. Der Knockdown von Smad7 durch siRNA konnte diesen möglichen Zusammenhang hingegen nicht bestätigen, was den Verdacht nahelegt, dass weitere, bisher nicht untersuchte Faktoren das Ergebnis beeinflussen. Weiterhin könnten der nur transiente Knockdown von Smad7 durch die siRNA sowie parakrine Effekte zu diesen abweichenden Ergebnissen geführt haben. Weitere Untersuchungen sind daher wünschenswert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Smad7 und Cdc25a näher zu untersuchen.

Als Transkriptionsfaktor spielt E2F8 eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und Tumorprogression in verschiedenen Karzinomen [179]. So führte eine verminderte Expression von E2F8 in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien zu einer Inhibition des Tumorwachstums [180]. Darüber hinaus konnte in humanen Geweben mit kolorektalem Karzinom eine stadienabhängig erhöhte Expression von E2F8 nachgewiesen werden [181]. Im hepatozellulärem Karzinom korrelierte eine erhöhte Expression von E2F8 mit einem schlechteren Überleben [182]. Für den verwandten Transkriptionsfaktor E2F1 wurde bereits eine Funktion als Tumorpromotor im PDAC beschrieben [183]. Zudem wurde hier bereits ein therapeutischer Ansatz vorgestellt, da Zellen mit einer E2F1-Überexpression eine gesteigerte Apoptose bei Behandlung mit Gemcitabin zeigen [184]. Dies wurde für E2F8 im PDAC bisher nicht untersucht. Der in der eigenen Studie erbrachte Nachweis einer negativen Korrelation zwischen der *E2F8*- und *SMAD7*-mRNA-Expression in der in-silico-Analyse könnte auch für dieses Gen auf eine bisher nicht beschriebene Rolle im PDAC hinweisen. Limitierend ist anzumerken, dass trotz einer Normalisierung der mRNA-Daten nach dem RSEM-Prinzip mit einem Z-Score von 2,0 falsch-positive Ergebnisse methodenbedingt nicht ausgeschlossen werden können. Die Reduktion der endogenen Smad7-Expression durch siRNA führte zu keiner signifikanten Veränderung der *E2F8*-mRNA-Expression. Hierbei ist jedoch der nur transiente Knockdown durch RNA-Interferenz zu berücksichtigen, der weiterhin von der Proliferationsrate der Zelllinie abhängig ist [185]. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der verwendeten PDAC-Zelllinien sowie der

kurzen Halbwertszeit von E2F8 ist es daher möglich, dass dieser Effekt nicht nachgewiesen werden konnte [186].

Die MAP-Kinasen sind dreistufige, hochkonservierte Serin/Threonin-Proteinkinasen, die nach extrazellulären Stimuli wie Mitogenen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen über eine Phosphorylierungskaskade Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktivieren und dadurch vielfältige zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Zellzyklus, und Apoptose regulieren [121]. Die zur Familie der MAP-Kinasen gehörende *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase 3* (MAP3K3) wird ubiquitär in Geweben exprimiert und ist an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt [187]. So konnte für die MAP3K3 eine Beteiligung an der Tumorprogression und Metastasierung bei verschiedenen Karzinomen gezeigt werden [188]. Beim Ovarialkarzinom ist eine Überexpression von MAP3K3 mit einem schlechteren Outcome assoziiert [189]. Auch beim Ösophaguskarzinom konnte ein vermindertes Überleben bei veränderter MAP3K3-Expression gezeigt werden [190]. In PDAC-Zelllinien wurde eine reduzierte epithelial-mesenchymale Transition sowie eine *yes associated protein*-induzierte Zellmigration nach MAP3K3-Knockdown nachgewiesen [191]. Basierend auf dieser Studienlage erfolgte eine Korrelationsanalyse der *MAP3K3*- bzw. *MAPK3*- und *SMAD7*-mRNA-Expression. Sowohl in der durchgeführten in-silico-Analyse als auch im eigenen Patientenkollektiv konnte eine Korrelation der mRNA-Expression von *MAP3K3* bzw. *MAPK3* und *SMAD7* nachgewiesen werden. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch eine signifikante Reduktion der *MAP3K3*-mRNA-Expression nach einem *Smad7*-Knockdown mittels siRNA in der Pankreaskrebszelllinie BxPC-3. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass dieser Effekt nur in der Zelllinie BxPC-3, nicht jedoch in den Zelllinien CAPAN-1 und PANC-1 nachgewiesen werden konnte. Diese divergierenden Ergebnisse können zum einen in dem nur transienten Knockdown durch siRNA begründet sein, zum anderen ist auch eine Alteration des Zellgenoms durch die vorangegangene Zellkultur und Zellpassagierung möglich. Weiterhin können parakrine Effekte während der Zellkultur und der siRNA nicht sicher ausgeschlossen werden. Aufgrund der signifikanten Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *MAP3K3* bzw. *MAPK3* und *SMAD7* sowie den Ergebnissen der siRNA in der Zelllinie BxPC-3 sollten zum genaueren Verständnis einer möglichen Interaktion weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die die Auswirkungen auf die Zellproliferation und -migration analysieren.

Mehrere Studien konnten eine Dysregulation von PDPK1 in multiplen Karzinomen, einschließlich des PDAC, zeigen [192]. So führte ein Knockdown von PDPK1 in *Label-retaining cancer cells* aus PDAC-Zelllinien zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum Gemcitabin mit konsekutiv gesteigerter Apoptose [193].

Des Weiteren konnte ein vermindertes Zellwachstum *in vivo* und *in vitro* durch Inhibition von PDPK1 beim PDAC nachgewiesen werden [194]. Darüber hinaus wurde eine Mediation der Zellplastizität, der azinär-duktales Metaplasie und der Tumorprogression durch PDPK1 beim PDAC gezeigt [195]. Auch eine Interaktion von PDPK1 mit dem TGF- β -Signalweg über das *TGF- β -Rezeptor interacting Protein* STRAP wurde bereits beschrieben [196]. Weiterhin führte ein Smad7-Knockdown in HeLa-Zellen zu einer verminderten PDPK1-Aktivität [197]. Mit PDPK1 wurde somit ein Schlüsseffektor bei der Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas identifiziert [195]. Aufgrund der bereits nachgewiesenen direkten Interaktion von PDPK1 mit den Smad-Proteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von PDPK1 im PDAC weiter analysiert. So konnte in dieser Studie eine Korrelation der mRNA-Expression von *PDPK1* und *SMAD7* in der *in-silico*-Analyse gezeigt werden. Weiterhin konnte erstmals eine signifikante Reduktion der *PDPK1*-Expression nach Smad7-Knockdown mittels siRNA in den humanen Pankreaskrebszelllinien PANC-1 und BxPC-3 nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis einer veränderten *PDPK1*-mRNA-Expression nach Smad7-siRNA in der Zelllinie CAPAN-1 kann durch die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien begründet sein. So stammen die PDAC-Zelllinien PANC-1 und BxPC-3 aus einem Primärtumor, während CAPAN-1 aus einer Lebermetastase gewonnen wurde. Zudem zeigte die Zelllinie CAPAN-1 eine gute Differenzierung der Tumorzellen, während die Zelllinien PANC-1 und BxPC-3 eine schlechte Zelldifferenzierung aufwiesen [139]. Somit können die unterschiedlichen Ergebnisse in der eigenen siRNA-Studie auf die unterschiedlichen Phänotypen der untersuchten Zelllinien zurückzuführen sein. Basierend auf den Ergebnissen der eigenen *in-silico*-Analyse sowie der siRNA-Untersuchung kann ein Zusammenhang zwischen PDPK1 und Smad7 beim PDAC vermutet werden, der über eine Koexpression hinausgehen könnte. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Emmanouilidi et al. ist es möglich, dass die erhöhte Smad7-Expression zur Inhibition des TGF- β -Signalweges durch eine Interaktion mit PDPK1 zu einer erhöhten Tumorigenität des PDAC führt [192]. Dies unterstützt die Hypothese von Smad7 als Tumorpromotor im PDAC, möglicherweise in Verbindung mit PDPK1. Die weitere Analyse einer möglichen Interaktion von PDPK1 und Smad7 scheint daher ein vielversprechender Ansatz zu sein, um die komplexe Zellbiologie des PDAC weiter zu verstehen.

Die STAT-Proteinfamilie spielt als Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Erkrankungen sowie bei der Resistenz gegenüber onkologischen Therapien [128]. So konnte für das STAT-Protein STAT5B eine konstante Expression sowohl im Nucleus als auch im Zytoplasma von PDAC-Zellen nachgewiesen werden [198]. Im Mausmodell führte ein shRNA-vermittelter

STAT5B-Knockdown zu einer stark verminderten Zellproliferation von Pankreaskarzinomzellen [199]. Darüber hinaus konnte eine *STAT5B*-vermittelte Resistenz gegenüber Gemcitabin in PANC-1-Zellen mit erhöhter Tumorinvasivität nachgewiesen werden [198]. Weiterhin konnte in Pankreaskarzinomzelllinien eine Cucurbitacin-B-induzierte Reduktion der *STAT5*-Expression mit konsekutivem Zellarrest und Apoptose gezeigt werden [200]. Damit rückt das Onkogen *STAT5B* als mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung des PDAC in den Fokus der Forschung [201]. Für das verwandte Protein *STAT5A*, das eine sehr hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu *STAT5B* aufweist, wurde dies bisher nicht untersucht [202]. Es stellt sich daher die Frage, ob *STAT5A* ebenfalls ein Onkogen darstellt und als Target in der Therapie des PDAC dienen könnte. Im Rahmen der eigenen Studie konnte in der in-silico-Analyse eine negative Korrelation der mRNA-Expression von *STAT5A* und *SMAD7* gezeigt werden. Nach *Smad7*-Knockdown in den PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 konnte jedoch keine signifikante Veränderung der *STAT5A*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Diese divergierenden Ergebnisse der in-silico- und der in-vitro-Studie können zum einen durch die größere Fallzahl der in-silico-Studie erklärt werden. Zum anderen kann durch die Verwendung der RSEM-Methode in der in-silico-Analyse der falsch-positive Nachweis einer Korrelation bei lediglich vorhandener Koexpression aufgrund möglicher Sequenzierungsfehler und posttranskriptioneller Modifikationen nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch ein fehlender Nachweis einer veränderten *STAT5A*-mRNA-Expression aufgrund der hohen Proliferationsrate der Zelllinien und einem nur transienten Knockdown von *Smad7* ist möglich. Somit sind die bisherigen Forschungsergebnisse zu *STAT5B* trotz ähnlicher Struktur und Funktion nur eingeschränkt auf *STAT5A* übertragbar.

Die antiproliferative Wirkung von TP53 als Antwort auf verschiedene Stresszustände sowie zellphysiologische Prozesse macht das Protein zu einem primären Ziel der Inaktivierung durch Krebszellen [132]. Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* gehören zu den häufigsten Mutationen im PDAC [203]. Diese werden meist durch eine Missense-Mutation verursacht [133]. Dadurch ist TP53 als Transkriptionsfaktor nicht mehr in der Lage an die DNA zu binden und die Induktion von Genen zu hemmen, die die Zellproliferation reduzieren und eine Apoptose induzieren [204]. Beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas wird eine *TP53*-Mutation vor allem in fortgeschrittenen intraepithelialen Neoplasien nach einem *CDKN2A* loss beobachtet [205]. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von *Smad7* beim PDAC erfolgte eine in-silico-Korrelationsanalyse der mRNA-Expression von *TP53* und *SMAD7*, in der keine signifikante Korrelation der Genexpressionen nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu führte die Reduktion der endogenen *Smad7*-Expression durch

RNA-Interferenz, trotz vorliegender *TP53*-Mutation, zu einer Verminderung der *TP53*-mRNA-Expression in den Zelllinien BxPC-3 und PANC-1. Dies zeigt, dass trotz einer häufig beobachteten *TP53*-Mutation eine Expressionsverminderung des Onkogens möglich ist. Die Ergebnisse der RNA-Interferenz unterstützen somit die Hypothese einer tumorsupprimierenden Funktion von *Smad7*. Damit wird die Hypothese einer physiologischen Veränderung des Expressionsverhaltens von *Smad7* zur Tumorsuppression beim PDAC untermauert.

Neben der Neoangiogenese, der Zellteilung und dem Zellwachstum spielt auch die DNA-Reparatur eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Zu den DNA-Reparaturproteinen zählt unter anderem das *Tumor Suppressor p53 Binding Protein* (*TP53BP1*) [129]. Für *TP53BP1* konnten wesentliche Funktionen bei der frühen DNA-Reparatur nach Bestrahlung, bei DNA-Strangbrüchen sowie bei der DNA-Schadensantwort nachgewiesen werden [206]. Eine wichtige Rolle von *TP53BP1* konnte u. a. beim Mammakarzinom gezeigt werden, das bei verminderter *TP53BP1*-Expression mit einem schlechteren Outcome assoziiert war [207]. Zudem führte eine aberrante Expression von *TP53BP1* zu einer erhöhten Tumorinzidenz beim Triple-negativen Mammakarzinom [208]. Bei PDAC-Patienten führte eine verminderte Expression von *TP53BP1* zu einer höheren N-Klassifikation und einem verminderten Überleben [209]. In der durchgeführten in-silico-Analyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *TP53BP1* und *SMAD7*. Dieses Ergebnis konnte im eigenen Patientenkollektiv bestätigt werden. Darüber hinaus konnte eine signifikante Reduktion der *TP53BP1*-mRNA-Expression in PANC-1-Zellen nach *Smad7*-Knockdown gezeigt werden. Dies deutet auf eine bisher nicht untersuchte Interaktion zwischen *Smad7* und dem DNA-Reparaturprotein *TP53BP1* hin. Diese Ergebnisse unterstützen auch die Hypothese einer tumorsupprimierenden Funktion von *Smad7* im PDAC. Um das Zusammenspiel von *Smad7* und *TP53BP1* genauer zu verstehen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. So sollte beispielsweise der Effekt einer Überexpression von *Smad7* auf die Expression von *TP53BP1* und die Zellproliferation von PDAC-Zelllinien untersucht werden.

Die VEGF-Familie besteht aus mindestens sechs Mitgliedern, die wichtige Funktionen in der Angiogenese, Zellproliferation und Zellmigration ausüben [134]. In humanen Pankreaskarzinomzelllinien konnte für den *Vascular Endothelial Growth Factor receptor-1* (*VEGFR-1*) eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, Invasion und EMT nachgewiesen werden [210]. Die Inhibierung von VEGF-Rezeptoren führte zu einer Reduktion der pathologischen Angiogenese, des Tumorwachstums und der Metastasierung [211]. Eine erhöhte Expression von VEGF konnte in verschiedenen

Karzinomen, unter anderem auch im PDAC, nachgewiesen werden [212]. So führte ein Knockdown von VEGF durch RNA-Interferenz in humanen PDAC-Zelllinien bei gleichzeitiger Behandlung mit Resveratrol zu einer gesteigerten Apoptose [213]. Weiterhin führte die Kombination von Gemcitabin und Resveratrol zu einer stark verminderten VEGF-B-Expression sowie zu vermehrtem Zelltod und reduziertem Zellwachstum [214]. Dieser Effekt war jedoch bei Vorliegen einer VEGF-B-Überexpression deutlich vermindert, was auf eine wichtige Rolle von VEGF-B bei Wachstum und Entstehung des PDAC hindeutet [214]. Für VEGF-A steht mit Bevacizumab bereits ein Antikörper zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms und des kleinzelligen Lungenkarzinoms zur Verfügung [215]. Nach den Erkenntnissen aus der bisherigen Literatur stellt sich daher die Frage, ob VEGF-B auch beim PDAC ein therapeutisches Ziel darstellen könnte. Aufgrund der bereits nachgewiesenen Interaktionen zwischen dem TGF- β - und dem VEGF-Signalweg sowohl in nicht-pathologisch verändertem als auch in malignem Gewebe wurde eine Korrelation der mRNA-Expression von *VEGFB* und *SMAD7* untersucht [216,217]. In der eigenen Studie konnte eine Korrelation der mRNA-Expression von *VEGFB* und *SMAD7* sowohl *in silico* als auch *in vitro* gezeigt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Effekt eines *SMAD7*-Knockdowns durch RNA-Interferenz untersucht. Hier konnte jedoch keine signifikante Veränderung der *VEGFB*-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können zum einen auf die hohe Proliferationsrate der PDAC-Zelllinien zurückgeführt werden, zum anderen ist der falsch-positive Nachweis einer Korrelation, bei lediglich vorhandener Koexpression in der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie, methodenbedingt nicht sicher auszuschließen. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle von VEGF-B und Smad7 beim PDAC zu verstehen.

Eine Interaktion zwischen dem TGF- β -Signalweg und den *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK) wurde in der Literatur bereits beschrieben [218]. Insbesondere für die phosphorylierte Form der ERK konnten onkogene Eigenschaften durch die Förderung der Proliferation und Migration als Antwort auf extrazelluläre Stimuli in verschiedenen Karzinomen gezeigt werden [188]. Zu diesen Karzinomen gehört, neben dem hepatozellulären Karzinom und dem Melanom, auch das duktales Adenokarzinom des Pankreas [219]. So konnten Principe et al. eine TGF- β -induzierte EMT durch ERK sowie eine TGF- β R1-abhängige ERK-Phosphorylierung beim PDAC nachweisen [144]. Um die Wirkung von TGF- β auf *SMAD7*, *TGFBR1*, *RHOA*, *AKT1*, *ERK* sowie *VEGF-B* in PANC-1-Zellen zu untersuchen, erfolgte die Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1. Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression von *SMAD4*, *AKT1*, *RHOA* und *VEGFB* nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine leicht

erhöhte mRNA-Expression von *SMAD7* sowie eine signifikant erhöhte *TGFBR1*-mRNA-Expression in PANC-1-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem TGF- β 1 gezeigt werden. Die nachgewiesene erhöhte *TGFBR1*-Expression deutet trotz der vorliegenden KRAS-Mutation auf eine intakte TGF- β -Signaltransduktion in PANC-1-Zellen hin. Die TGF- β 1-vermittelte erhöhte *SMAD7*-Expression bestätigt eine vorhandene, negative Feedbackregulation des TGF- β -Signalweges in der Zelllinie PANC-1. Somit wird die These einer erhöhten endogenen Expression von Smad7 als Antwort auf die Tumorprogression des PDAC unterstützt. Dies bekräftigt die Hypothese einer Tumorsuppressorfunktion von Smad7 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Der fehlende Effekt der Stimulation auf die kanonische TGF- β -Signalkaskade kann methodisch durch eine falsch gewählte Beobachtungszeit bedingt sein.

Die divergierenden Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen einen großen Forschungsbedarf in Bezug auf eine mögliche Interaktion von *SMAD7* mit *RHOA*, *TP53* und *AKT1*, um die Zusammenhänge und den Einfluss des inhibitorischen Smad7 auf die kanonische und nicht-kanonische TGF- β -Signalkaskade besser zu verstehen und zukünftige Therapieoptionen ableiten zu können. Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse von in-silico- und in-vitro-Analysen sind für die Gene *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *STAT5A* und *VEGFB* weitere funktionelle Untersuchungen notwendig. Zum besseren Verständnis der Funktion von Smad7 in der komplexen Signaltransduktion des TGF- β -Signalweges im PDAC wurden die Gene *MAP3K3*, *PDPK1* und *TP53BP1* als mögliche Ansatzpunkte für die weitere Grundlagenforschung identifiziert. Weiterhin konnte die vorliegende Studie verdeutlichen, dass der Forschungsgemeinschaft mit Genom- und in-silico-Analysen zukunftsweisende Methoden für wegweisende Erkenntnisse in der translationalen Krebsforschung zur Verfügung stehen.

6 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom ist die am häufigsten vorkommende Neoplasie des exokrinen Pankreas. Trotz intensiver Forschung zur Pathophysiologie und Therapie in den letzten Jahrzehnten, beträgt das durchschnittliche Überleben nach vollständiger Resektion (R0) weiterhin weniger als 2 Jahre [1]. Neben häufigen Mutationen, wie dem Onkogen KRAS und dem Tumorsuppressor TP53, spielen auch Veränderungen in der TGF- β -Signalkaskade beim Pankreaskarzinom eine wichtige Rolle [5]. Verschiedene Studien haben sowohl eine tumorsupprimierende als auch eine onkogene Funktion von TGF- β nachgewiesen [144]. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhte Expression des inhibitorischen Smad7 bei gleichzeitig höherer Tumorgenität gezeigt [113]. Der genaue Einfluss von Smad7 auf die pathologische Zellbiologie des Pankreaskarzinoms ist jedoch noch unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Smad7 als inhibitorisches Protein der TGF- β -Signalkaskade im duktales Adenokarzinom des Pankreas näher zu untersuchen.

So konnte in Geweben mit duktales Adenokarzinom des Pankreas sowie in Geweben mit chronischer Pankreatitis im Vergleich zu nicht-pathologisch verändertem Gewebe des Pankreas eine deutlich erhöhte Expression von Smad7 nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte eine starke zytoplasmatische Expression von Smad7 in PDAC-Zellen gezeigt werden.

Weiterhin wurde eine in-silico-Analyse der 169 Patientengewebeproben umfassenden Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie mit Hilfe des cBioPortals durchgeführt. Hier konnte eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *SMAD7* mit den Genen *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* und *VEGFB* *in silico* gezeigt werden. Im eigenen Patientenkollektiv konnten diese Korrelationen für die Gene *CASP7*, *CDC25A*, *MAPK3*, *MAP3K3*, *TP53BP1* und *VEGFB* *in vitro* reproduziert werden. Für eine weiterführende funktionelle Analyse des inhibitorischen Smad7 im duktales Pankreaskarzinom erfolgte zunächst der Nachweis einer konstanten Smad7-Expression in den repräsentativen PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1. In einem weiteren Schritt konnte durch eine spezifische Smad7-RNA-Interferenz eine signifikante Reduktion der endogenen Smad7-Expression in allen drei PDAC-Zelllinien erzielt werden. Durch die Verminderung der Expression von Smad7 konnte im kanonischen TGF- β -Signalweg eine signifikant reduzierte mRNA-Expression von *TGFBR1* in BxPC-3- und PANC-1-Zellen sowie von *SMAD2* und *SMAD4* in PANC-1-Zellen nachgewiesen werden. Im Rahmen der nicht-kanonischen

TGF- β -Signalkaskade konnte eine Reduktion der Genexpression von *AKT1* und *RHOA* in der Zelllinie PANC-1 beobachtet werden. Nach Verwendung von spezifischer Smad7-siRNA wurde eine signifikant verminderte mRNA-Expression von *MAP3K3* in der Zelllinie BxPC-3 sowie von *PDPK1* und von *TP53BP1* in den Zelllinien BxPC-3 und PANC-1 und von *TP53* in der Zelllinie PANC-1 nachgewiesen. In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von rekombinantem TGF- β 1 und einer Inkubation mit dem MEK1/2-Phosphorylierungsinhibitor U0126 auf die Zelllinie PANC-1 untersucht. Hierdurch konnte eine tendenziell erhöhte *SMAD7*-mRNA-Expression sowie eine stark erhöhte *TGFBR1*-mRNA-Expression gezeigt werden. Zudem führte die Kombination von rekombinantem TGF- β 1 und U0126 zu einer signifikanten Reduktion der *MAPK3*-mRNA-Expression.

Somit konnte in dieser Arbeit die inhibitorische Wirkung von Smad7 auf die kanonische sowie auf die nicht-kanonische TGF- β -Signalkaskade im duktalem Adenokarzinom des Pankreas nachgewiesen werden. Folglich ist im PDAC von einem weiterhin funktionierenden TGF- β -Signalweg mit intaktem negativem Feedbackmechanismus auszugehen. Entsprechend einer möglichen onkogenen Wirkung von TGF- β sollte eine tumorsuppressive Funktion von Smad7 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas postuliert werden. Diese Hypothese wird durch eine signifikante Korrelation mit dem DNA-Reparaturprotein TP53BP1 sowie dem Tumorsuppressor TP53 unterstützt. Die nachgewiesene signifikante Korrelation der Gen-Expression von *SMAD7* und *PDPK1*, lässt auch eine divergente Funktion von Smad7 als Onkogen, durch eine eventuelle Interaktion mit PDPK1, vermuten.

Die Ergebnisse dieser Dissertation legen somit einen weiteren Grundstein zum Verständnis der komplexen Funktionen von Smad7 in den pathophysiologischen Prozessen des duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Um den Einfluss von Smad7 auf *MAP3K3*, *TP53BP1*, *TP53*, *PDPK1* sowie andere Gene und Signalkaskaden zu verstehen, sind jedoch weitere, vor allem funktionelle Untersuchungen notwendig. Hierfür können, wie diese Arbeit belegt, in-silico-Analysen entscheidende Hinweise liefern und die Grundlage für weitere in-vitro-Studien bilden.

7 Literaturverzeichnis

1. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhner JM, Neoptolemos J, u. a. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI*. Februar 2015;15(1):8–18.
2. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, u. a. Krebs in Deutschland für 2017/2018 [Internet]. Robert Koch-Institut; 2021 Nov [zitiert 1. März 2023]. Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/handle/176904/9042>
3. Ott C, Heinmöller E, Gaumann A, Schölmerich J, Klebl F. [Intraepithelial neoplasms (PanIN) and intraductal papillary-mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas as precursor lesions of pancreatic carcinoma]. *Med Klin Munich Ger* 1983. 15. Februar 2007;102(2):127–35.
4. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, u. a. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol*. Dezember 2015;39(12):1730–41.
5. Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman AC, Draetta GF, Maitra A, u. a. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*. 15. Februar 2016;30(4):355–85.
6. Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, u. a. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology*. Dezember 1993;105(6):1846–56.
7. Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJA, u. a. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res*. 1. April 2004;64(7):2634–8.
8. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, u. a. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 21. April 2016;2:16022.
9. Rustgi AK. Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes Dev*. 1. Januar 2014;28(1):1–7.
10. Whitcomb DC. Genetic risk factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology*. Juni 2013;144(6):1292–302.
11. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, u. a. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*. Dezember 2002;51(6):849–52.
12. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. Februar 2015;44(1):186–98.
13. Ji BT, Silverman DT, Stewart PA, Blair A, Swanson GM, Baris D, u. a. Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*. Januar 2001;39(1):92–9.
14. Gullo L, Tomassetti P, Migliori M, Casadei R, Marrano D. Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis? *Pancreas*. März 2001;22(2):210–3.
15. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), Herausgeber. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.0, 2021, AWMF Registernummer: 032-010OL.

16. Wittekind C, International Union against Cancer, Herausgeber. TNM - Klassifikation maligner Tumoren: herausgegeben von Christian Wittekind ; UICC Global Cancer Control. Achte Auflage, korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019. Weinheim: Wiley-VCH; 2020. 313 S.
17. Shaib Y, Davila J, Naumann C, El-Serag H. The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study. *Am J Gastroenterol*. Juli 2007;102(7):1377–82.
18. Lin PW, Shan YS, Lin YJ, Hung CJ. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD versus Whipple procedure. *Hepatogastroenterology*. Oktober 2005;52(65):1601–4.
19. Kremer B, Vogel I, Lüttges J, Klöppel G, Henne-Bruns D. Surgical possibilities for pancreatic cancer: extended resection. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1999;10 Suppl 4:252–6.
20. Fernández-del Castillo C, Rattner DW, Warshaw AL. Standards for pancreatic resection in the 1990s. *Arch Surg Chic Ill 1960*. März 1995;130(3):295–9; discussion 299-300.
21. Christein JD, Kendrick ML, Iqbal CW, Nagorney DM, Farnell MB. Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. Oktober 2005;9(7):922–7.
22. Esposito I, Kleeff J, Bergmann F, Reiser C, Herpel E, Friess H, u. a. Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann Surg Oncol*. Juni 2008;15(6):1651–60.
23. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, u. a. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 17. Januar 2007;297(3):267–77.
24. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, u. a. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 20. Dezember 2018;379(25):2395–406.
25. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, u. a. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 8. September 2010;304(10):1073–81.
26. Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK, u. a. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. August 1996;7(6):593–600.
27. Rau BM, Moritz K, Schuschab S, Alsfasser G, Prall F, Klar E. R1 resection in pancreatic cancer has significant impact on long-term outcome in standardized pathology modified for routine use. *Surgery*. September 2012;152(3 Suppl 1):S103-111.
28. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Juni 2018;15(6):333–48.
29. Riediger H, Keck T, Wellner U, zur Hausen A, Adam U, Hopt UT, u. a. The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. Juli 2009;13(7):1337–44.

30. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev.* Dezember 2002;23(6):787–823.
31. Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, u. a. Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol.* Dezember 1987;105(6 Pt 2):2861–76.
32. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, u. a. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 22. Oktober 1992;359(6397):693–9.
33. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, u. a. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Dev Camb Engl.* Juli 1997;124(13):2659–70.
34. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, u. a. Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.* Dezember 1995;11(4):409–14.
35. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, u. a. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* Dezember 1995;11(4):415–21.
36. Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massagué J. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem.* 25. November 1990;265(33):20533–8.
37. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597–641.
38. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 4. Mai 2000;342(18):1350–8.
39. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* September 1981;78(9):5339–43.
40. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, u. a. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15. Januar 1993;90(2):770–4.
41. Zhao L, Hantash BM. TGF- β 1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Vitam Horm.* 2011;87:127–41.
42. Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell.* März 2009;16(3):329–43.
43. Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol.* November 1991;115(4):1091–105.
44. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, u. a. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juni 1986;83(12):4167–71.

45. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99–146.
46. Teicher BA. Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. November 2007;13(21):6247–51.
47. Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* November 2005;8(5):369–80.
48. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem.* 5. Mai 1995;270(18):10618–24.
49. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753–91.
50. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 8. August 2008;134(3):392–404.
51. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, u. a. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell.* 26. Juni 1998;93(7):1159–70.
52. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol.* Juli 1989;109(1):309–15.
53. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, u. a. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 5. Februar 1999;96(3):319–28.
54. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* März 1995;139(3):1347–58.
55. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, u. a. Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell.* 18. Oktober 1996;87(2):173.
56. Flanders KC, Kim ES, Roberts AB. Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* Februar 2001;220(2):141–54.
57. Luukko K, Ylikorkala A, Mäkelä TP. Developmentally regulated expression of Smad3, Smad4, Smad6, and Smad7 involved in TGF-beta signaling. *Mech Dev.* März 2001;101(1–2):209–12.
58. Wrana JL. TGF-beta receptors and signalling mechanisms. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2–3):120–30.
59. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 6. September 2000;92(17):1388–402.
60. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, u. a. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 27. Juni 1997;89(7):1165–73.
61. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, u. a. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 9. Oktober 1997;389(6651):622–6.

62. Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, u. a. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev.* 15. Januar 2000;14(2):187–97.
63. Ulloa L, Doody J, Massagué J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature.* 25. Februar 1999;397(6721):710–3.
64. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 17. April 2000;19(8):1745–54.
65. Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* März 2001;15(3):553–5.
66. Brown JD, DiChiara MR, Anderson KR, Gimbrone MA, Topper JN. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 26. März 1999;274(13):8797–805.
67. Wu JW, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, u. a. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell.* Dezember 2001;8(6):1277–89.
68. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* Dezember 2001;114(Pt 24):4359–69.
69. Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 1. April 1999;13(7):804–16.
70. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 9. Oktober 2003;425(6958):577–84.
71. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 15. August 2005;118(Pt 16):3573–84.
72. Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem.* 24. Dezember 1999;274(52):37413–20.
73. Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2000;142:125–31.
74. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, u. a. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* Januar 2001;12(1):27–36.
75. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* 24. November 2000;275(47):36803–10.
76. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, u. a. TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* Februar 2014;106(2):djt369.
77. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* Oktober 2001;29(2):117–29.

78. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6. Juni 1995;92(12):5545–9.
79. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 13. Oktober 2000;103(2):295–309.
80. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. April 2006;17(1–2):41–58.
81. Do TV, Kubba LA, Du H, Sturgis CD, Woodruff TK. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res MCR*. Mai 2008;6(5):695–705.
82. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, u. a. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res*. Mai 1998;9(5):393–404.
83. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol*. Mai 2009;219(2):449–58.
84. Gong D, Shi W, Yi S ju, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol*. 15. Juni 2012;13:31.
85. Horwitz DA, Gray JD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. *Immunol Today*. November 1997;18(11):538–42.
86. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 25. Juli 2008;134(2):215–30.
87. Leivonen SK, Kähäri VM. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer*. 15. November 2007;121(10):2119–24.
88. Satoh K, Shimosegawa T, Hirota M, Koizumi M, Toyota T. Expression of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) and its receptors in pancreatic duct cell carcinoma and in chronic pancreatitis. *Pancreas*. Mai 1998;16(4):468–74.
89. Gaspar NJ, Li L, Kapoun AM, Medicherla S, Reddy M, Li G, u. a. Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness. *Mol Pharmacol*. Juli 2007;72(1):152–61.
90. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, u. a. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 9. Oktober 1997;389(6651):631–5.
91. Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, u. a. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem*. 23. Juli 2004;279(30):31568–74.
92. Hanyu A, Ishidou Y, Ebisawa T, Shimanuki T, Imamura T, Miyazono K. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol*. 10. Dezember 2001;155(6):1017–27.
93. Aragón E, Goerner N, Xi Q, Gomes T, Gao S, Massagué J, u. a. Structural basis for the versatile interactions of Smad7 with regulator WW domains in TGF-β Pathways. *Struct Lond Engl* 1993. 10. Oktober 2012;20(10):1726–36.

94. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, u. a. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 20. April 2001;276(16):12477–80.
95. Kowanetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanetz K, Heldin CH, Moustakas A. TGF β induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J Cell Biol.* 25. August 2008;182(4):655–62.
96. Itóh S, Landström M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, u. a. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem.* 30. Oktober 1998;273(44):29195–201.
97. Stolfi C, Marafini I, De Simone V, Pallone F, Monteleone G. The dual role of Smad7 in the control of cancer growth and metastasis. *Int J Mol Sci.* 5. Dezember 2013;14(12):23774–90.
98. Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, u. a. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol.* 19. Januar 2004;164(2):291–300.
99. Datta PK, Moses HL. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol.* Mai 2000;20(9):3157–67.
100. Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, Atfi A, u. a. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene.* 25. Juli 2002;21(32):4879–84.
101. Yan X, Lin Z, Chen F, Zhao X, Chen H, Ning Y, u. a. Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 30. Oktober 2009;284(44):30097–104.
102. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, u. a. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* Dezember 2000;6(6):1365–75.
103. Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, u. a. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 18. Oktober 2002;277(42):39919–25.
104. Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Kavsak P, u. a. Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol Cell.* 5. August 2005;19(3):297–308.
105. Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8. Juli 2008;105(27):9244–9.
106. Zhang S, Fei T, Zhang L, Zhang R, Chen F, Ning Y, u. a. Smad7 Antagonizes Transforming Growth Factor β Signaling in the Nucleus by Interfering with Functional Smad-DNA Complex Formation. *Mol Cell Biol.* 15. Juni 2007;27(12):4488–99.
107. Ishisaki A, Yamato K, Nakao A, Nonaka K, Ohguchi M, ten Dijke P, u. a. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem.* 18. September 1998;273(38):24293–6.
108. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, u. a. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest.* September 2001;108(6):807–16.
109. Emori T, Kitamura K, Okazaki K. Nuclear Smad7 Overexpressed in Mesenchymal Cells Acts as a Transcriptional Corepressor by Interacting with HDAC-1 and E2F to Regulate Cell Cycle. *Biol Open.* 15. März 2012;1(3):247–60.

110. Xia H, Ooi LLPJ, Hui KM. MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. *Hepatology* Baltim Md. August 2013;58(2):629–41.
111. Landström M, Heldin NE, Bu S, Hermansson A, Itoh S, ten Dijke P, u. a. Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* CB. 4. Mai 2000;10(9):535–8.
112. Ekman M, Mu Y, Lee SY, Edlund S, Kozakai T, Thakur N, u. a. APC and Smad7 link TGFβ type I receptors to the microtubule system to promote cell migration. *Mol Biol Cell*. Juni 2012;23(11):2109–21.
113. Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Truong P, Büchler MW, u. a. The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene*. 23. September 1999;18(39):5363–72.
114. Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, Wang Z, u. a. In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Februar 2006;103(6):1858–63.
115. Arnold NB, Ketterer K, Kleeff J, Friess H, Büchler MW, Korc M. Thioredoxin Is Downstream of Smad7 in a Pathway That Promotes Growth and Suppresses Cisplatin-Induced Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 15. Mai 2004;64(10):3599–606.
116. Boyer Arnold N, Korc M. Smad7 abrogates transforming growth factor-beta1-mediated growth inhibition in COLO-357 cells through functional inactivation of the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*. 10. Juni 2005;280(23):21858–66.
117. Wang P, Fan J, Chen Z, Meng ZQ, Luo JM, Lin JH, u. a. Low-level expression of Smad7 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. April 2009;16(4):826–35.
118. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. Januar 2010;42(1):21–4.
119. Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, u. a. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature*. 16. Mai 1991;351(6323):242–5.
120. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 18. April 2005;24(17):2810–26.
121. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 14. Mai 2007;26(22):3100–12.
122. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 1. März 2001;410(6824):37–40.
123. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015;35(6):600–4.
124. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. April 2004;15(2):177–82.
125. Fu XY, Schindler C, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. August 1992;89(16):7840–3.
126. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*. 15. September 1997;248(3):615–33.

127. Rani A, Murphy JJ. STAT5 in Cancer and Immunity. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. April 2016;36(4):226–37.
128. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. Februar 2004;4(2):97–105.
129. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21. Juni 1994;91(13):6098–102.
130. Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*. Dezember 1993;7(12B):2556–64.
131. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 2. Juli 1992;358(6381):15–6.
132. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 7. Februar 1997;88(3):323–31.
133. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. Juni 2006;13(6):1027–36.
134. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Januar 1999;13(1):9–22.
135. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*. 25. November 1999;253(1):117–30.
136. Zhang F, Tang Z, Hou X, Lennartsson J, Li Y, Koch AW, u. a. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. April 2009;106(15):6152–7.
137. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 18. Juni 2012;13:134.
138. Tan MH, Nowak NJ, Loo R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, u. a. Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest*. 1986;4(1):15–23.
139. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, u. a. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*. Mai 2010;39(4):425–35.
140. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*. Februar 1977;58(2):209–14.
141. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*. 15. Mai 1975;15(5):741–7.
142. Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roehrer HD. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer*. 1990;118:48–63.
143. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 16. September 2004;431(7006):343–9.
144. Principe DR, Diaz AM, Torres C, Mangan RJ, DeCant B, McKinney R, u. a. TGFβ engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. *Oncogene*. 27. Juli 2017;36(30):4336–48.

145. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7. Mai 1976;72:248–54.
146. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15. August 1970;227(5259):680–5.
147. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* April 1987;162(1):156–9.
148. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 29. Januar 1988;239(4839):487–91.
149. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* Dezember 2001;25(4):402–8.
150. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* Juni 1981;75(6):816–21.
151. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathol.* Mai 1987;8(3):138–40.
152. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, u. a. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* Mai 2012;2(5):401–4.
153. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, u. a. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2. April 2013;6(269):p11.
154. Cohen, Jacob. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences.* In: 2nd Edition. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers; 1988. S. 79–81.
155. Singh P, Srinivasan R, Wig JD, Radotra BD. A study of Smad4, Smad6 and Smad7 in Surgically Resected Samples of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Correlation with Clinicopathological Parameters and Patient Survival. *BMC Res Notes.* Dezember 2011;4(1):560.
156. Kim YH, Lee HS, Lee HJ, Hur K, Kim WH, Bang YJ, u. a. Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas. *Ann Oncol.* April 2004;15(4):574–80.
157. Osawa H, Nakajima M, Kato H, Fukuchi M, Kuwano H. Prognostic value of the expression of Smad6 and Smad7, as inhibitory Smads of the TGF-beta superfamily, in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* Dezember 2004;24(6):3703–9.
158. Cerutti JM, Ebina KN, Matsuo SE, Martins L, Maciel RMB, Kimura ET. Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. *J Endocrinol Invest.* Juni 2003;26(6):516–21.
159. Muir P, Li S, Lou S, Wang D, Spakowicz DJ, Salichos L, u. a. The real cost of sequencing: scaling computation to keep pace with data generation. *Genome Biol.* Dezember 2016;17(1):53.
160. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, u. a. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* Dezember 2001;7(12):4115–21.

161. Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem.* 19. November 1999;274(47):33412–8.
162. Stopa M, Anhof D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM, Dooley S. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 22. September 2000;275(38):29308–17.
163. Malonis RJ, Fu W, Jelcic MJ, Thompson M, Canter BS, Tsikitis M, u. a. RNF11 sequestration of the E3 ligase SMURF2 on membranes antagonizes SMAD7 down-regulation of transforming growth factor β signaling. *J Biol Chem.* März 2017;292(18):7435–51.
164. Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 1. November 1998;58(21):4805–10.
165. Fan Y, Li T, Xu L, Kuang T. Comprehensive Analysis of Immunoinhibitors Identifies LGALS9 and TGFBR1 as Potential Prognostic Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Comput Math Methods Med.* 2020;2020:6138039.
166. Yao W, Pan Z, Du X, Zhang J, Li Q. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- β signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *J Cell Physiol.* September 2018;233(9):6807–21.
167. Edlund S, Landström M, Heldin CH, Aspenström P. Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42. *J Cell Sci.* 1. April 2004;117(Pt 9):1835–47.
168. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Januar 2007;8(1):23–36.
169. Sledz CA, Williams BRG. RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans.* Dezember 2004;32(Pt 6):952–6.
170. Shi TY, He J, Wang MY, Zhu ML, Yu KD, Shao ZM, u. a. CASP7 variants modify susceptibility to cervical cancer in Chinese women. *Sci Rep.* 18. März 2015;5:9225.
171. Wang MY, Zhu ML, He J, Shi TY, Li QX, Wang YN, u. a. Potentially functional polymorphisms in the CASP7 gene contribute to gastric adenocarcinoma susceptibility in an eastern Chinese population. *PloS One.* 2013;8(9):e74041.
172. Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Lee SJ, Kang BW, Moon JH, u. a. RIPK1 and CASP7 polymorphism as prognostic markers for survival in patients with colorectal cancer after complete resection. *J Cancer Res Clin Oncol.* April 2011;137(4):705–13.
173. Walsh N, Zhang H, Hyland PL, Yang Q, Mocchi E, Zhang M, u. a. Agnostic Pathway/Gene Set Analysis of Genome-Wide Association Data Identifies Associations for Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1. Juni 2019;111(6):557–67.
174. Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, u. a. CDC25 Phosphatases as Potential Human Oncogenes. *Science.* 15. September 1995;269(5230):1575–7.
175. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer.* Juli 2007;7(7):495–507.
176. Kristjánisdóttir K, Rudolph J. Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol.* August 2004;11(8):1043–51.

177. Villanueva A, García C, Paules AB, Vicente M, Megías M, Reyes G, u. a. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 15. Oktober 1998;17(15):1969–78.
178. Stolfi C, De Simone V, Colantoni A, Franzè E, Ribichini E, Fantini MC, u. a. A functional role for Smad7 in sustaining colon cancer cell growth and survival. *Cell Death Dis*. 20. Februar 2014;5(2):e1073.
179. Xanthoulis A, Tiniakos DG. E2F transcription factors and digestive system malignancies: how much do we know? *World J Gastroenterol*. 7. Juni 2013;19(21):3189–98.
180. Yan PY, Zhang XA. Knockdown of E2F8 Suppresses Cell Proliferation in Colon Cancer Cells by Modulating the NF- κ B Pathway. *Ann Clin Lab Sci*. September 2019;49(4):474–80.
181. Yao H, Lu F, Shao Y. The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer. *PeerJ*. 2020;8:e8562.
182. Lü Y, Zhang J, Li L, Li S, Yang Z. Carcinogenesis effects of E2F transcription factor 8 (E2F8) in hepatocellular carcinoma outcomes: an integrated bioinformatic report. *Biosci Rep*. 28. Februar 2020;40(2):BSR20193212.
183. Yamazaki K, Yajima T, Nagao T, Shinkawa H, Kondo F, Hanami K, u. a. Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract*. 2003;199(1):23–8.
184. Rödicker F, Stiewe T, Zimmermann S, Pützer BM. Therapeutic efficacy of E2F1 in pancreatic cancer correlates with TP73 induction. *Cancer Res*. 1. Oktober 2001;61(19):7052–5.
185. Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*. 30. Januar 2004;558(1–3):89–95.
186. Wasserman D, Nachum S, Cohen M, Enrico TP, Noach-Hirsh M, Parasol J, u. a. Cell cycle oscillators underlying orderly proteolysis of E2F8. *Mol Biol Cell*. 1. April 2020;31(8):725–40.
187. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Juni 1995;9(9):726–35.
188. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 14. Mai 2007;26(22):3279–90.
189. Jia W, Dong Y, Tao L, Pang L, Ren Y, Liang W, u. a. MAP3K3 overexpression is associated with poor survival in ovarian carcinoma. *Hum Pathol*. April 2016;50:162–9.
190. Hasan R, Sharma R, Saraya A, Chattopadhyay TK, DattaGupta S, Walfish PG, u. a. Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3/MEKK3) overexpression is an early event in esophageal tumorigenesis and is a predictor of poor disease prognosis. *BMC Cancer*. 2. Januar 2014;14:2.
191. Santoro R, Zanotto M, Carbone C, Piro G, Tortora G, Melisi D. MEKK3 Sustains EMT and Stemness in Pancreatic Cancer by Regulating YAP and TAZ Transcriptional Activity. *Anticancer Res*. April 2018;38(4):1937–46.
192. Emmanouilidi A, Falasca M. Targeting PDK1 for Chemosensitization of Cancer Cells. *Cancers*. 24. Oktober 2017;9(10):140.
193. Li D, Mullinax JE, Aiken T, Xin H, Wiegand G, Anderson A, u. a. Loss of PDPK1 abrogates resistance to gemcitabine in label-retaining pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 31. Juli 2018;18(1):772.

194. Emmanouilidi A, Fyffe CA, Ferro R, Edling CE, Capone E, Sestito S, u. a. Preclinical validation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 inhibition in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 14. Mai 2019;38(1):191.
195. Eser S, Reiff N, Messer M, Seidler B, Gottschalk K, Dobler M, u. a. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*. 18. März 2013;23(3):406–20.
196. Seong HA, Jung H, Choi HS, Kim KT, Ha H. Regulation of transforming growth factor-beta signaling and PDK1 kinase activity by physical interaction between PDK1 and serine-threonine kinase receptor-associated protein. *J Biol Chem*. 30. Dezember 2005;280(52):42897–908.
197. Seong HA, Jung H, Kim KT, Ha H. 3-Phosphoinositide-dependent PDK1 negatively regulates transforming growth factor-beta-induced signaling in a kinase-dependent manner through physical interaction with Smad proteins. *J Biol Chem*. 20. April 2007;282(16):12272–89.
198. Sumiyoshi H, Matsushita A, Nakamura Y, Matsuda Y, Ishiwata T, Naito Z, u. a. Suppression of STAT5b in pancreatic cancer cells leads to attenuated gemcitabine chemoresistance, adhesion and invasion. *Oncol Rep*. Juni 2016;35(6):3216–26.
199. Moser C, Ruemmele P, Gehmert S, Schenk H, Kreutz MP, Mycielska ME, u. a. STAT5b as molecular target in pancreatic cancer--inhibition of tumor growth, angiogenesis, and metastases. *Neoplasia N Y N*. Oktober 2012;14(10):915–25.
200. Thoennissen NH, Iwanski GB, Doan NB, Okamoto R, Lin P, Abbassi S, u. a. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 15. Juli 2009;69(14):5876–84.
201. Verhoeven Y, Tilborghs S, Jacobs J, De Waele J, Quatannens D, Deben C, u. a. The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer. *Semin Cancer Biol*. Februar 2020;60:41–56.
202. Grimley PM, Dong F, Rui H. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. Juni 1999;10(2):131–57.
203. Chang DK, Grimmond SM, Biankin AV. Pancreatic cancer genomics. *Curr Opin Genet Dev*. Februar 2014;24:74–81.
204. Khoo KH, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov*. März 2014;13(3):217–36.
205. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, u. a. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. September 2003;16(9):902–12.
206. Adams MM, Carpenter PB. Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div*. 31. August 2006;1:19.
207. De Gregoriis G, Ramos JA, Fernandes PV, Vignal GM, Brianese RC, Carraro DM, u. a. DNA repair genes PAXIP1 and TP53BP1 expression is associated with breast cancer prognosis. *Cancer Biol Ther*. 3. Juni 2017;18(6):439–49.
208. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, u. a. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol*. Juni 2010;17(6):688–95.

209. Ausborn NL, Wang T, Wentz SC, Washington MK, Merchant NB, Zhao Z, u. a. 53BP1 expression is a modifier of the prognostic value of lymph node ratio and CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 26. März 2013;13:155.
210. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, u. a. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 1. Januar 2006;66(1):46–51.
211. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10. Februar 2005;23(5):1011–27.
212. Soria JC, Fayette J, Armand JP. Molecular targeting: targeting angiogenesis in solid tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2004;15 Suppl 4:iv223-227.
213. Yang L, Yang L, Tian W, Li J, Liu J, Zhu M, u. a. Resveratrol plays dual roles in pancreatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. Mai 2014;140(5):749–55.
214. Yang Y, Tian W, Yang L, Zhang Q, Zhu M, Liu Y, u. a. Gemcitabine potentiates anti-tumor effect of resveratrol on pancreatic cancer via down-regulation of VEGF-B. *J Cancer Res Clin Oncol*. Januar 2021;147(1):93–103.
215. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*. 2004;7(4):335–45.
216. Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14. November 2006;103(46):17260–5.
217. Courau T, Nehar-Belaid D, Florez L, Levacher B, Vazquez T, Brimaud F, u. a. TGF- β and VEGF cooperatively control the immunotolerant tumor environment and the efficacy of cancer immunotherapies. *JCI Insight*. 16. Juni 2016;1(9):e85974.
218. Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11(1–2):23–35.
219. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 14. Mai 2007;26(22):3291–310.

8 Thesen

1. Das inhibitorische Smad7 ist im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) im Vergleich zu nicht-pathologisch verändertem Gewebe und chronischer Pankreatitis erhöht exprimiert.
2. In der in-silico-Analyse der Pancreatic-Adenocarcinoma-Studie des Broad Institute liegt eine Korrelation der mRNA-Expression von *SMAD7* mit *SMAD2*, *SMAD4*, *CASP7*, *CDC25A*, *E2F8*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *PDPK1*, *STAT5A*, *TP53BP1* und *VEGFB* vor, welche zum Teil (*CASP7*, *CDC25A*, *MAP3K3*, *MAPK3*, *TP53BP1* sowie *VEGFB*) im eigenen Patientenkollektiv reproduziert werden konnte.
3. Smad7 ist in den drei repräsentativen PDAC-Zelllinien BxPC-3, CAPAN-1 und PANC-1 gleichermaßen stark exprimiert.
4. Die Expression von Smad7 lässt sich in allen untersuchten PDAC-Zelllinien durch eine transiente RNA-Interferenz herunterregulieren.
5. Ein durch RNA-Interferenz hervorgerufener Smad7-Knockdown führt zu einer deutlich verminderten mRNA-Expression von *MAP3K3* in der Zelllinie BxPC-3, *PDPK1*, *TP53* und *TGFBR1* in BxPC-3- und PANC-1-Zellen, sowie von *SMAD2*, *SMAD4*, *AKT1* und *RHOA* in der Zelllinie PANC-1.
6. Eine Stimulierung mit rekombinantem TGF- β 1 führt zu einer tendenziell erhöhten *SMAD7*-mRNA-Expression sowie zu einer deutlich gesteigerten *TGFBR1*-mRNA-Expression, welches auf eine intakte TGF- β -Signaltransduktion im PDAC hindeutet.
7. Die erhöhte Expression von Smad7 im PDAC zeigt eine intakte physiologische negative Rückkopplung der TGF- β -Signaltransduktion und deutet auf eine tumorsupprimierende Wirkung von Smad7 im PDAC hin.
8. In-silico-Untersuchungen von Genexpressionsanalysen ermöglichen die Vorbereitung von in-vitro-Studien und können neue Forschungsansätze für die translationale Forschung liefern.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 26.02.2024

Inga Zawallich

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kleeff danke ich für die Möglichkeit der Erstellung einer experimentellen Dissertation in seiner Klinik, sowie für die freundliche Unterstützung und wertvollen Ratschläge während der Erstellung dieser Arbeit. Auch für die Begutachtung des Manuskriptes und den kritischen Anmerkungen bin ich sehr dankbar.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Bogusz Trojanowicz für seine wichtigen Ratschläge sowie seine fachkundige Unterstützung bei der Durchführung, Planung und Auswertung dieser Arbeit.

Frau Kathrin Hammje und Frau Nadine von Auw danke ich für ihre stetige Anleitung sowie Hilfsbereitschaft bei methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre stets unermüdliche Motivierung und Unterstützung bedanken.

Meine tiefe Dankbarkeit möchte ich meiner Mutter entgegenbringen, die mir, allen Umständen zum Trotz, stets den Rücken für meine private und berufliche Laufbahn freihält.