

**Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. D.-K. Bartsch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH
Standort Marburg**



**Einfluss des Transkriptionsfaktors *Snail* in der Initiation und
Progression von PanINs beim invasiven duktalem
Pankreaskarzinom im transgenen Tumormausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Frederike Sophia Jendryschek
aus Kiel

Marburg, 2016

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
(Kennziffer 1180) am: 25.04.2016**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Volker Fendrich

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Thomas M. Gress

Inhaltsverzeichnis	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
--	-----------

SUMMARY	VIII
----------------	-------------

1 EINLEITUNG	9
---------------------	----------

1.1 DAS PANKREASKARZINOM	9
1.2 MOLEKULARGENETISCHER HINTERGRUND DES PANKREASKARZINOMS	11
1.3 TRANSGENE TUMORMAUSMODELLE	12
1.3.1 DAS PANKREASKARZINOM IM TRANSGENEN TUMORMAUS-MODELL	13
1.3.2 SNAIL-KNOCK-OUT-MÄUSE	14
1.4 EPITHELIALE-MESENCHYMALE TRANSITION (EMT)	16
1.4.1 EMT IN DER TUMORPROGRESSION	18
1.4.2 EMT IM DUKTALEN PANKREASADENOKARZINOM	20
1.4.3 MARKER DER EMT	22
1.5 SNAIL IM PANKREASKARZINOM	25
1.6 ZIELSETZUNG	27
1.7 FRAGESTELLUNG	28

2 MATERIAL UND METHODEN	29
--------------------------------	-----------

2.1 MATERIAL	29
2.1.1 GERÄTE	31
2.1.2 GEBRAUCHSARTIKEL	31
2.1.3 MAUSLINIE	31
2.1.4 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND SEREN	32
2.1.5 ENZYME UND NUKLEOTIDE	32
2.1.6 PUFFER	33
2.1.7 STAMMLÖSUNGEN	33
2.1.8 PRIMÄRE ANTIKÖRPER	34
2.1.9 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	34
2.1.10 SEKUNDÄRE KONJUGATE	34
2.1.11 PCR-PRIMER	35
2.1.12 GEBRAUCHSFERTIGE SYSTEME	35
2.1.13 SOFTWARE	36
2.1.14 STERILISATION VON MATERIALIEN	36
2.2 METHODEN	36
2.2.1 TIERHALTUNG UND ZUCHT	36
2.2.2 VERSUCHSAUFBAU	38
2.2.3 GENOTYPISIERUNG	38
2.2.4 PRÄPARATION UND ENTNAHME DES PANKREAS	42
2.2.5 EINBETTEN VON GEWEBE IN PARAFFIN UND ERSTELLEN HISTOLOGISCHER SCHNITTE	43
2.2.6 HÄMALAUN-EOSIN-FÄRBUNG	43
2.2.7 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	43
2.2.8 RNA-EXTRAKTION	45
2.2.9 SYNTHESE VON CDNA	45
2.2.10 REAL-TIME PCR (qRT-PCR)	47
2.2.11 AUSWERTUNG DER PANKREATISCHEN INTRAEPITHLIALEN NEOPLASIE	47
2.2.12 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	48

3	<u>ERGEBNISSE</u>	49
3.1	ZUCHT DER MÄUSE MIT DEM GEWÜNSCHTEN PHÄNOTYP	49
3.2	MAKROSKOPIE	49
3.3	HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG	50
3.4	QUANTIFIZIERUNG DER PANIN-LÄSIONEN	54
3.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG	57
3.5.1	SNAIL1	57
3.5.2	E-CADHERIN	59
3.5.3	MMP-7	60
3.5.4	CK-19	62
3.5.5	AMYLASE	63
3.5.6	SOX9	64
3.6	REAL-TIME PCR	65
4	<u>DISKUSSION</u>	69
4.1	AUSBLICK	78
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	79
6	<u>DANKSAGUNG</u>	93
7	<u>LEBENS LAUF</u>	93
8	<u>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</u>	94
9	<u>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</u>	95

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADM	Azinär-duktale Metaplasie
AS-PMO	antisense phosphorodiamidate morpholino oligo
BMP	Bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine-Serum-Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Capan-1	humane Pankreaskarzinomzelllinie
CDH1	E-Cadherin kodierendes Gen
Cre	Causes recombination enzyme
CSC	Cancer Stem Cell
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleid acid
dNTPs	Desoxyribonukleotid
DPC4	deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
et al	et alii (und andere)
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
FW	forward
g	Gramm
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat

Abkürzungsverzeichnis

GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDAC1	Histon Deacetylase 1
HDAC2	Histon Deacetylase 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPAF-2	humane Pankreaskarzinomzelllinie
Ink4a/Arf	Genlokus, welcher für Rb und p53 kodiert
K-ras	Kirsten rat sarcoma
Kras ^{G12D/+}	Kras: Mutation Glycin (G) Position 12 zu Aspartat (D), heterozygot
LSL	Lox-Stop-Lox
M	Marker
min	Minute
MiaPaCa2	humane Pankreaskarzinomzelllinie
ml	Mililiter
n	Variable, beschränkt auf natürliche Zahlen
nm	nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
neg	Negativkontrolle
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
o.g.	oben genannt
p-Wert	Signifikanzwert
p=n*	P-Wert $\leq 0,05$ und damit signifikant
p21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
p53	Protein 53, Tumorsuppressorgen
p63	transformation-related protein 63, Transkriptionsfaktor
Pak1	Serin/threonin-protein kinase PAK 1
PanINs	Pancreatic Intraepithelial Neoplasias
Panc-1	humane Pankreaskarzinomzelllinie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1, insulin promoter factor 1
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ –dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
REV	reverse
rpm	Revolutions per minute
Sox-9	SRY-related high-mobility group [HMG] box 9
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T	Thymin
taq	Enzym von Thermophilus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor
Trp53 ^{R127H/+}	p53: Arginin (R) zu Histidin (H) an Position 172, heterozygot
U	Uracil
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
z.B	Zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Progression von normalem Gangepithel zu low-grade und high-grade PanIN-Läsionen (Wilentz et. al 2000)	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Snai1-Wildtyp-, Snai1 ^{floxneo} -, Snai1 ^{flox} - und Snai1 ^{del2} -Allels (Murray, Carver et al. 2006)	16
Abbildung 3: EMT – Transition von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen (Kalluri and Weinberg 2009)	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der EMT (Thiery 2002)	20
Abbildung 5: Downstream Targets von Snail (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005)	24
Abbildung 6: Verpaarungschema	37
Abbildung 7: PCR Ergebnisse von Kras und Cre	42
Abbildung 8: PCR Ergebnisse von Snail1	42
Abbildung 12: HE-Färbungen von 4 Monate alten Mäusen.	51
Abbildung 13: HE-Färbungen von 6 Monate alten Mäusen.	51
Abbildung 14: HE-Färbungen von 8 Monate alten Mäusen.	52
Abbildung 15: HE-Färbungen von 10 Monate alten Mäusen.	52
Abbildung 16: HE-Färbungen von 12 Monate alten Mäusen.	53
Abbildung 17: Prozentualer Anteil von normalen Gängen (ND) und PanINs im Alter von 2 und 4 Monaten	54
Abbildung 20: Snail in 40facher Vergrößerung bei 4 Monate alten Versuchstieren	58
Abbildung 21: Snail in 40facher Vergößerung bei 8 Monate alten Versuchstieren	58
Abbildung 22: Snail in 40facher Vergößerung bei 12 Monate alten Versuchstieren	58
Abbildung 24: positive membranäre E-Cadherin-Anfärbung (40fache Vergößerung) bei 8 Monate alten Mäusen	59
Abbildung 25: positive membranäre E-Cadherin-Anfärbung (40fache Vergößerung) bei 12 Monate alten Mäusen	60
Abbildung 26: MMP-7 (40x) bei 4 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)	60
Abbildung 27: MMP-7 (40x) bei 8 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)	61
Abbildung 28: MMP-7 (40x) bei 12 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)	61
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 4 Monate alten Mäusen	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 8 Monate alten Mäusen	62
Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 12 Monate alten Mäusen	62
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung von Amylase bei 8 Monate alten Mäusen	63
Abbildung 35: Real-Time PCR Snail	65
Abbildung 37: Real-time PCR Twist 1	67
Abbildung 38: Real-time PCR Sox-9	68

Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas rangiert in Deutschland an vierter Stelle der Krebstodesursachen. Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 8%. Ursächlich für die schlechte Prognose sind zum einen die späte Diagnosestellung aufgrund fehlender Früherkennungsmaßnahmen und die aggressive Tumorbilologie. Dem invasiven Pankreaskarzinom gehen ähnlich wie bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms Vorläuferläsionen (PanINs) voraus. Einhergehend mit diesen Vorläuferläsionen kommt zu einer Akkumulation von genetischen Veränderungen. Um die Krankheitsentwicklung besser zu verstehen gibt es verschiedene Mausmodelle, welche die humane Karzinogenese rekapitulieren. In dieser Arbeit haben wir das bereits in vielen Studien erprobte Mausmodell von David Tuveson mit Snail-Knock-Out-Mäusen gekreuzt und so $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse erschaffen. Ziel war es so den Einfluss des Transkriptionsfaktor Snail1 auf die Entwicklung von PanIN-Läsionen zu untersuchen. Snail1 ist ein Schlüsselprotein der EMT (Epithelial-Mesenchymale Transition) und wirkt als direkter Repressor von E-Cadherin, einem Zelladhäsionsmolekül. Die EMT ist ein Zellprogramm, welches sessilen epithelialen Zellen erlaubt mesenchymale Eigenschaften, wie Motilität und Invasivität, zu erlangen.

Homo- und heterozygote $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse wurden in 6 Beobachtungsräume eingeteilt (2,4,6,8,10 u. 12 Mon.) und im Anschluss das Pankreas histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Weiterhin wurden mittels qRT-PCR die Pankreata auf ihren Gehalt an Snail1, Twist1, CDH1/E-Cadherin und Sox-9 mRNA auf Transkriptionsebene untersucht. Es zeigte sich eine signifikant später einsetzende Entwicklung sowie langsamere Progression von PanIN-Läsionen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Pdx-1-Cre; Kras). Snail1 war sowohl immunhistochemisch und auf Transkriptionsebene signifikant vermindert exprimiert. Die E-Cadherin Expression zeigte widersprüchliche Ergebnisse. In der Immunhistochemie fand sich in den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen eine etwas stärkere Positivität, in der qRT-PCR eine heterogene Expression. Zum größten Teil war die Expression jedoch erniedrigt. Weiterhin zeigte sich eine deutlich verminderte Expression

der Transkriptionsfaktoren Sox9 und Twist1. Für MMP 7 konnte ebenfalls eine geringere Expression in der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen werden.

Erstmals konnte mit dieser Arbeit in vivo nachgewiesen werden, dass unter Abwesenheit von Snail1 die Initiation und Progression von PanINs drastisch verlangsamt wird.

Die klinische Relevanz von Snail1 entweder als Biomarker in der Früherkennung oder als therapeutisches Target sollte anhand weiterer Studien untersucht werden.

Summary

Adenocarcinoma of the pancreas is the fourth leading cause of cancer related deaths in Germany. The five-year survival is still less than 8% and the number of annual incidence and mortality are almost identical.

Studies have shown that the EMT regulatory protein Snail is overexpressed in pancreatic cancer cells which correlates with invasiveness and metastatic ability. Snail is a transcription factor which works as a direct repressor of E-Cadherin.

Aim of this study was to compare homozygous and heterozygous $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-mice with Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-mice in order to draw conclusions about the influence of Snail in initiation and progression of PanINs. Mouse strains of Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- and $\text{Snail}^{-/-}$ were crossed to generate homozygous and heterozygous $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mice. Groups of those mice were observed and sacrificed at a defined age. The pancreas was harvested for further histopathological analyses, immunostaining and real-time PCR.

Quantification of PanINs showed delayed initiation and progression of PanIN lesions at all ages in both homozygous and heterozygous $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mice. Invasive carcinoma was not observed. Using real-time PCR we found a significant downregulation of Sox9, Snail1 and Twist1. E-Cadherin expression was also analysed using qRT-PCR and immunostaining. Immunostaining showed higher expression of E-Cadherin in $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-mice. In qRT-PCR we found heterogenic results, presenting a lower expression in 5 of 6 Snail-Knock-Out mice.

This study provides in vivo evidence that progression of pancreatic intraepithelial neoplasias is dramatically delayed under genetic abrogation of snail.

Further studies will need to examine the clinical relevance of those results. Especially Snail1 as a biomarker or therapeutic target should be analysed.

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland etwa 16.000 Personen an Bauchspeicheldrüsenkrebs. Aufgrund der noch immer ungünstigen Prognose verstarben auch fast ebenso viele Personen an diesem Tumorleiden. Damit rangiert das Pankreaskarzinom an vierter Stelle der Krebstodesursachen. Ein Langzeitüberleben ist somit selten und die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 8% (RKI, 2013). Aufgrund der älterwerdenden Bevölkerung ist für die nächsten Jahre ein Anstieg der absoluten Zahl der Neuerkrankungen zu erwarten. Ursächlich für die schlechte Prognose sind zum einen die späte Diagnosestellung und die aggressive Tumorbilologie. Dies trifft insbesondere für das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu, welches mit etwa 85% den häufigsten malignen Tumoren des Pankreas darstellt. Seltener Tumoren, wie zum Beispiel die Gruppe der neuroendokrinen Tumoren, weisen hinsichtlich des Überlebens eine deutlich bessere Prognose auf (RKI, 2013). In Frühstadien treten – wenn überhaupt – nur unspezifische Symptome auf. Charakteristische Beschwerden wie Ikterus, Fettstühle, Gewichtsverlust und diffuse gastrointestinale Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken sind meist Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorleidens. Aufgrund der fehlenden Frühsymptome und geeigneter Früherkennungsmaßnahmen finden sich somit zum Zeitpunkt der Diagnose bei lediglich 10-20% der Patienten chirurgisch resektable Tumoren. Hier ist die chirurgische Entfernung Therapie der Wahl und stellt die einzig potenziell kurative Therapieoption dar. Nach radikaler onkologischer Resektion in TNM-Stadien I und II kann eine Lebensverlängerung von 1 bis 3 Jahren erreicht werden (Neoptolemos, Stocken et al. 2004, Oettle, Neuhaus et al. 2013). Das Langzeitüberleben nach Resektion liegt jedoch immer noch unter 20 % (Wagner, Redaelli et al. 2004). Daher sind multimodale Therapiestrategien prinzipiell sinnvoll, um das Langzeitüberleben zu verbessern. Die mediane Überlebenszeit bei resektablen Tumoren des Pankreaskopfes beträgt nach R0-Resektion etwa

17-28 Monate. Bei R1- oder R2-Resektion ist das mediane Überleben signifikant herabgesetzt und der Verlauf wird meist durch das Auftreten von Lokalrezidiven bestimmt. Durch eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin kann insbesondere in der Gruppe der R0-resezierten Patienten ein signifikantes Überlebensbenefit in Bezug auf das mediane Überleben und die 5-Jahres-Überlebenschancen erreicht werden (Sohn, Yeo et al. 2000, Neoptolemos, Stocken et al. 2001, Neoptolemos, Stocken et al. 2004, Raut, Tseng et al. 2007). In der Mehrzahl der Fälle liegt bei Diagnosestellung ein metastasiertes bzw. nicht-resektables Tumorstadium vor. Die Überlebenszeit beträgt hier meist nur wenige Monate, so dass ein palliatives Vorgehen indiziert ist (Fernandez-del Castillo et al., 2011). Als wichtigster vermeidbarer Risikofaktor gilt der Nikotinkonsum, dabei steigt das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken mit der Anzahl der Pack Years (Bueno de Mesquita, Maisonneuve et al. 1991). Ebenso erhöht die chronische Pankreatitis das Erkrankungsrisiko, ist jedoch nicht als ursächlich anzusehen. Auch hier führt ein zusätzlicher Nikotinkonsum zu einer exponentiellen Steigerung des Erkrankungsrisikos (McKay, Glen et al. 2008). Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken wenn ein oder mehr erstgradig Verwandte betroffen sind. Hier steigt das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken mit der Anzahl an betroffenen erstgradig Verwandten und beträgt bis zu 40% bei drei an einem Pankreaskarzinom erkrankten erstgradig Verwandten (Klein, Brune et al. 2004). In diesem Fall spricht man von einem familiären Pankreaskarzinom. Ebenso konnte verschiedene Gendefekte, wie zum Beispiel BRCA1 und BRCA2 sowie das Peutz-Jeghers-Syndrom nachgewiesen werden (Bartsch, Kress et al. 2004, Feldmann, Karikari et al. 2011).

Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms, welches die Entstehung invasiver Karzinome aus Vorläuferläsionen durch spezifische genetische Veränderungen beschreibt (Vogelstein, Fearon et al. 1988), wird auch beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas ein morphologischer Transformationsprozess angenommen. Hierbei entwickeln sich die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) aus normalem intraduktalem Epithel. Die

PanINs entwickeln sich zunächst über flache Epithelhyperplasien ohne Atypien (PanIN-1A) und papilläre Hyperplasien ohne oder mit Atypien (PanIN-1B oder 2) hin zu einem Carcinoma in situ (PanIN-3) und schließlich weiter zum invasiven Pankreaskarzinom (PDAC) (s. Abb. 1) (Hruban, Wilentz et al. 2000), (Hruban, Adsay et al. 2001).

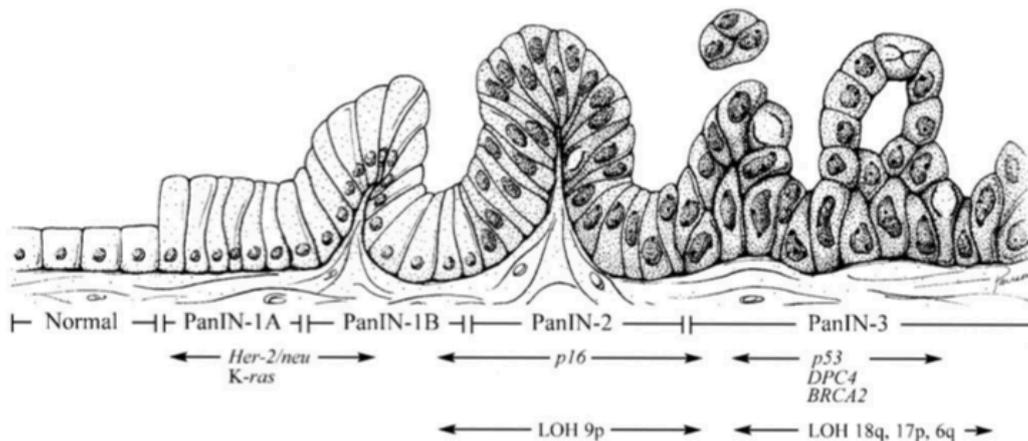


Abbildung 1: Progression von normalem Gangepithel zu low-grade und high-grade PanIN-Läsionen (Wilentz et. al 2000)

Ein Besonderes Merkmal des PDAC ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion. Das Stroma besteht aus Fibroblasten, Endothel- und Entzündungszellen und Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (Seymour, Hruban et al. 1994). Mehrere Studien konnten einen Einfluss des Stromas auf Tumorstromawachstum, Invasivität, Metastasierung und Chemoresistenz nachweisen (Miyamoto, Murakami et al. 2004, Hwang, Moore et al. 2008).

1.2 Molekulargenetischer Hintergrund des Pankreaskarzinoms

Karzinome entstehen durch eine Reihe von molekulargenetischen Veränderungen. Das Pankreaskarzinom ist ebenso charakterisiert durch die sequentielle Akkumulation somatischer Mutationen einhergehend mit morphologischen Veränderungen. So konnten für die einzelnen PanIN-Läsionen spezifische genetische Veränderungen nachgewiesen werden (Hruban, Wilentz et al. 2000). Zu

den frühesten nachweisbaren Veränderungen gehören aktivierende Punktmutationen im Protoonkogen Kras. In den frühen PanIN-Läsionen sind diese in bis zu 30% nachweisbar. In den höhergradigen Läsionen und im duktalem Adenokarzinom nimmt die Prävalenz auf bis zu 90% zu (Schneider, Lersch et al. 2003). Die zweithäufigste genetische Alteration beim Pankreaskarzinom ist die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16. Eine Inaktivierung findet sich in etwa 80-95% der Pankreaskarzinome. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 in mehr als 60% der Pankreaskarzinome inaktiviert (Schneider, Lersch et al. 2003). Vor allem in höhergradigen PanIN-Läsionen treten diese Mutationen auf (PanIN 2 und PanIN3). Die Hauptfunktion des Tumorsuppressorgens p53 ist die Induktion eines Wachstumsstopps bzw. des programmierten Zelltods nach DNA-Schädigungen. Des Weiteren finden sich mit abnehmender Häufigkeit in den PanIN-3-Läsionen und invasiven Pankeaskarzinomen auch inaktivierende Mutationen der Tumorsuppressorgene DPC4 und BRCA2 (Hruban, Wilentz et al. 2000, Wilentz, Iacobuzio-Donahue et al. 2000).

1.3 Transgene Tumormausmodelle

In der biomedizinischen Grundlagenforschung sind Mäuse als Modellorganismus bereits seit vielen Jahren von großem Wert. Um zu einem besseren Verständnis molekularer Krankheitsmechanismen beizutragen wurden in den letzten Jahren zahlreiche transgene Tumormausmodelle mit spezifisch veränderten Genen entwickelt. In den 1980er Jahren legten Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies mit ihren Forschungen den Grundstein für die mittlerweile unverzichtbaren transgenen Tiermodelle.

Dafür werden embryonale Stammzellen aus einer Blastozyste einer Maus entnommen. In diese wird mithilfe eines nach vorheriger Elektroporation implantierten Vektors in vitro das Zielgen eingeführt. Die Zellen, die das entsprechende Merkmal tragen, werden purifiziert und durch homologe Rekombination kloniert. Die so gewonnenen Zellen werden anschließend in die Blastozyste einer weiteren

Maus injiziert. Nach dem Mendel'schen Gesetz tragen die Tiere der übernächsten Generation das gewünschte Merkmal. Auf diese Weise ist es nicht nur möglich ein Knock-Out zu kreieren, sondern auch bestimmte Gene anzuschalten (Knock-On), in ihrer Funktion zu ändern oder durch ein anderes Gen zu ersetzen (Knock-In) (Hansson, 2007).

1.3.1 Das Pankreaskarzinom im transgenen Tumormausmodell

Wie für mittlerweile zahlreiche Erkrankungen existieren auch für das Pankreaskarzinom mehrere Mausmodelle. Die meisten Mausmodelle basieren auf einer Mutation des K-ras Onkogen, da diese Veränderung die häufigste nachweisbare (bis zu 90%) genetische Alteration des Pankreaskarzinom ist (Herreros-Villanueva, Hijona et al. 2012). In 2003 entwickelten Hingorani *et al.* ein Mausmodell bei dem das Protoonkogen K-ras unter Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx-1-Promoters exprimiert wird. Mit diesem konnte gezeigt werden, dass die Expression von K-ras die Progression der PanINs bis hin zum invasiven Karzinom induziert. Dabei treten die aktivierenden (gain-of-function) Mutationen an bestimmten Stellen des Ras-Gens auf, insbesondere T → A – Transversionen an Codon 12, 13 und 61. Die Mutationen sind von sogenannten Lox-Stop-Lox-Elementen flankiert, welche eine vorzeitige Transkription und Translation verhindern. Kreuzt man jedoch eine LSL-Kras^{G12D}-Maus mit einer Maus, die die Rekombinase Cre, gesteuert vom Pdx-1-Promotor, besitzt, führt bei den entsprechenden Nachkommen die Cre-Rekombinase zum Herausschneiden der LSL-Elemente und somit zu einer Expression der onkogenen Form von K-ras. Dies geschieht fast ausschließlich im Pankreasgewebe, da alle pankreatischen Zelltypen von Pdx-1-exprimierenden Vorläuferzellen abstammen (Gu, Dubauskaite et al. 2002). Hingorani *et al.* konnten mit ihrer Studie zeigen, dass die Pankreata aller Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D}-Mäuse (33 von 33) PanIN-Läsionen entwickelten, die den humanen Vorläuferläsionen entsprachen. Bereits ab einem Alter von nur 2 Wochen waren PanIN-1a-Läsionen nachweisbar. Mit Zunahme des Alters der Tiere konnten höhergradige Läsionen nachgewie-

sen werden. Zudem zeigte sich auch eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion, wie sie auch in humanen Pankreaskarzinomen vorkommt (Hingorani, Petricoin et al. 2003). Ein weiteres Mausmodell aus dem Jahr 2003 konnte eine beschleunigte PanIN-Entstehung und Tumorprogression mit Entwicklung von Metastasen zeigen. In diesem Modell wurde zwei Mutationen kombiniert. Zum einen die pankreasspezifische Cre-gesteuerte Aktivierung des K-ras Onkogen und zum anderen die Deletion des Ink4a/Arf – Tumorsuppressorallels, was zu einer fehlenden Expression von p16^{Ink4A} und p19^{Arf} führt. Hier entwickelten alle Mäuse (26 von 26) innerhalb von 11 Wochen invasive und metastasierende Pankreaskarzinome (Aguirre, Bardeesy et al. 2003). Im Jahr 2005 konnte dieselbe Arbeitsgruppe um Hingorani und Tuveson ihr bereits etabliertes Mausmodell weiterentwickeln. In diesem Tumormausmodell wurde zusätzlich eine Mutation (loss-of-function) des p53- Tumorsuppressorgens implementiert. Die so erzeugten Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse zeigten im Alter von 4-6 Wochen frühe PanIN-Läsionen ähnlich der Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D}-Mäuse. Ab einem Alter von 10 Wochen zeigte sich jedoch eine signifikante Krankheitsaktivität mit manifesten Symptomen. Die mittlere Überlebenszeit lag bei nur 5 Monaten und keines der Tiere lebte länger als 12 Monate. 96% der insgesamt 28 Mäuse entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom einhergehend mit malignem Aszites, Tumorkachexie sowie Metastasen in Leber (70%), Lunge (50-60%), Nebennieren (20%) und Peritoneum (20-30%) (Hingorani, Wang et al. 2005, Herreros-Villanueva, Hijona et al. 2012).

1.3.2 Snail-Knock-Out-Mäuse

Im Jahr 2001 konnte erstmals in einem Mausmodell der Effekt eine Snail1-Nullallels untersucht werden. Mäuse, welche eine homozygote Deletion der Snail1 Allele besitzen (Sna^{-/-} bzw. Snai1^{del1/del1}) zeigen ausgeprägte Defekte während der Gastrulation und der Mesodermentwicklung und sterben ungefähr an Tag 8 der Embryogenese. Heterozygote Snail-Mäuse (Sna^{+/-}) wiederum entwickelten sich normal. Die Mesodermformation findet in den homozygoten

$Sna^{-/-}$ -Mäuse bis zu einem gewissen Grad statt, jedoch bewahren zahlreiche mesodermale Zellen eine apikal-basale Polarität und epitheliale Morphologie. Weiterhin bleiben zwischen den Zellen Zelladhäsionen wie z.B. adherens junctions bestehen. Dies ist am ehesten durch die fehlende Repression des E-Cadherin-Gens durch Snail1 bedingt (Carver, Jiang et al. 2001) (Cano, Perez-Moreno et al. 2000)

Um diese Ergebnisse für weitere Forschungen nutzen zu können und die frühe Letalität der Mäuse in der Embryonalentwicklung zu umgehen gelang es derselben Arbeitsgruppe ein Mausmodell zu entwickeln, welches das Cre-loxP-System nutzt um ein sogenanntes conditional snail null allele zu erhalten. Der Promotor und die ersten beiden Exons des Snail1-Gen werden dabei von loxP flankiert und über eine Cre-vermittelte Exzision des $Snail1^{floxneo}$ -Allels entsteht das $Snail1^{del2}$ -Allel, welches ähnliche Eigenschaften wie das $Snail1^{del1}$ -Allel besitzt (s. Abb. 2). Dieses so geschaffene Modell wird es ermöglichen die Funktion des Transkriptionsfaktors Snail1 in einem erweiterten Kontext zu erforschen (Murray, Carver et al. 2006).

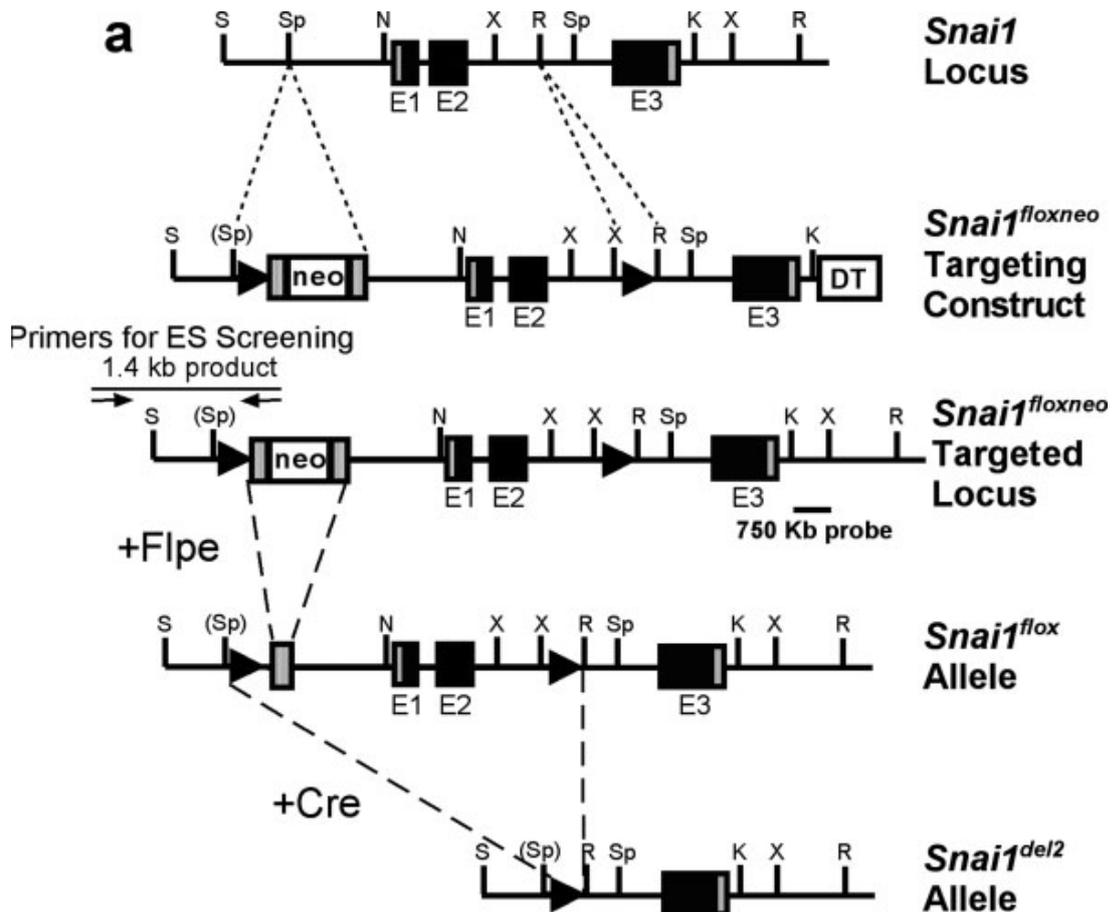


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Snai1*-Wildtyp-, *Snai1^{loxneo}*-, *Snai1^{lox}*- und *Snai1^{del2}*-Allels (Murray, Carver et al. 2006)

1.4 Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen biologischen Prozess bei dem Epithelzellen durch verschiedene inter- und intrazelluläre Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp akquirieren (s. Abb. 3) und somit eine gesteigerte Migrationsfähigkeit, Invasivität und Resistenz gegenüber Apoptose erlangen (Kalluri and Weinberg 2009). Epithelzellen bilden typischerweise Zellschichten und sind dabei untereinander über bestimmte Membranstukturen verbunden. Dazu zählen unter anderem *Tight Junctions*, *Adherens Junctions*, *Desmosomen* und *Gap Junctions* (Thiery and Sleeman 2006). Im

physiologischen Zustand bewegen sich Epithelzellen nur innerhalb eines Zellverbundes und sind auf einer Basallamina verankert. Dabei werden die Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Zellen dauerhaft aufrecht erhalten (Schock and Perrimon 2002). Ein typisches epitheliales Markerprotein stellt E-Cadherin dar. E-Cadherin vermittelt unter anderem Zell-Zell-Kontakte und fördert die Ausbildung von Desmosomen (Thiery 2002). Mesenchymale Zellen hingegen besitzen keine für Epithelzellen typische apikale-basolaterale Organisation und Polarisierung der Zelloberfläche und bilden somit auch keine Zellverbände aus. Sie sind beweglicher und ihre Form gleicht eher spindelförmigen Fibroblasten (Friedl 2004). Kommt es zu einem Phänotypwechsel in der EMT ändert sich die Polarisierung der Zellen und es kommt zu einer Hochregulation von mesenchymalen Proteinen, wie z.B. N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin. Gleichzeitig werden Adhäsionsmoleküle herunterreguliert (Christofori 2006).

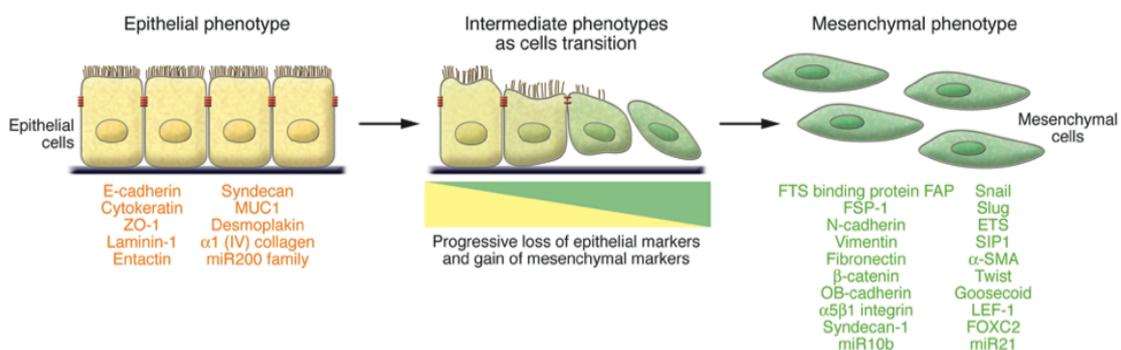


Abbildung 3: EMT – Transition von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen (Kalluri and Weinberg 2009)

Die EMT kann in drei wichtige Subtypen unterteilt werden. Zum einen ist die EMT mit der Embryogenese und Organformation assoziiert. Dabei wandeln sich primitive epitheliale Zellen während der Gastrulation und der Entstehung der Neuralleiste zu motilen mesenchymalen Zellen. Durch den umgekehrten Prozess, der mesenchymalen-epithelialen Transition (MET), sind diese Zellen an der Entstehung der meisten Organe beteiligt. Ohne die Fähigkeit zur EMT wäre die Entwicklung von mehrzelligen Organismen nicht möglich (Thiery 2002, Zeisberg and Neilson 2009). Der zweite EMT Typ kann in Wundheilungspro-

zessen, Organfibrose und Regeneration beobachtet werden. Dabei kommt es durch Entzündungsreize zu einer Umwandlung von epithelialen oder endothelialen Zellen zu ortsständigen Gewebsfibroblasten. Dieser Vorgang ist essentiell in der physiologischen Wundheilung. Bei chronischen Entzündungen führt der dauerhafte Entzündungsreiz zu Organfibrose und konsekutiver Destruktion des betroffenen Gewebes (Kalluri and Weinberg 2009). Der dritte und für diese Arbeit besonders relevante Mechanismus beschreibt die Vorgänge in der Tumorprogression und Metastasierung, auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.4.1 EMT in der Tumorprogression

Neben dem physiologischen Vorkommen der EMT in der Embryogenese ist in den letzten Jahren vermehrt die pathophysiologische Bedeutung der EMT während der Karzinogenese in den Fokus der Forschung gerückt. Insbesondere bei der Entstehung von Metastasen spielt die EMT eine große Rolle (Huber, Kraut et al. 2005). Die Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der EMT und MET in der Entstehung invasiver Karzinome. Ausgehend von histologisch normalen Epithelzellen entwickeln sich zunächst Adenome oder andere Karzinomvorstufen (z.B. PanINs). In einem nächsten Schritt kann sich aus diesen Vorläuferläsionen ein Carcinoma in situ entwickeln. Charakteristisch für diese Läsionen ist die Tatsache, dass die Basalmembran noch nicht durchbrochen ist. Kommt es nun durch weitere Veränderungen zur Epithelialen-Mesenchymalen Transition erlangen die noch ortsständigen Tumorzellen die Fähigkeit die Basalmembran zu durchbrechen. Durch diese Invasivität wird ein Einbruch in Lymph- und Blutgefäße ermöglicht, so dass es zur Ausbildung von Metastasen in anderen Regionen kommen kann. Dort läuft die EMT in umgekehrter Reihenfolge als Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) ab.

Für zahlreiche Tumorentitäten konnte nachgewiesen werden, dass veränderte Expressionsmuster EMT-assoziiierter Proteine mit einer schlechten Prognose und einem höherem histologischen Grading korrelieren. Insbesondere für das

Mammakarzinom und das Ovarialkarzinom konnte dies gezeigt werden. Elloul *et al.* und Moody *et al.* konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug (Snail2) oder Twist1 unter anderem mit einem schlechteren histologischen Grading und einem kürzeren rezidivfreien Überleben bei Brustkrebs einhergehen (Elloul, Elstrand *et al.* 2005, Moody, Perez *et al.* 2005). Auch in anderen Tumorentitäten zeigte sich eine erhöhte Expression dieser Transkriptionsfaktoren (Snail1, Slug, Twist1, SIP1). Dadurch kommt es zur einer veränderten Regulation mesenchymaler und epithelialer Gene. Epitheliale Markerproteine wie E-Cadherin, Occludin, Claudin und Connexin werden vermindert exprimiert (Moustakas and Heldin 2007). Weiterhin konnten verschiedene Studien für das Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom und Kolorektale Karzinome den Nachweis erbringen, dass veränderte Expression von EMT-Markern sowohl mit einem höheren Tumorstadium, dem Metastasierungsgrad und auch einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen (Cates, Byrd *et al.* 2009). Studien legen nahe, dass zahlreiche Signalwege an der Induktion der EMT beteiligt sind (u.a. Wnt/beta-catenin und Notch). Bereits 1985 wurde mit dem scatter factor (heute: hepatocyte growth factor) ein Induktor der EMT beschrieben. HGF führt in der Zellkultur zu einer Änderung des Phänotyps und schließlich zur Auflösung des Zellverbandes (Stoker and Perryman 1985). Neben HGF konnte für weitere Wachstumsfaktoren (TGF- β , FGF, BMP und Platelet-derived growth factor) die Fähigkeit zur Induktion nachgewiesen werden. Moleküle der Extrazellulärmatrix (EZM) und das tumorassoziierte Stroma sind ebenso an der Induktion der EMT beteiligt (De Wever, Westbroek *et al.* 2004, Polyak and Weinberg 2009). Ellenrieder *et al.* konnten an Pankreaskarzinomzelllinien nachweisen, dass TGF- β 1 zu einer Induktion der EMT führt und dieser Vorgang mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Invasivität einhergeht (Ellenrieder, Hendler *et al.* 2001). Eine Inhibition der EMT erfolgt u.a. durch p63 und p53. Das Tumorsuppressorgen p53 führt durch Aktivierung der Expression von verschiedenen microRNAs zu einer verminderten Expression von Snail1 und fördert somit den Erhalt eines epithelialen Phänotyps (Chang, Chao *et al.* 2011)

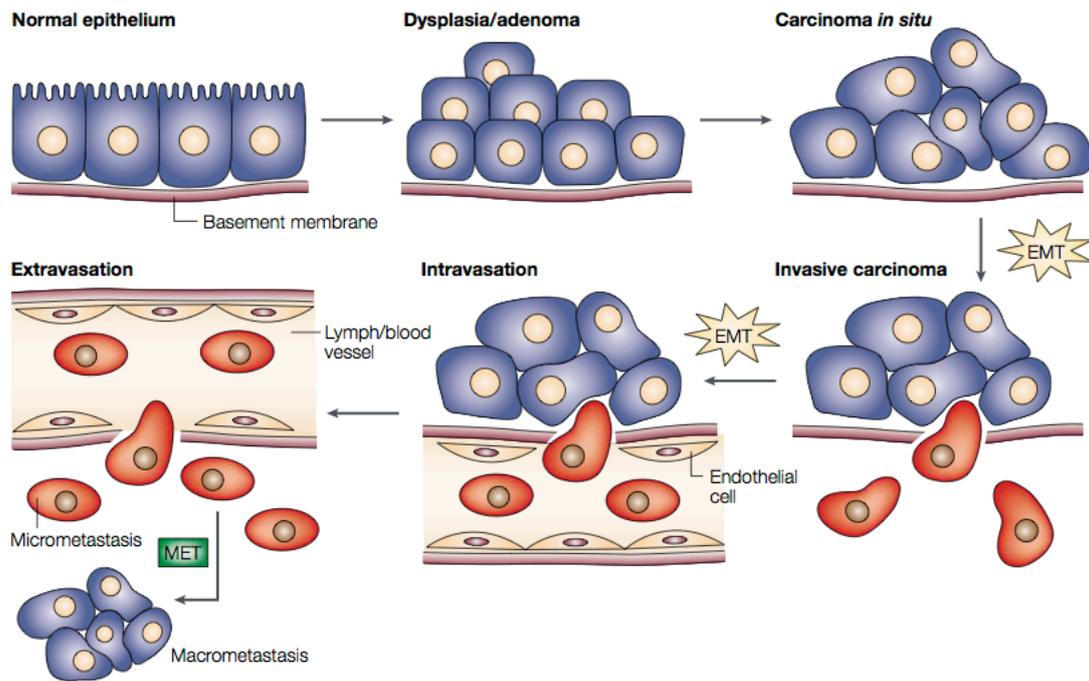


Abbildung 4: Schematische Darstellung der EMT (Thiery 2002)

1.4.2 EMT im duktalem Pankreasadenokarzinom

Perl *et al.* konnten 1998 erstmals mit ihren Untersuchungen an Rip1Tag2-Mäusen in einem *in vivo* Modell nachweisen, dass der Verlust der E-Cadherin Expression mit der Progression von benignen β -Zell-Adenomen zu invasiven β -Zell-Karzinomen korreliert (Perl, Wilgenbus *et al.* 1998). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für neuroendokrine Tumore des Pankreas. Fendrich *et al.* konnten *in vitro* nachweisen, dass die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 in 61% bzw. 64% hochreguliert waren und dies mit einer verminderten Expression von E-Cadherin assoziiert ist. In einem *in vivo* Modell an Rip1Tag2-Mäusen konnte mittels dem Snail-Inhibitor PEG eine erhöhte Apoptoserate und eine verminderte Proliferation erreicht werden (Fendrich, Maschuw *et al.* 2012). Studien lassen ähnliches für das duktales Adenokarzinom des Pankreas vermuten. Das Vorhandensein der EMT ist zumeist mit einem undifferenzierten Phänotyp und einem kürzerem Überleben assoziiert (Javle, Gibbs *et al.* 2007, Masugi, Yamazaki *et al.* 2010). Es fand sich gehäuft eine Reduktion der E-

Cadherin Expression, welche mit der Entdifferenzierung und Entstehung von Metastasen korreliert. Weiterhin konnte eine vermehrte Expression des mesenchymalen Markers N-Cadherin sowie der Transkriptionsfaktoren Snail1, Twist1 und Slug gezeigt werden (Joo, Rew et al. 2002, Natalwala, Spychal et al. 2008). Roy et al. haben weiterhin zeigen können, dass eine Überexpression von MUC1, einem Glykoprotein, in Pankreaskarzinomzellen zu einer Induktion der EMT führt, welche wiederum in gesteigerter Invasivität mündet. MUC-1-Positive Zellen zeigten eine verstärkte Expression von mesenchymalen Markern wie Snail, Slug und Vimentin und einer verminderten Expression des epithelialen Markers E-Cadherin. Des Weiteren zeigte sich auch eine gesteigerte Expression von VEGF und Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche mit der Angiogenese assoziiert sind (Roy, Sahraei et al. 2011). Daten haben gezeigt, dass MMPs die Invasion und das Metastasierungspotenzial von Pankreaskarzinomzellen fördern (Egeblad and Werb 2002). Eine weitere Studie hat zeigen können, dass eine Überexpression des EMT-Markers Slug (Snail2) ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Invasivität von Pankreaskarzinomzellen unter anderem durch Aktivierung von MMP-9 führt (Zhang, Chen et al. 2011). Weiterhin wurde gezeigt, dass Notch-2 und dessen Ligand Jagged-1, welche ebenso eine Rolle in der Induktion der EMT spielen, in Gemcitabine-resistenten Pankreaskarzinomzellen hochreguliert sind. Eine Downregulation des Notch-Signalweges führte zu geringerer Invasivität und einer Umkehrung der EMT, resultierend in der MET. Dieser Mechanismus war mit einer verminderten Expression von EMT-Markern wie Vimentin, Snail1, Slug und Zeb-1 verbunden (Wang, Li et al. 2010).

Weiterhin scheint die EMT eine wichtige Rolle in der Chemoresistenz einzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Umkehrung des EMT-Phänotyps zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika führt. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass eine inverse Korrelation zwischen E-Cadherin und Zeb-1, einem Suppressor von E-Cadherin, ebenso mit der Resistenz gegenüber Gemcitabine, 5-FU und Cisplatin korreliert (Arumugam, Ramachandran et al. 2009). Eine weitere Studie hat zudem einen Zusammen-

hang zwischen der Expression von microRNAs (miRNA) und einer Resistenz gegenüber Gemcitabine nachweisen können. Es wird vermutet, dass auch microRNAs eine kritische Rolle in der EMT einnehmen. Li et al. konnten zeigen, dass die Expression von miR-200 zu einer Downregulation von Slug, Vimentin und Zeb-1 in Gemcitabine resistenten Zellen führt. Diese Zellen zeigten schließlich eine Umkehrung ihres EMT-Phänotyps und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Gemcitabine (Li, VandenBoom et al. 2009).

1.4.3 Marker der EMT

1.4.3.1 E-Cadherin

E-Cadherin ist ein vom CDH1-Gen kodiertes Zelladhäsionsmolekül und gehört zur Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Adhäsionsmoleküle. Es ist membranständig und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und zytosolischen Domäne. Über die extrazelluläre Domäne bildet E-Cadherin in der Regel homodimere Komplexe mit anderen benachbarten E-Cadherin-Molekülen. Über diese Komplexe werden die Zell-Zell-Kontakte aufrecht erhalten und die Zellen werden im Verbund verankert. Somit kann E-Cadherin als epithelialer Marker der EMT angesehen werden. Während der EMT kommt es aufgrund der verminderten E-Cadherin Expression zu einem Verlust der Adhäsionskomplexe, so dass sich die Zellen aus ihrem Zellverbund herauslösen können (Pecina-Slaus 2003). Weiterhin ist E-Cadherin an der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Intrazellulär bildet E-Cadherin Verbindungen zu α - und β -Catenin und Aktin aus. β -Catenin kann ebenfalls als EMT-Marker angesehen werden, da es bei Verlust von E-Cadherin während der EMT vermehrt freigesetzt wird und im Nukleus akkumuliert (Brabletz, Jung et al. 2001). Für zahlreiche Tumorentitäten konnte bereits eine pathophysiologische Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Pathway nachgewiesen werden (Hugh, Dillon et al. 1999, Smalley and Dale 2001). Zeng *et al.* konnten zeigen, dass in 65% der untersuchten Pankreaskar-

zinome eine verstärkte Aktivierung von Wnt/ β -Catenin vorlag (Zeng, Germinaro et al. 2006).

1.4.3.2 Der Transkriptionsfaktor Snail

Snail1 gehört gemeinsam mit Snail2 (Slug) zu einer Familie von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren. Beide spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklungsbiologie. So konnte Snail1 das erste Mal bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden (Boulay, Dennefeld et al. 1987). Snail1 wird als essentiell in der Gastrulation und der Entwicklung des Neuralrohrs bei Wirbeltieren angesehen (Alberga, Boulay et al. 1991). Desweiteren wurden Snail1 sowie ein weiterer der Snail-Familie zugehöriger Transkriptionsfaktor Slug als direkte Repressoren von E-Cadherin, einem Schlüsselprotein in der EMT, beschrieben (Cano, Perez-Moreno et al. 2000). Wie bereits zuvor erläutert spielt die EMT sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der Tumorprogression und Metastasierung eine zentrale Rolle. Das Snail1-Protein besteht unter anderem aus einer stark konservierten carboxy-terminalen Region, welche 4 bis 6 C₂H₂-Zinkfinger beinhaltet. Diese ermöglichen sequenzspezifische Interaktionen mit DNA-Promotoren, die eine E-Box-Sequenz (CAGGTG) besitzen. Der Amino-Terminus der verschiedenen Snail-(Arten) enthält die evolutionär konservierte SNAG-Domäne, die essentiell für die transkriptionelle Repression ist (Wu and Zhou 2010). Die Repression der E-Cadherin-Expression erfolgt über den Korepressor-Komplex SIN3A und die Histon Deacetylasen HDAC1 und HDAC2 (Peinado, Ballestar et al. 2004). Die Funktion als Repressor kann Snail1 nur wahrnehmen wenn es im Nukleus lokalisiert ist. Die zelluläre Lokalisation von Snail wird durch die Kinasen GSK-3 β und Pak1 sowie dem Zink-Transporter LIV1 reguliert. Der Abbau von Snail1 erfolgt durch Phosphorylierung und ubiquitinsteuerte Degradation im Proteasom (Dominguez, Montserrat-Sentis et al. 2003, Yang, Rayala et al. 2005). Neben der Repression von E-Cadherin werden weitere für die Induktion der EMT wichtige epitheliale Gene von Snail1 unterdrückt. Dazu gehören unter anderem Claudine, Integrine und Zytokeratine. Mesenchymale Gene hingegen werden Snail-vermittelt hochreguliert (Abb. 5).

Weiterhin greift Snail1 in den Zellzyklus ein. Einerseits schützt es Zellen vor Apoptose indem es die Expression von p53 über Bindung an dessen Promoter hemmt, andererseits vermittelt Snail1 einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase über eine Reduktion von Cyclin D2 und erhöhte Expression von p21 (Vega, Morales et al. 2004). Diese Mechanismen bieten Zellen sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch in der Tumorphathologie einen entscheidenden Überlebensvorteil. So kann Snail1 direkt über Hemmung pro-apoptotischer Enzyme den Untergang von malignen Zellen hemmen (Vega, Morales et al. 2004, Escriva, Peiro et al. 2008). In einem Tumormausmodell für das Kolonkarzinom konnte durch eine medikamentöse Inhibition (AS-PMO) von Snail1 eine erhöhte Apoptoserate erzielt werden (Roy, Iversen et al. 2004).

Für zahlreiche Tumore konnte nachgewiesen werden, dass eine verstärkte Snail1 Expression mit einem aggressivem Tumorwachstum und einer schlechten Prognose einhergeht. Ebenso wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression von Snail1 und dem epithelialen EMT-Marker E-Cadherin festgestellt (Becker, Rosivatz et al. 2007, Moreno-Bueno, Portillo et al. 2008).

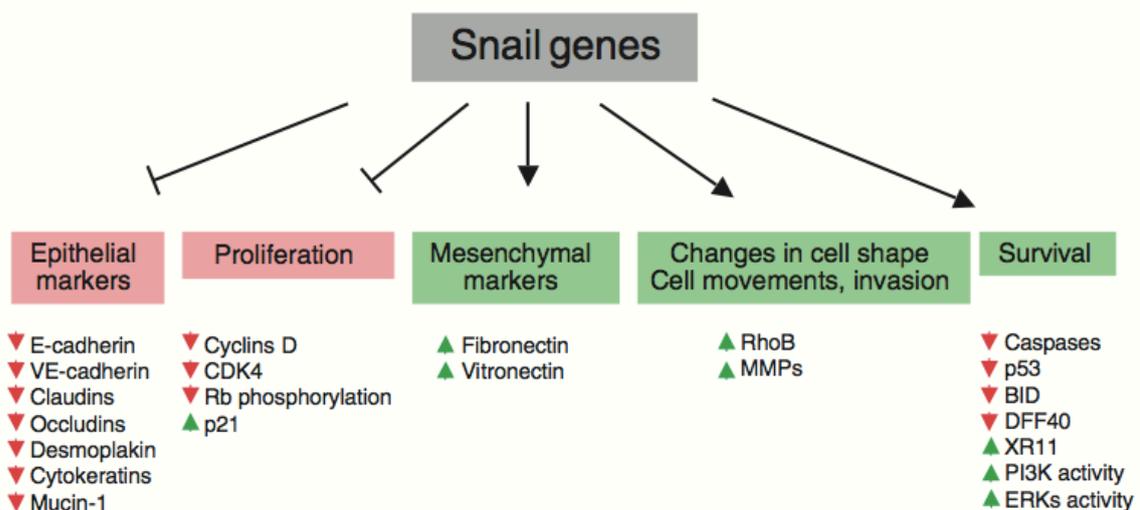


Abbildung 5: Downstream Targets von Snail (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005)

1.5 Snail im Pankreaskarzinom

Eine Studie von Hotz *et al.* konnte zeigen, dass in bis zu 78% von humanem Pankreaskarzinomgewebe Snail1 in dukталen Tumorzellen exprimiert wird. Weiterhin konnte auf mRNA-Level in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien eine erhöhte Snail1 Expression korrespondierend zu einer erniedrigten E-Cadherin Expression nachgewiesen werden. Insbesondere schlecht differenzierte Zelllinien (MiaPaCa2 und Panc-1) zeigten eine fast vollständige Repression von E-Cadherin durch Snail1. Mit Zunahme des Differenzierungsgrades erfolgte eine Annäherung des Expressionsgrades von Snail und E-Cadherin. In einem orthotopen Nacktmausmodell konnte eine positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression von Snail und dem Metastasierungspotenzial aufgezeigt werden. Auch hier war das Metastasierungspotenzial von Tumoren, die von schlecht differenzierten Zelllinien (MiaPaCa2 und Panc-1) abstammten, deutlich höher als bei Tumoren, welche von mäßig (HPAF-2) oder gut (Capan-1) differenzierten Zelllinien abstammten. Bezogen auf die E-Cadherin Expression zeigte sich erwartungsgemäß eine negative Korrelation. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, das Snail1 als regulatorisches Protein der Epithelialen-Mesenchymalen Transition, in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms eine entscheidende Rolle spielt und als Malignitätsmarker sowie als mögliches therapeutisches Ziel fungieren könnte (Hotz, Arndt et al. 2007). Eine weitere Arbeit konnte die Ergebnisse an humanem Tumorgewebe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* rekapitulieren (von Burstin, Eser et al. 2009).

Snail1 spielt jedoch nicht nur während der EMT und Zellmigration eine zentrale Rolle. Ebenso wird Snail1 eine wichtige Funktion im Zellüberleben zugeschrieben. Studien haben gezeigt, dass Zellen durch Snail1 sowohl vor stressinduziertem Zelltod als auch vor pro-apoptotischen Signalen geschützt werden. Diese Resistenz gegenüber dem Zelltod ist für die Migration in der Embryogenese essentiell. Ebenso ermöglicht es aber auch malignen Zellen zu streuen und Metastasen zu bilden. Somit lassen sich auch die oft niedrigen Proliferationsraten an der invasiven Tumorfront erklären (Vega, Morales et al. 2004). Des Weiteren

konnte die Arbeitsgruppe um Yin *et al.* eine Korrelation zwischen erhöhter Snail1-Expression und verstärkter Chemoresistenz gegenüber 5-Fluoruracil und Gemcitabine in Panc-1-Zellen nachweisen (Yin, Wang et al. 2007). Die Down-regulation von Snail in Panc-1-Zellen resultierte in einer erhöhten Apoptoserate induziert durch 5-Fluoruracil, Gemcitabin oder Gamma-Strahlung (Zhang, Jiao et al. 2010). Eine Marburger Arbeitsgruppe konnte mit ihren Daten zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen, welche mit einer hohen Dosis Gemcitabine behandelt worden waren, vermehrt Stammzellgene exprimieren sowie EMT-assoziierte Charakteristika besitzen (Quint, Tonigold et al. 2012).

1.6 Zielsetzung

Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsforschung ist das Pankreaskarzinom nach wie vor eine Erkrankung, die mit einer extrem schlechten Prognose einhergeht. Mithilfe der verschiedenen Tumormausmodelle ist es möglich die Tumorprogression analog zum humanen Pankreaskarzinom zu rekapitulieren. Jedoch ist die Entstehung der präneoplastischen Läsionen und deren Progress zum invasiven Karzinom noch nicht vollkommen verstanden. Wie bereits beschrieben ist die Epitheliale-Mesenchymale Transition mit ihren Markern und Induktoren ein hoffnungsvolles Forschungsgebiet. Die EMT stellt das zentrale Ereignis in der Tumorzellmigration und Metastasierung dar. Insbesondere der Transkriptionsfaktor Snail1 spielt hier eine entscheidende Rolle, so dass ich mich in dieser Arbeit mit dem Einfluss von Snail1 auf die Initiation und Progression der PanIN-Läsionen befasst habe.

1.7 Fragestellung

Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Snail1 auf die Tumorprogression verschiedener humaner Karzinome und das Pankreaskarzinom ist bereits in verschiedenen Studien erforscht worden. Erstmalig besteht jedoch die Möglichkeit die Tumorentstehung und Progression unter Ausschaltung von Snail1 *in vivo* an einem Tumormausmodell zu untersuchen. In wie weit Snail1 auch einen Einfluss auf die Initiation und Progression von pankreatischen Vorläuferläsionen (PanINs) ist bislang nicht hinreichend untersucht. Es stellt sich daher die Frage, ob Snail1 bereits in den frühen PanIN-Stadien eine relevante Rolle in der Entstehung dieser Läsionen spielt.

Folgende Fragen sollen durch die Arbeit beantwortet werden:

- I. Kommt es zu einem späteren Auftreten von PanINs unter Ausschaltung von Snail?
- II. Wird die Progression der PanINs in der Abwesenheit von Snail verlangsamt?
- III. Wie verhalten sich die Expressionsmuster der EMT-Marker Snail und E-Cadherin?

2 Material und Methoden

2.1 Material

(modifiziert nach Richard F. Knoop)

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
- 20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
- 80°C Schrank, Sepatch	Haraeus, Hanau, D
+ 4°C Schrank, KGS 3213 - 5	Liebherr, Biberach, D
Agarosegelträger, Maxi II	Labortechnik, Wasserburg, D
Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D
Destilliere, Arium 611	Sartorius, Göttingen, D
Dichtemessgerät, Density Meter DMA 35	Anton Paar, Graz, A
Digitalkamera, Dimage X 50	Konica Minolta, Unterföhring, D
Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophoresenetzgerät, Power Pac 300	BioRad, München, D
Elektrophoreselaufkammer, Sub - Cell GT	BioRad, München, D
Feuchte Kammer	Eigenkonstruktion
Gasbrenner, CV470 Plus Butan/ Propan	Campingaz, Ober-Mörlen, D
Gewebeeinbett-Entwässerungsautomat, Tissue-Tek VIP E150	Sakura, Torrance, USA
Heizblock, Dri - Block DB	Techne, Princeton, USA
Homogenisator/ Shaver, Ultra-Turrax T25 digital	IKA-Werke, Staufen, D
Kühlplatte, Tissue-Tek	Sakura, Torrance, USA
Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
Mikroskop (binokular), 020-519.511 (1.6x, 2.5x, 10x, 40x)	Leica, Bensheim, D

Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
Mikrotom, RM 2155	Leica, Bensheim, D
Mikrowelle, 8017	Privileg, Fürth, D
Paraffinspender/ Ausgießstation, Tissue-Tek TEC	Sakura, Torrance, USA
Paraffinstreckbad, WB 24	Medax, Rendsburg, D
Paraffinwärmeplatte, 13501	Medax, Rendsburg, D
pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
Pipetten, Reference 2,5µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, Pipetman 20µl, 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, D
qRT-PCR-Gerät, 7500 FAST-Real-Time PCR	Applied-Biosystems, Darmstadt, D
Quarzküvette, Präzisions-Küvette Suprasil (10mm)	Hellma, Mühlheim/ Baden, D
RNA Photometer, Ultraspec 3000	Pharmacia, Uppsala, S
Schüttelwasserbad, 3047	Lottermann,D
Shavermesser, Surgical Disposable Scalpel	Braun, Melsungen, D
Sterile Werkbank , Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
Thermocycler, Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozentrifuge, Centrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg, D
Transluminator, Transluminator 4000	Stratagene, Heidelberg, D
Transilluminatorkamera, M 49	Hama, Monheim, D
Tubes, Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Vakuumzentrifuge, Speed Vac Concentrator	Savant, Ramsey, D
Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, Biofuge Pico	Hareaus, München, D

2.1.2 Gebrauchsartikel

Produkt	Hersteller
Deckgläser 24x24mm	Menzel, Braunschweig, D
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
Falcon-Röhrchen/PP-Röhrchen, Cellstar 5 ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filtereinheit (steril), MILLEX GP, 0,22 μ m	Millipore, Schwalbach, D
Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marbug, D
Mikrotomklingen, S35	Feather, Osaka, J
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Einschlussmittel, Roth-Histokit	Roth, Karlsruhe, D
Ohrmarken. 1005-1 Manel	National Band & Tag, Newport, USA
Ohrmarkenzange	National Band & Tag, Newport, USA
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200ml, 500ml	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen, SafeSeal 20ml, 100ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße/Tubes, Eppendorftubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße/Tubes, SafeSeal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reaktionsgefäße/Tubes, PP-PCR Gefäße 0,2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

2.1.3 Mauslinie

Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mauslinie

Snai1^{del1/del1}-Mauslinie

2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Seren

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die mit *gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol*	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest. (steril)	Delta Select, Dreieich, D
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte D
Citrat	Sigma, München, D
DAB Chromogen*	Dako, Hamburg, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (99%+)	Acros Organics, Geel, B
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol, absolut (≥99%)	JT Baker, Griesheim, D
Ethanol, vergällt (≥99%)	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid (1%)	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd (3,5-3,7% neutral gepuffert)	Fischar, Saarbrücken, D
Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DK
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Paraffineinbettmedium, Hist-COMP (SP 56°C)	Vogel, Gießen, D
Salzsäure (1mol/l)	Merck, Darmstadt, D
TRIzol*	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99%+)	Acros Organics, Geel, B
Tween (20%) *	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30%)*	Merck, Darmstadt, D
Xylol (≥98%)	JT Baker, Griesheim, D
Wasser (PCR), steril	Sigma, München, D

2.1.5 Enzyme und Nukleotide

Die Lagerung der Enzyme und Nukleotide erfolgte bei +4°C.

Produkt	Hersteller
DNA-Größenstandard, Gene Ruler 50bp	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (10mM)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Reverse Transkriptase, Super Script III (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNase (steril)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6 Puffer

Die Lagerung der Puffer erfolgte bei +4°C.

Produkt	Hersteller
BSA (pH 5,2)	Serva, Heidelberg, D
DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
DNA Ladepuffer / Loading Dye (6x)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
First Strand Buffer (5x), cDNA-Synthese	Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS-Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D

2.1.7 Stammlösungen

Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei +4°C.

Art der Lösung	Inhalt
Blocking Solution (10%)	1g BSA 10ml PBST
Citratpuffer (pH 6,0)	2,94g Citrat 1l H ₂ O
DNA Ladepuffer	40mg Bromphenolblau 40mg Xylencyanol 800µl EDTA (0,5M)pH8,0 ad 100ml H ₂ O
PBST (1%)	500µl Tween 500ml PBS
TBE (10x) (RT)	108g Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99%+) 55g Borsäure 8,2g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (99%+) 1l H ₂ O

2.1.8 Primäre Antikörper

Die Lagerung folgender primärer Antikörper erfolgte bei 4°C.

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α -Amylase	Kaninchen	polyklonal	1:500	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
CK-19	Kaninchen	monoklonal	1:250	Abcam, Cambridge, UK
E-Cadherin	Kaninchen	monoklonal	1:200	Cell Signaling, Danvers, USA
MMP-7	Ziege	polyklonal	1:100	R&D Systems, Wiesbaden, D
SNAIL	Kaninchen	polyklonal	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Sox-9	Kaninchen	polyklonal	1:500	Merck Millipore, Darmstadt, D
Vimentin	Ziege	polyklonal	1:50	Santa Cruz, Heidelberg, D

2.1.9 Sekundäre Antikörper

Die Lagerung folgender sekundärer Antikörper erfolgte bei 4°C.

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α - Kaninchen	Peroxidase	1:250	Vector, Burlingame, USA
α - Ziege	Peroxidase	1:250	Vector, Burlingame, USA

2.1.10 Sekundäre Konjugate

Konjugatkomplex	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Avidin-Biotin	Peroxidase	1:40	Vector, Burlingame, USA
Streptavidin-Biotin	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.11 PCR-Primer

(Fa. Eurofins MWG, Ebersberg, D)

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Genotyp	Primername	5'-3'- Primersequenz
Snail	Snail_F (forward)	CGG GCT TAG GGT GTT TTC AGA
	Snail_R (reverse)	CTT GCT TGG TAC CTG CCT TC
Cre	Cre_FW_new	CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG
	Cre_REV	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC
Kras	p53Mut_FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A
	Kras006_REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA
p53	p53Mut_FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A
	p53_REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG

2.1.12 Gebrauchsfertige Systeme

Die gebrauchsfertigen Systeme wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Produkt	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
Ready Mix Taq PCR Reaction Mix mit MgCl ₂	Sigma, München, D
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
SYBR® GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
VECTASTATIN ABC Kit Peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
VECTASTATIN ABC Kit Peroxidase Goat IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
VECTASTATIN ABC Kit Peroxidase Guinea Pig IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.13 Software

Programm	Hersteller
Microsoft Office for Mac 2011	Microsoft, Redmont, USA
Leica Qwin 1.0	Leica Imaging Syst., Bensheim, D
SPSS Statistics 15.0 for Windows	SPSS, Chicago, USA
EndNote X6 Citation Tool	Thomson Reuters, New York, USA

2.1.14 Sterilisation von Materialien

Alle Medien, die in einem sterilen Zustand verwendet wurden, wurden entweder mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert, oder im Autoklav bei 120° C für 20 Minuten inaktiviert. Glas- und Plastikmaterialien wurden ebenfalls autoklaviert. Die Instrumente zur Gewebeentnahme wurden mit Hilfe von Ethanol gereinigt und ebenso im Autoklav sterilisiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierhaltung und Zucht

Alle Versuche fanden unter Beachtung der geltenden Tierschutzgesetze und ethischer Richtlinien statt. Die Haltung der verwendeten Mäuse erfolgte im Tierstall des Biomedizinischen Forschungsinstitutes der Universität Marburg. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen bei einer Temperatur von 21 °C einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Weiterhin erhielten die Tiere ein pelletiertes Standardzuchtfutter und Wasser ad libitum.

Um die gewünschten dreifach transgenen Mäuse zu erhalten mussten zunächst die Mäuse der vorhandenen $Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}$ -Mauslinie mit der $Snail^{-/-}$ -Mauslinie gekreuzt werden. Dazu wurden ein transge-

nes $Snail^{-/-}$ -Männchen mit zwei Pdx-1-Cre-Weibchen oder LSL-Kras^{G12D/+}-Weibchen verpaart. Die aus diesen Zuchtkäfigen geborenen Pdx-1-Cre; $Snail^{-/+}$ -Mäuse bzw. $Snail^{-/+}$;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse wurden untereinander wieder verpaart. Davon ausgeschlossen waren Tiere desselben Wurfes. Ziel war es dreifach transgene $Snail^{-/-}$;Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- Mäuse bzw. $Snail^{+/-}$;Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- Mäuse für die Beobachtungsgruppen zu züchten.

Geborene Jungtiere verblieben die ersten drei bis vier Wochen nach der Geburt bei der Mutter, danach erfolgte die geschlechtsabhängige Trennung zu maximal sechs Stück auf neue Käfige. Gleichzeitig erfolgte die Markierung der Mäuse mittels nummerierten Ohrclip und die Gewinnung einer Gewebeprobe zur Genotypisierung. Dazu wurde ein etwa fünf Millimeter kurzes Stück der Schwanzspitze abgetrennt und in einem ebenso nummeriertem Eppendorf-Tube verwahrt.

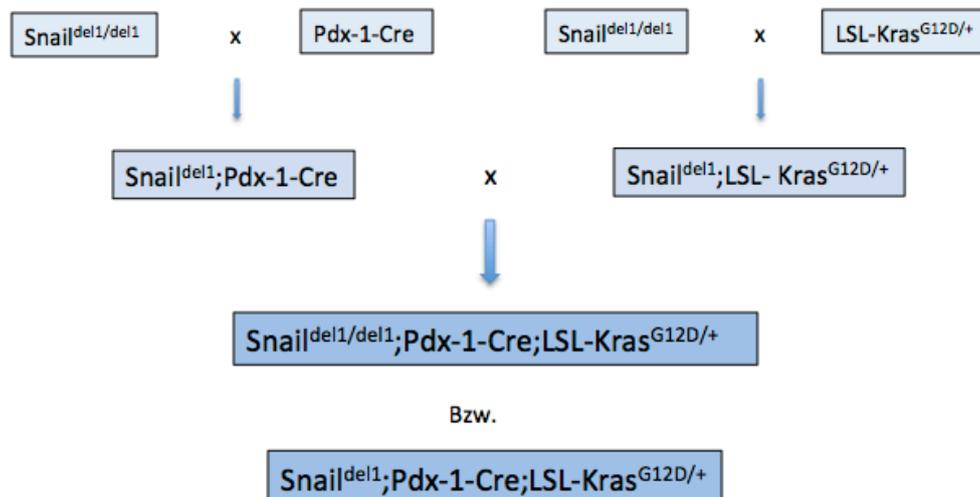


Abbildung 6: Verpaarungsschema

2.2.2 Versuchsaufbau

Die gezüchteten dreifach transgenen Pdx-1-Cre;Snail^{-/-};LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse wurden in sechs Gruppen mit einer Gruppengröße von mindestens n=4 Mäusen mit unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen eingeteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Geschlechterverhältnis möglichst ausgewogen ist. Die Beobachtungszeiträume betragen jeweils 2,4,6,8,10 und 12 Monate. Nach Erreichen des Endpunktes wurden die Mäuse getötet und das Pankreas zur Aufarbeitung entnommen. Im Fall von Krankheitsanzeichen, welche möglicherweise ein vorzeitiges Ausscheiden aus dem entsprechenden Beobachtungszeitraum verursachen, wurde die Maus vorzeitig getötet und derjenigen Gruppe zugeordnet, in deren Tötungszeitrahmen der Tod der Maus gefallen ist. Ebenso wurde mit den Vergleichsgruppen der dreifach transgenen Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse verfahren. Als Kontrollgruppen dienten uns Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse. Diese wurden nicht eigens gezüchtet, vielmehr nutzten wir bereits vorhandenes Pankreasgewebe aus vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe Fendrich. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieses Gewebe ausschließlich von unbehandelten Tieren stammte.

2.2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte aus der mittels PCR amplifizierten DNA, welche aus den gewonnenen Mäuseschwanzbiopsien extrahiert wurde. Zur Auswertung wurde die amplifizierte DNA gelektrophoretisch aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.3.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA verwendeten wir das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen. Das Gewebe wurde im ersten Schritt mit 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase-K über Nacht bei 56 °C inkubiert und lysiert. Am Folgetag wurde zunächst 200µl AL-Puffer hinzugegeben und die Proben durch Vortexen gut gemischt. Nach Zugabe von 100%-igem Ethanol und erneutem Vortexen wur-

den die Proben jeweils in eine Zentrifugationssäule eines Spin Column überführt und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Bei diesem Schritt blieb die zu extrahierende DNA auf einer Membran am Boden des Spin Column haften. Das Filtrat im 2ml-Sammeltube wurde verworfen und das Spin Column in ein neues 2ml-Sammeltube überführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 500 μ l AW1-Puffer und eine erneute Zentrifugation mit 8000 rpm für eine Minute, anschließend wurden 500 μ l AW2-Puffer hinzugegeben und das gefüllte Spin Column bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Im letzten Schritt wurde das Spin Column auf ein 1,5ml Eppendorf-Tube gesetzt und 200 μ l AE-Puffer hinzugegeben. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde nochmals bei 8000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -20 °C tiefgefroren und aufbewahrt.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die heute verwendete Form der Polymerasekettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis erfunden. Mit dieser Methode kann ein spezifisches DNA-Fragment mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase in mehreren Zyklen vervielfältigt werden. Der Prozess besteht zumeist aus 15-35 Zyklen und wird in einem Thermocycler durchgeführt (Mullis, Faloona et al. 1986). Dabei besteht jeder Zyklus aus drei Schritten und dauert etwa fünf Minuten:

1. Denaturierung: Zunächst wird die doppelsträngige DNA des Ausgangsmaterials auf 94-96 °C erhitzt. Hierbei kommt es zur Trennung der Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen.
2. Annealing (Anlagerung der Primer): Durch Abkühlen der Lösung auf 50 – 65 °C wird die Anlagerung der spezifischen Primer an ihre Zielsequenz ermöglicht.
3. Elongation: Die Lösung wird wieder auf 72 °C erhitzt, welches das Temperaturoptimum der taq-DNA-Polymerase darstellt. Die DNA-

Polymerase synthetisiert in diesem Schritt das spezifische DNA-Fragment mit Hilfe der, in der Lösung befindlichen, dNTPs.

2.2.3.3 Durchführung der PCR

Zur Anwendung der PCR wurden 2 μ l der extrahierten Maus-DNA, 10 μ l tag-Ready-Mix, jeweils 1 μ l des spezifischen Primers forward und reverse und 6 μ l destilliertes Wasser in 0,2ml Tubes gegeben. Als Positivkontrolle diente DNA, die bereits sicher positiv auf das Zielgen getestet worden war; Negativkontrolle war destilliertes Wasser. Der Ansatz durchlief anschließend das entsprechende Programm im Thermocycler.

PCR-Reaktionsansatz pro Probe:

Substanz	Menge
Ready Mix (Taq PCR-Reaction Mix)	10 μ l
dH ₂ O	6 μ l
Forward-Primer (20pmol/ μ l)	1 μ l
Reverse-Primer (20pmol/ μ l)	1 μ l
genomische DNA	2 μ l

PCR-Programm für Cre

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95 °C	4,0 min
	95 °C	0,5 min
	59 °C	0,5 min
	72 °C	0,5 min
1x	72 °C	5,0 min

PCR-Programm für Kras

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95 °C	3,0 min
	94 °C	1,0 min
	60 °C	2,0 min
	72 °C	1,0 min
1x	72 °C	3,0 min

PCR-Programm für Snail

Zyklen	Temperatur	Dauer
30x	94°C	3,0 min
	94°C	0,5 min
	60°C	0,5 min
	72°C	1,0 min
1x	72°C	7,0 min

2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese und PCR-Auswertung

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 3,4g Agarose mit 170ml eines zehnfach verdünnten TBE-Puffers gemischt und in der Mikrowelle etwa 3 Minuten gekocht. Anschließend wurden 14µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das noch flüssige Gel gleichmäßig in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Nach etwas 20-30 Minuten konnten die Platzhalter entfernt und das ausgehärtete Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt werden. Die mittels PCR amplifizierte DNA-Proben wurden nun in die Geltaschen pipettiert. In die erste Geltasche einer Reihe wurden jeweils 20µl eines Längenmarkers (GeneRuler) gegeben. Bei einer angelegten Spannung von 130 Volt erfolgte für 40 Minuten die Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Ladung im elektrischen Feld. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid konnten die Banden

anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse wurden fotografiert und hinsichtlich der entsprechenden DNA-Fragmente ausgewertet. Die Mäuse mit dem gewünschten Genotyp wurden dann den einzelnen Beobachtungsgruppen zugeteilt.

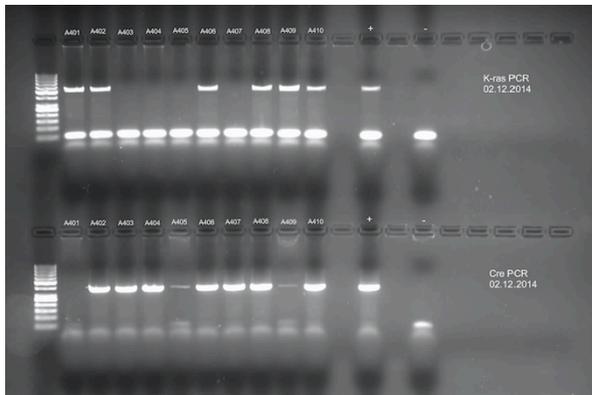


Abbildung 7: PCR Ergebnisse von Kras und Cre

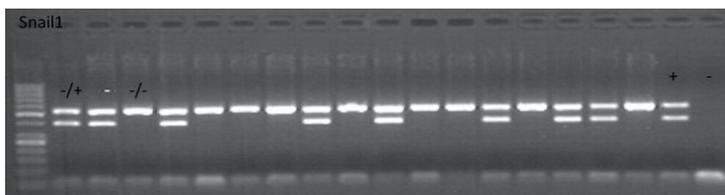


Abbildung 8: PCR Ergebnisse von Snail1

2.2.4 Präparation und Entnahme des Pankreas

Je nach Gruppenzuteilung wurden die Mäuse zu dem entsprechenden Zeitpunkt nach Injektion von Ketamin i.p. zur Sedierung mittels zervikaler Dislokation getötet. Daraufhin wurden zügig die Bauchhöhle und der Brustkorb eröffnet, der Darm nach links lateral luxiert um den Blick auf das Pankreas freizugeben und ein Foto des Situs gemacht. Das Pankreasgewebe wurde dann rasch entnommen und zur Hälfte in Formalin fixiert; die andere Hälfte wurde für die spätere RNA-Extraktion in TRIzol fixiert und umgehend bei -80 °C eingefroren. Bei Auffälligkeiten der entnommenen Pankreata wurden diese ebenfalls fotografiert ohne den Ablauf zu verzögern. Weiterhin wurden in gleicher Weise die Leber

und Milz entnommen und fixiert. Im eröffneten Brustkorb wurde zuletzt das Herz inzidiert und das Blut für die Gewinnung von Serum abpipettiert.

2.2.5 Einbetten von Gewebe in Paraffin und Erstellen histologischer Schnitte

Das in Formalin fixierte Pankreasgewebe wurde mit Unterstützung des Instituts für Pathologie der Universität Marburg nach standardisierter Methode in Paraffinblöcke eingebettet. Anschließend wurden daraus am Mikrotom je 20 $4\mu\text{m}$ dicke Serienschnitte angefertigt.

2.2.6 Hämalaun-Eosin-Färbung

Das auf den entsprechenden Objektträgern befindliche paraffinierte Pankreasgewebe wurde zweimal für je fünf Minuten in Xylol entparaffinisiert. Anschließend wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanolreihe 100%, 85%, 70%, 50% und deionisiertem Wasser jeweils zweiminütig dehydriert. Daraufhin erfolgte die fünfminütige Färbung in einer Hämalaun-Lösung nach Mayer und die anschließende Bläuung der Objektträger unter fließendem, lauwarmen Wasser für etwa zehn Minuten. Die Gegenfärbung wurde im Anschluss mit 0,5%-igen Eosin für 30 Sekunden durchgeführt. Nach zweimaliger Spülung mit dH_2O wurden die Schnitte mittels aufsteigender o.g. Ethanolreihe dehydriert und für je fünf Minuten in Xylol gestellt um Ethanolrückstände vollständig zu entfernen. Abschließend wurde das gefärbte Gewebe mit Histokitt eingedeckelt.

2.2.7 Immunhistochemische Färbung

Wie bereits bei der Hämalaun-Färbung wurden zunächst die Paraffinschnitte mit Xylol zweimal fünf Minuten entparaffinisiert. Die Hydrierung erfolgte ebenfalls mit einer absteigenden Ethanolreihe mit Ethanolkonzentrationen von 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% zu jeweils zwei Minuten. Anschließend wurden die Objektträger für je zwei Minuten in deionisiertes Wasser gestellt. Daraufhin wurden die Objektträger nun in Citratpuffer mit einem pH-Wert

von 6,0 überführt und etwa zehn Minuten in der Mikrowelle erhitzt um so die Antigene zu demaskieren. Nach dem Erhitzen folgte das Abkühlen der Objektträger für 20 Minuten auf Eis. Im Anschluss wurde dreimal für fünf Minuten mit dH₂O gespült und durch darauf folgendes Behandeln mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten die endogene Peroxidase deaktiviert. Nach kurzem Spülen mit dH₂O wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und das Präparat mit einem speziellen Stift kreisförmig markiert. Dies sorgt dafür, dass aufgetragene Flüssigkeiten nicht verlaufen und auf das Gewebe einwirken können. Die Objektträger wurden dann für fünf Minuten mit PBST gespült und daraufhin für eine Stunde mit BSA 10% bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde nochmals mit PBST gespült um die BSA-Lösung zu entfernen. Dann konnte der primäre Antikörper aufgetragen werden und die Objektträger wurden in der feuchten Kammer bei +4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die Entfernung des primären Antikörpers durch dreimalige Spülung mit PBST für je fünf Minuten. Im Anschluss wurde der entsprechende sekundäre Antikörper aufgetragen. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde der sekundäre Antikörper durch Spülen mit PBST entfernt. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation nach Auftragen des ABC-Reagenz. Dieses wurde danach ebenso durch mehrmaliges Spülen mit PBST entfernt. Zuletzt erfolgte das Auftragen von DAB-Chromogen um die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen sichtbar zu machen. Dies wurde unter Sicht am Lichtmikroskop durchgeführt. Bei ausreichender Braunfärbung wurde die Reaktion in dH₂O gestoppt. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für circa 20 Sekunden und anschließendes Bläuen unter lauwarmem, fließendem Wasser. Analog zur zu Beginn durchgeführten Hydrierung wurden die Objektträger entgegengesetzt in einer aufstiegen Ethanolreihe wieder dehydriert. Im Anschluss wurden die Objektträger für zweimal fünf Minuten in Xylol gestellt und das Gewebe mittels Histokitt eingedeckelt.

2.2.8 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus dem in TRIzol fixiertem Pankreasgewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit des Herstellers Qiagen. Zunächst wurde das Pankreasgewebe mit einem Homogenisator vollständig homogenisiert. Dazu wurde im Anschluss 500 μ l Trizol dazugegeben und bei Raumtemperatur für 5 min. inkubiert. Anschließend wurden 300 μ l Chloroform hinzugegeben und die Proben zur Durchmischung gut geschüttelt bis eine milchige Lösung entstand. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurden die Proben in eine Thermozyentrifuge überführt und bei +4°C mit 12000 rpm zentrifugiert. Dabei entstand ein zwei-Phasen-Gemisch, von welchem die obere, wässrige Phase abpipettiert (350 μ l) und in ein neues 2,0ml-Tube überführt wurde. Dazu wurden sodann 350 μ l 70% Ethanol gegeben, die Proben gut durchmischt. Diese Lösung wurde dann für 15 sec. mit 10000 rpm zentrifugiert. Das Sammelrohr wurde danach verworfen und die Zentrifugationssäule wurde in ein neues Sammelrohr transferiert, 700 μ l RM1-Puffer dazugegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert. Wieder wurde der Durchfluss verworfen und die Zentrifugationssäule auf ein neues Sammelrohr übertragen. Darauf werden nun 500 μ l RPE-Puffer gegeben und es erfolgt die erneute Zentrifugation für 2 min. mit 10000 rpm. Abschließend wird die Zentrifugationssäule auf ein 1,5 ml Sammelrohr transferiert. Nach Zugabe von 40 μ l RNase freiem H₂O wurde die Zentrifugationssäule für 1 min. inkubiert und dann für 1 min. mit 10000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Eluat enthält die gereinigte RNA, die bei -80°C gelagert wurde.

2.2.9 Synthese von cDNA

Vor der Synthese der cDNA wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers die Konzentration der extrahierten RNA bestimmt. Dies erfolgt auf Basis des Lambert-Beer'schen - Gesetzes bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280nm. Aufgrund unterschiedlicher RNA-Konzentration wurde die RNA im Anschluss verdünnt um eine Standardkonzentration von 1 μ g/ μ l zu erhalten. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend mittels RT-PCR amplifiziert und quantitativ gemessen. Zur

Synthese der cDNA wurden das SuperScript III First-Strand Synthesis System der Fa. Invitrogen genutzt. Dem Herstellerprotokoll entsprechend wurde zunächst max. 8 μ l RNA in einem 1,5ml Tube auf Eis vorgelegt und folgender Reaktionsansatz hinzugegeben:

Substanz	Menge
Oligo dT DNA (12-18 bp)	1 μ l
10mM dNTP Mix	1 μ l
dH ₂ O	10 μ l

Die Lösung wurde dann bei 65°C für fünf Minuten inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis heruntergekühlt. Im Anschluss wurde der Probe der Synthese-Mix hinzugefügt. Dieser besteht aus folgenden Produkten:

Substanz	Menge
DTT (0,1M)	1 μ l
RNase Out	1 μ l
First Strand Buffer (5x)	4 μ l
Super Script III Reverse Transkriptase (200U/ μ l)	1,5 μ l

Die Lösung wurde dann gut durchmischt, kurz bei 4000 rpm zentrifugiert und bei 50°C für 60 Minuten inkubiert um die Primeranlagerung zu ermöglichen. Zum Beenden der Reaktion wurde die Probe zuletzt für fünf Minuten auf 85°C erhitzt. Durch Hinzugabe von 1 μ l RNase H und Inkubation bei 37°C für 20 Minuten wurden letzte RNA-Reste entfernt. Die fertige cDNA wurde umgehend in das Labor unseres Kooperationspartners Dr. Matthias Lauth gebracht und dort weiterverarbeitet.

2.2.10 Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde durch den Kooperationspartner Dr. Matthias Lauth am Marburger Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung durchgeführt und ausgewertet.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des 7500 Fast Sequence Detection System der Fa. Applied Biosystems. Die Messung wurde in einer 96- Wells- Platte mit zwei Replikaten für jede cDNA- Probe durchgeführt. Als Vorlage für die Amplifikation des Zielgens wurde 1 µl cDNA verwendet.

2.2.11 Auswertung der Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien

Zur Beurteilung des Progressionsgrades wurde jeweils ein H.E.-gefärbter Schnitt jeder Maus hinsichtlich dem Auftreten von PanINs oder invasiver Karzinome ausgewertet. Dementsprechend wurden die Gesamtzahl normaler Pankreasgänge und der PanINs, sowie deren spezifischer Grad bestimmt. Die ausgezählten PanIN-Läsionen und normalen Gänge wurden mittels Microsoft Excel und SPSS statistisch ausgewertet.

Läsion	Histologie
PanIN 1a	Muzinöse Zellhyperplasie. Ersatz des Gangepithels durch Becherzellen mit zytoplasmatischer Schleimansammlung und basal liegenden Zellkernen. Keine Atypien.
PanIN 1b	Die Läsionen haben einen papillären oder pseudopapillären Aufbau und ähneln den Epithelien der PanIN-1A-Läsionen. Es handelt sich hierbei um fokale fibrovaskulär gestielte Hyperplasien von muzinös differenzierten Gangepithelien, die die mittleren und großen Gallengänge betreffen. Keine Atypien.

PanIN 2	Die Gangstrukturen besitzen ein flaches oder papillär-hyperplastisches Epithel, das zelluläre Atypien aufweist. Nukleäre Veränderungen, wie Kernhyperchromasie oder Polaritätsverlust.
PanIN 3	Die Läsionen zeigen ausgeprägtere nukleäre und zelluläre Atypien, histologisch kennzeichnet sie ein papilläres, teilweise kribriform imponierendes Epithel. Mitosen, Nekrosen und zelluläre Atypien kommen vor.

Abbildung 9: Einteilung der PanINs anhand histologischer Merkmale. Modifiziert nach (Hruban, Adsay et al. 2006)

2.2.12 Statistische Datenauswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel für Mac und SPSS statistisch ausgewertet.

Folgende Signifikanzniveaus wurden definiert:

Signifikant entspricht $p < 0,05$

Nicht signifikant entspricht $p \geq 0,05$

3 Ergebnisse

3.1 Zucht der Mäuse mit dem gewünschten Phänotyp

Die bereits vorhandenen zweifach transgenen Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D}- Mäuse wurden auf bis zu 40 Elterntiere aufgestockt. Parallel dazu wurden zwei Snail^{+/-}-Mäuse verpaart um die für die weitere Zucht notwendigen homozygoten Snail^{-/-}-Mäuse zu erhalten. Diese Mauslinie wurde ebenfalls aufgestockt um die Zucht, wie in Kapitel 2.2.1 erläutert, durchzuführen. Die Jungtiere wurden mittels PCR genotypisiert und entsprechend ihres Genotyps einer Gruppe zugeteilt. Aufgrund der aufwendigen Zucht wurden für diese Arbeit in etwa 800 Mäuse geboren. Zunächst wurden die Gruppen des Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten etabliert. Im Verlauf chronologisch absteigend die weiteren Gruppen. Die Mäuse wurden regelmäßig beobachtet und kontrolliert um etwaige Krankheitszeichen frühzeitig zu erkennen.

3.2 Makroskopie

Makroskopisch ergab sich bei keiner der getöteten Mäuse der Anhalt auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms. Die entnommenen Pankreata waren von weicher Struktur und normaler Größe. Ebenso fanden sich keine makroskopischen Auffälligkeiten anderer Organe. Bei lediglich 3 Mäusen zeigten sich nach Eröffnung des Bauchraumes zystische Raumforderungen im Bereich des Pankreaskopfes (s. Abb 8). Diese waren mit serösem klarem Sekret gefüllt. Ein Malignitätsnachweis konnte nicht erbracht werden.



Abbildung 10: Zyste im Bereich des Pankreaskopfes bei ansonsten unauffälligem Pankreasgewebe

3.3 Histopathologische Auswertung

In den HE-Färbungen konnte analog zu den makroskopischen Befunden kein invasives Karzinom nachgewiesen werden. Auch in den Kontrollgruppen war histologisch kein Karzinom nachweisbar. Alle Pankreata zeigten jedoch duktale Veränderungen welche identisch zu den oben beschriebenen humanen PanIN-Läsionen waren. Mit Zunahme des Alters der Mäuse stieg die Anzahl der Läsionen sowie deren Grad. Damit konnten die Beobachtungen von Hingorani et al. reproduziert werden. (Hingorani, Petricoin et al. 2003). Die $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras $^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse zeigten jedoch einen insgesamt langsameren Progress in der Initiation und Progression der PanIN-Läsionen. Ab einem Alter von 6 Monaten zeigten die Mäuse der Kontrollgruppe ausgedehnte PanIN-Läsionen mit nur wenig normalem Restpankreas. In den $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras $^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen hingegen zeigt sich in einem Alter von über 6 Monaten noch zahlreiches normales Pankreasgewebe (s. Abb 10-15).

Zur detaillierteren Auswertung wurden von jeweils zwei HE-gefärbten Schnitten jeder Maus alle normalen Gänge sowie PanIN-Läsionen gezählt und erfasst. Diese Daten wurden im Anschluss statistisch ausgewertet (s. Kapitel 3.4)

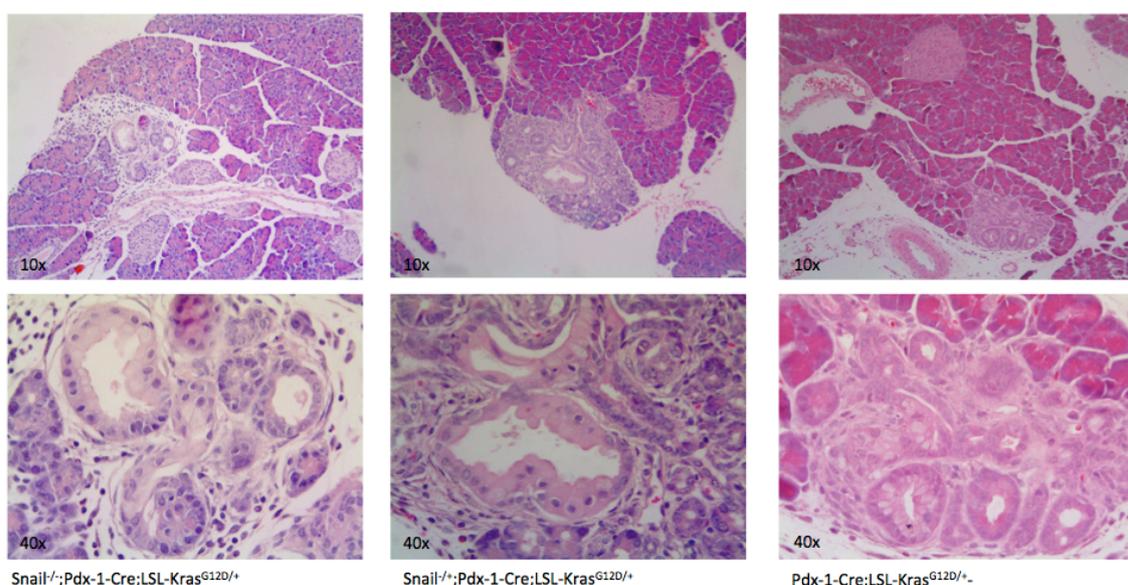


Abbildung 11: HE-Färbungen von 2 Monate alten Mäusen.

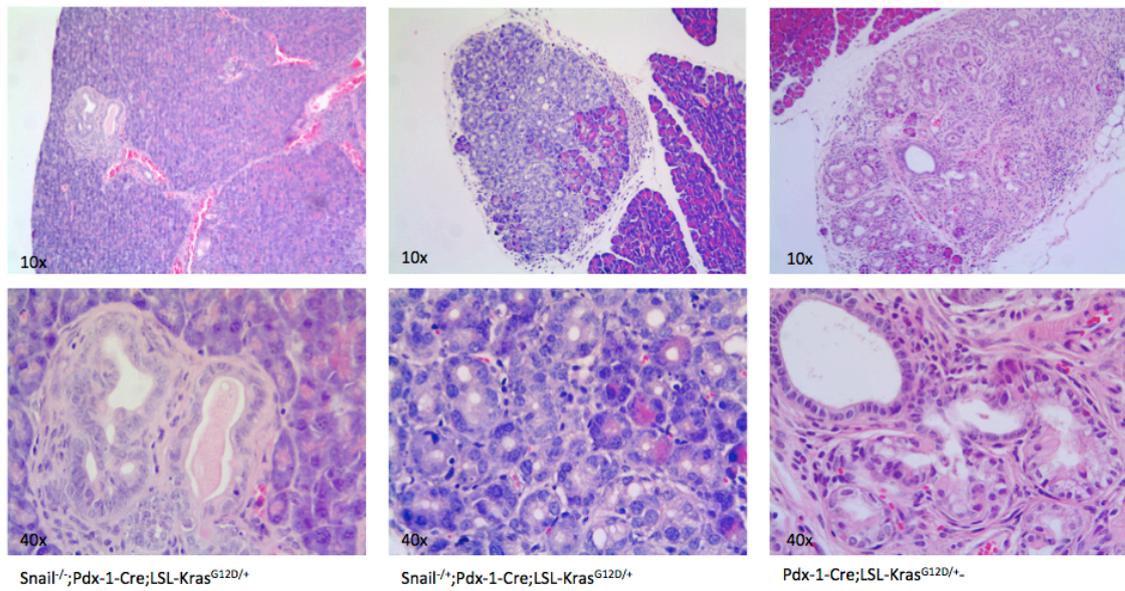


Abbildung 12: HE-Färbungen von 4 Monate alten Mäusen.

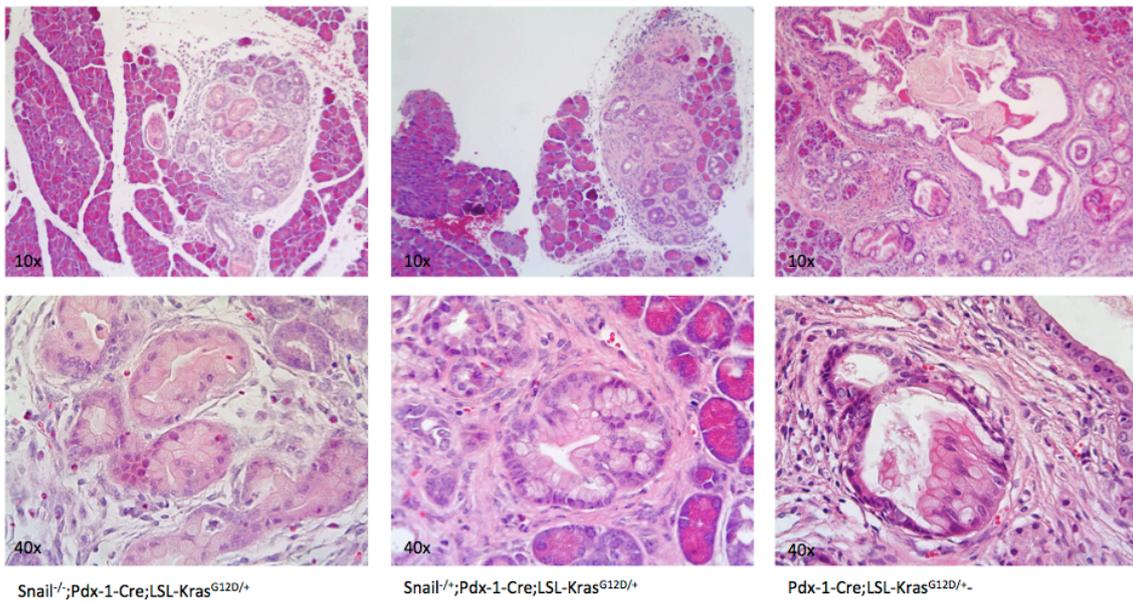


Abbildung 13: HE-Färbungen von 6 Monate alten Mäusen.

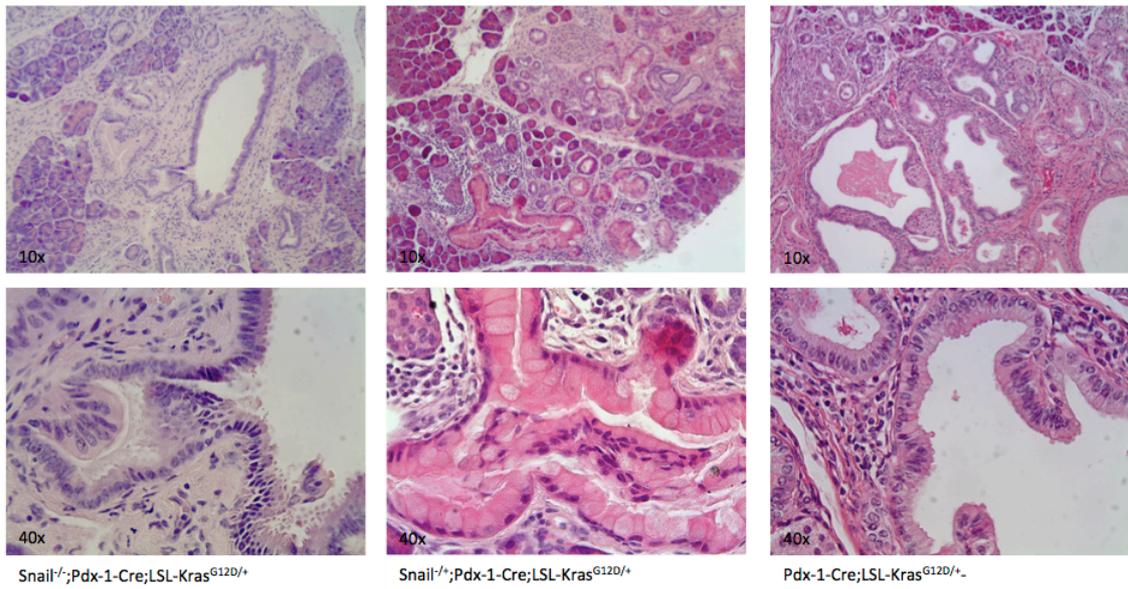


Abbildung 14: HE-Färbungen von 8 Monate alten Mäusen.

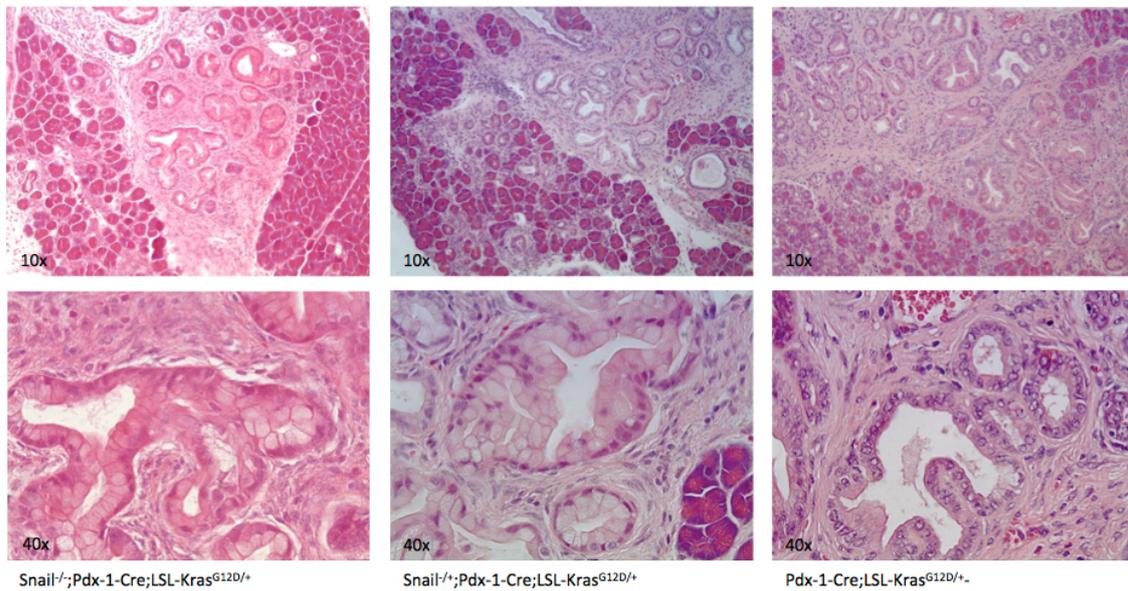


Abbildung 15: HE-Färbungen von 10 Monate alten Mäusen.

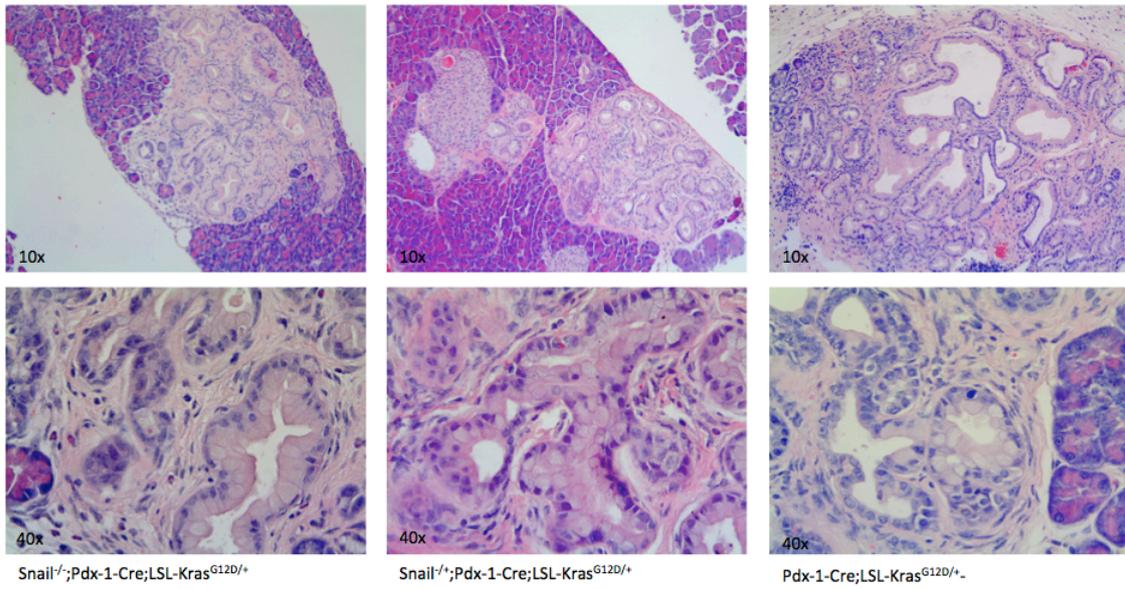


Abbildung 16: HE-Färbungen von 12 Monate alten Mäusen.

3.4 Quantifizierung der PanIN-Läsionen

Im Alter von 2 Monaten zeigten sich bereits zwischen den verschiedenen Gruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich des Auftretens und dem Progress von PanIN-Läsionen. Sowohl homozygote als auch heterozygote $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse zeigten zu fast 100% normales Pankreasgewebe. In der Kontrollgruppe lag der Anteil bei 85% ($p=0,001$). Im Alter von 4 Monaten zeigte sich ebenso ein signifikanter Unterschied im Auftreten von normalen Gängen ($p<0,001$). Weiterhin kam es in der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Zunahme von PanIN-1a (44,5%, $p<0,001$) und PanIN1b (21,7%, $p=0,008$) Läsionen sowie zu einer Abnahme von normalen Gängen (27,9%). Die homozygoten und heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse besaßen noch 89,9% u. 92,7% normale Gänge ($p<0,001$). Die Anzahl an PanIN-1a und PanIN-1b-Läsionen hat im Vergleich zur 2-Monatsgruppe zwar zugenommen, ist jedoch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p<0,05$) (s. Abb. 16).

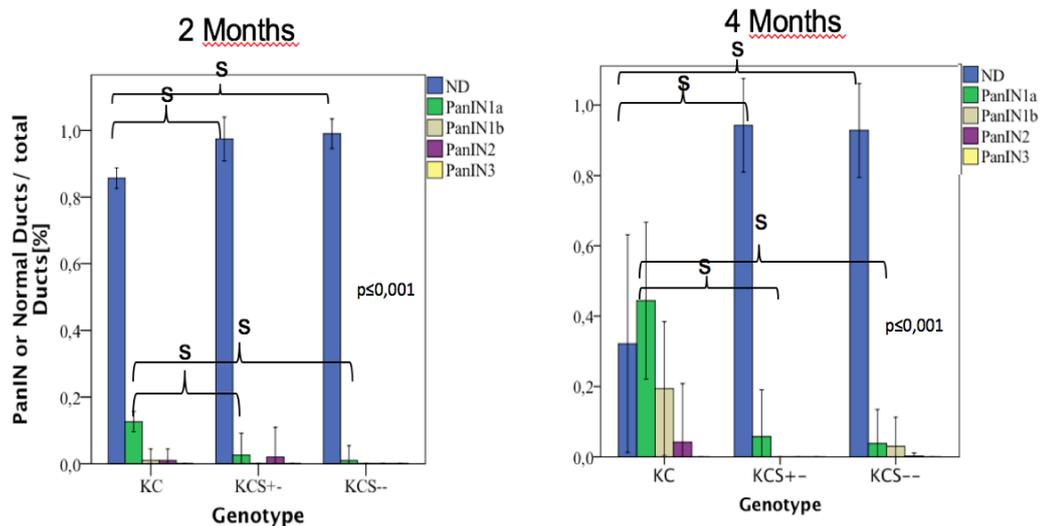


Abbildung 17: Prozentualer Anteil von normalen Gängen (ND) und PanINs im Alter von 2 und 4 Monaten

Mit Zunahme des Alters zeigte sich sowohl bei den homozygoten als auch heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen eine deutlich langsamere Progression der PanIN-Läsionen, dies wurde insbesondere ab einem Alter von 8 Monaten imminent. Im Alter von 6 Monaten zeigte die Kontrollgruppe lediglich 40,8 % normale Gänge. Die heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse besaßen noch 78,6 % normale Gänge ($p < 0,003$), die homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse 75,8 % ($p < 0,003$). Ebenso zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den heterozygoten und homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen im Hinblick auf PanIN1a- und PanIN1b-Läsionen ($p < 0,005$). Im Alter von 8 Monaten kam es zu einer deutlichen Reduktion von normalen Gängen in der Kontrollgruppe. Die Anzahl an PanIN-Läsionen nahm hier insgesamt zu, insbesondere zeigten sich auch höhergradige PanIN-2 und PanIN-3-Läsionen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Snail-Knock-Mäusen. Auch bei den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen kam es zu einer Abnahme von normalen Gängen. Die Anzahl an PanIN-Läsionen blieb weitestgehend konstant. Es zeigte sich jedoch ein signifikant höherer Anteil an PanIN-1a Läsionen bei den heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen im Vergleich zu den homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen ($p = 0,019$).

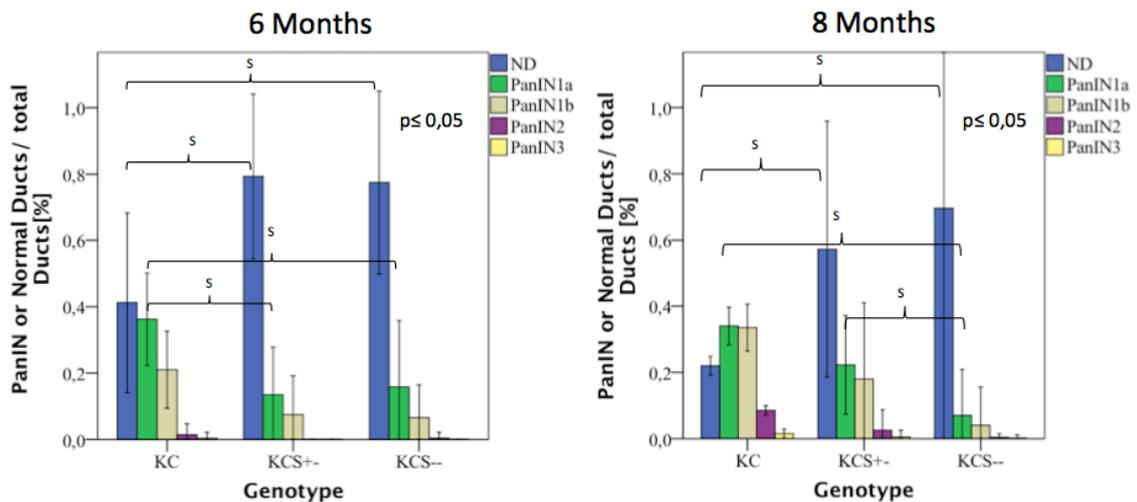


Abbildung 18: prozentualer Anteil von normalen Gängen (ND) und PanINs im Alter von 6 und 8 Monaten

In den Gruppen der 10 und 12 Monate alten Versuchstiere zeigte sich wie zuvor eine deutlich langsamere Progression der PanIN-Läsionen bei den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen. Im Alter von 10 Monaten war die Anzahl der normalen Gänge bei den homozygoten und heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen mit 64,5% ($p=0,019$) und 64,8% ($p=0,009$) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (10,9%). Weiterhin hatten die Mäuse der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Anzahl an PanIN-1b-Läsionen (64,5%) im Vergleich zu den homozygoten ($p=0,03$) und heterozygoten ($p=0,013$) Snail -Knock-Out Mäusen. Im Alter von 12 Monaten zeigte die Kontrollgruppe lediglich 7,3% normale Gänge und deutlich mehr PanIN-Läsionen als die $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse (s. Abb. 18). Ein invasives Karzinom ließ sich über alle Gruppe hinweg nicht nachweisen. Die Anzahl der normalen Gänge bei den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse war signifikant höher ($p=0,01$ u. $p=0,03$).

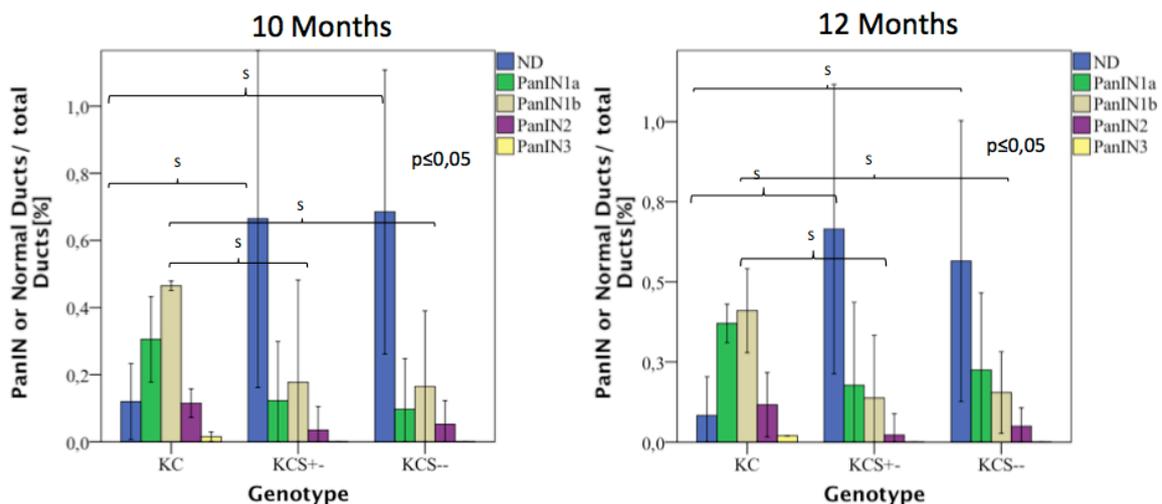


Abbildung 19: prozentualer Anteil von normalen Gängen (ND) und PanINs im Alter von 10 und 12 Monaten

Um den Progress der PanIN-Läsionen genauer zu betrachten erfolgten die Bestimmung der absoluten Anzahl von PanINs und deren Grad sowie die Anzahl normaler Gänge bei jeweils zwei repräsentativen Schnitten jeder Maus. Wie bereits bei Hingorani *et al.* beschrieben zeigte sich bei den untersuchten Schnitt-

ten innerhalb derselben Altersgruppen eine gewisse Variabilität in der absoluten Anzahl an PanIN-Läsionen. Die ist am ehesten darauf zurück zu führen, dass die Expression von Cre in den Pdx-1-Cre-Mäusen nicht einheitlich ist (Hingorani, Petricoin et al. 2003).

In allen Gruppen der verschiedenen Genotype zeigten sich zusammenfassend mit Zunahme des Alters eine erhöhte Gesamtzahl von PanIN-Läsionen sowie eine Zunahme der PanIN-Grade. Die Gesamtzahl der PanIN-Läsionen sowie deren Progression waren in den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Die Zahl der normalen Gänge war über alle Altersgruppen hinweg bei den Pdx-1-Cre;Snail^{del1};LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen signifikant höher als in den Kontrollgruppen.

3.5 Immunhistochemische Auswertung

3.5.1 Snail1

Der Transkriptionsfaktor Snail1 ließ sich in den Snail^{-/-};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- bzw. Snail^{+/-};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}- Mäusen nur vereinzelt anfärben. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte eine deutliche stärkere Anfärbung. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Anfärbung nicht differenziert wurde. Als aktiver Transkriptionsfaktor ist Snail1 lediglich im Nukleus lokalisiert (s. Kapitel 1.4.4.2) (Rosivatz, Becker et al. 2006).

Exemplarisch werden im folgenden Färbungen von 4, 8 und 12 Monate alten Versuchstieren gezeigt (Abb. 19 – 21).

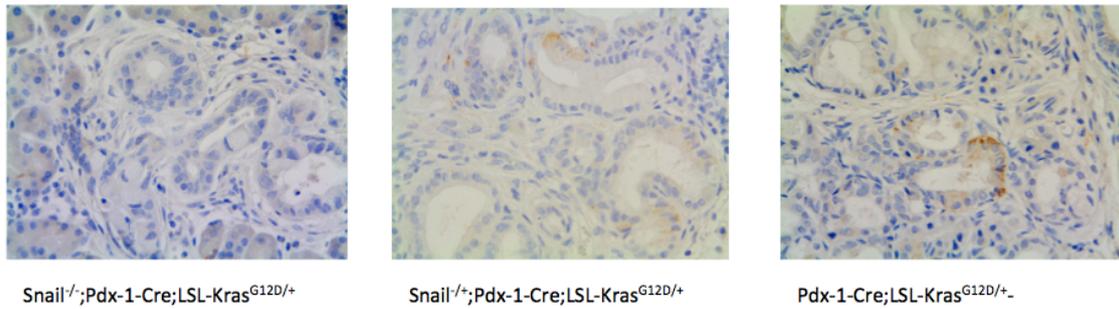


Abbildung 20: Snail in 40facher Vergrößerung bei 4 Monate alten Versuchstieren

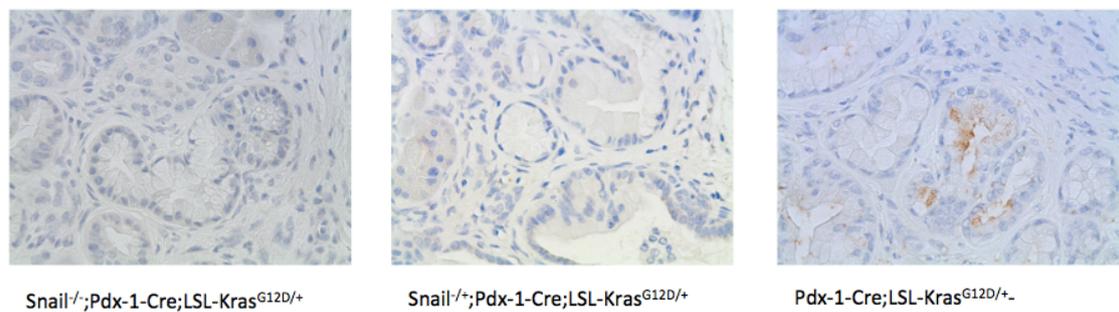


Abbildung 21: Snail in 40facher Vergrößerung bei 8 Monate alten Versuchstieren

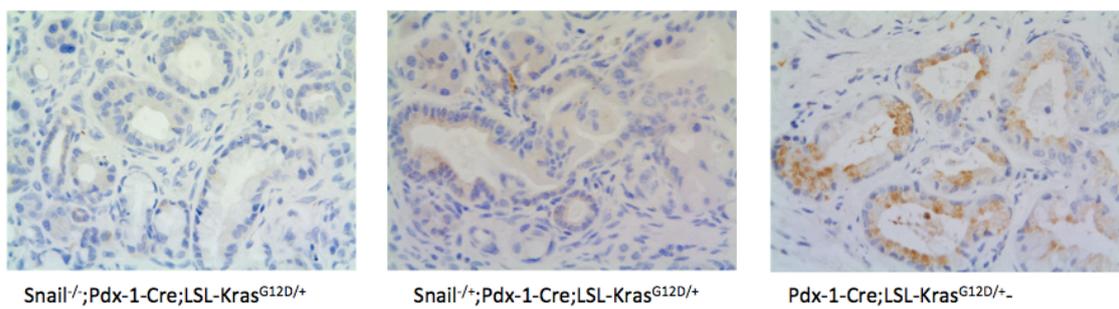


Abbildung 22: Snail in 40facher Vergrößerung bei 12 Monate alten Versuchstieren

3.5.2 E-Cadherin

E-Cadherin ist ein epithelialer Marker der EMT und wird wie bereits beschrieben direkt von Snail1 reguliert. Snail1 fungiert dabei als Repressor, so dass zu erwarten ist, dass in Anwesenheit von Snail die E-Cadherin Expression niedriger ist und die Zellen vermehrt mesenchymale Marker exprimieren. Dies konnte für verschiedenste humane Tumorentitäten bereits nachgewiesen werden (Thiery 2002, Becker, Rosivatz et al. 2007). In allen untersuchten histologischen Schnitten zeigte sich eine positive membranäre E-Cadherin Anfärbung. In den Kontrollgruppen zeigte sich insgesamt eine etwas schwächere Anfärbung von E-Cadherin. Eine positive Anfärbung zeigte sich sowohl in normalem Pankreasgewebe als auch in den PanIN-Läsionen (s. Abb. 22-24).

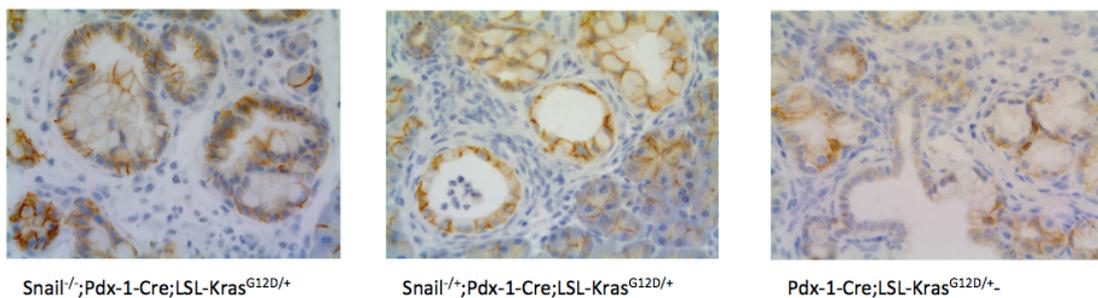


Abbildung 23: positive membranäre E-Cadherin-Anfärbung (40fache Vergrößerung) bei 4 Monate alten Mäusen

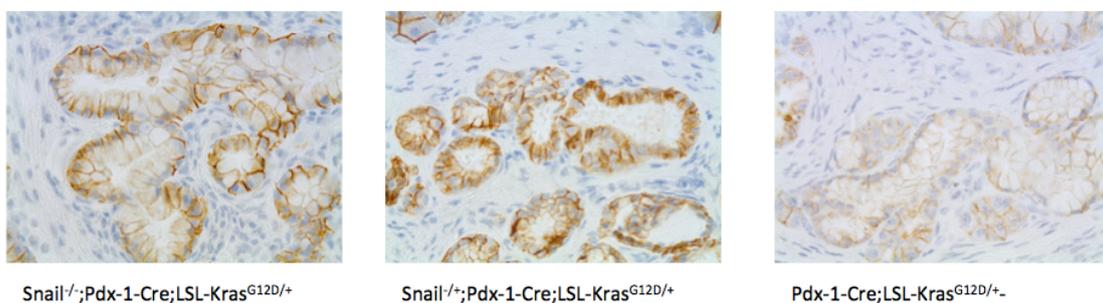


Abbildung 24: positive membranäre E-Cadherin-Anfärbung (40fache Vergrößerung) bei 8 Monate alten Mäusen

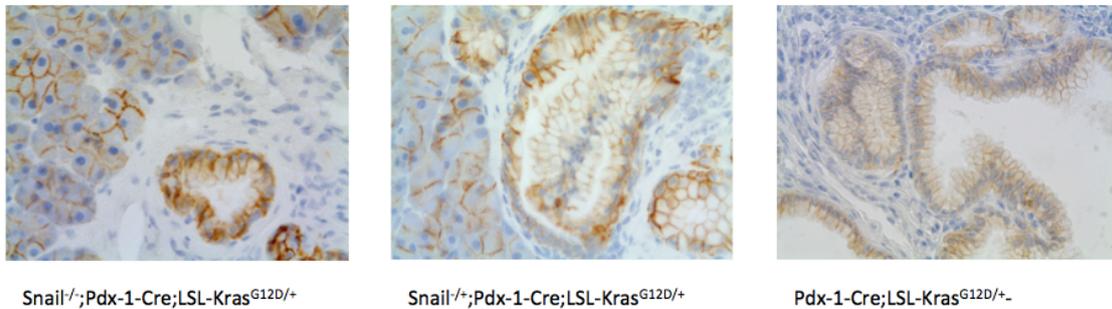


Abbildung 25: positive membranäre E-Cadherin-Anfärbung (40fache Vergrößerung) bei 12 Monate alten Mäusen

3.5.3 MMP-7

Proteine der Familie der Matrixmetalloproteinasen fördern den Umbau der Extrazellulärmatrix (ECM) in der EMT, Tumorwachstum und –invasion sowie die Angiogenese (Nabeshima, Inoue et al. 2002).

Es zeigte sich bei allen Mäusen der Kontrollgruppen eine stark positive Anfärbung von MMP-7. Bei den Snail-Knock-Out Mäusen hingegen zeigte sich eine allenfalls schwache Anfärbung.

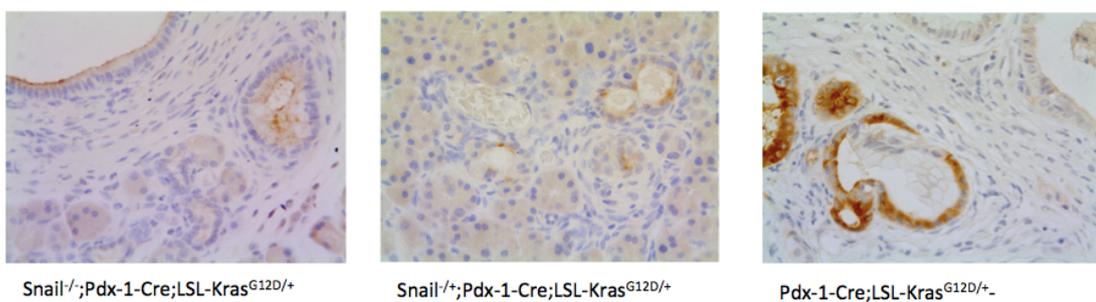


Abbildung 26: MMP-7 (40x) bei 4 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)

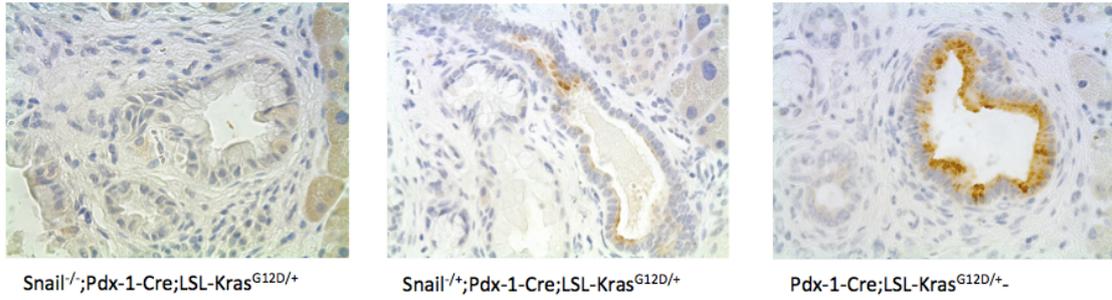


Abbildung 27: MMP-7 (40x) bei 8 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)

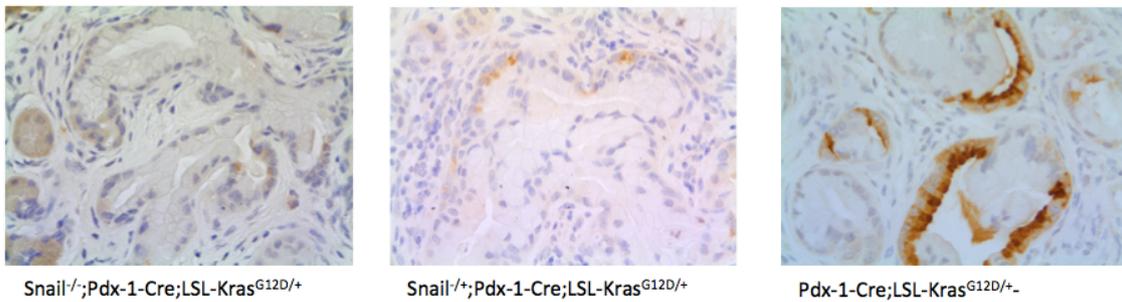


Abbildung 28: MMP-7 (40x) bei 12 Monate alten Mäusen. Stark positive Reaktion in der Kontrollgruppe (rechts)

3.5.4 CK-19

Cytokeratin-19 dient als epithelialer Marker in der histologischen Untersuchung zum Nachweis der epithelialen Herkunft von Pankreaskarzinomen bzw. PanIN-Läsionen (Hingorani, Petricoin et al. 2003). Zwischen den $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen und der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von CK19 (s. Abb. 28-30).

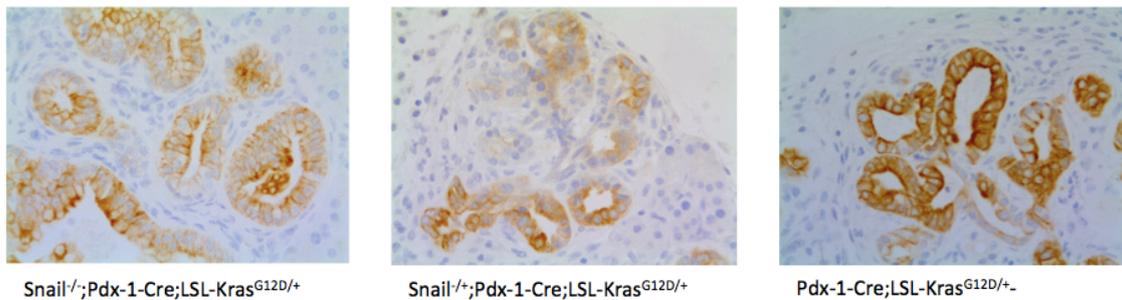


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 4 Monate alten Mäusen

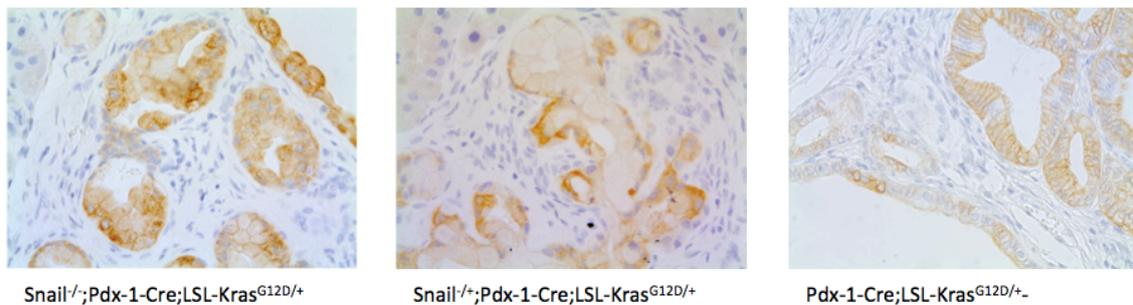


Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 8 Monate alten Mäusen

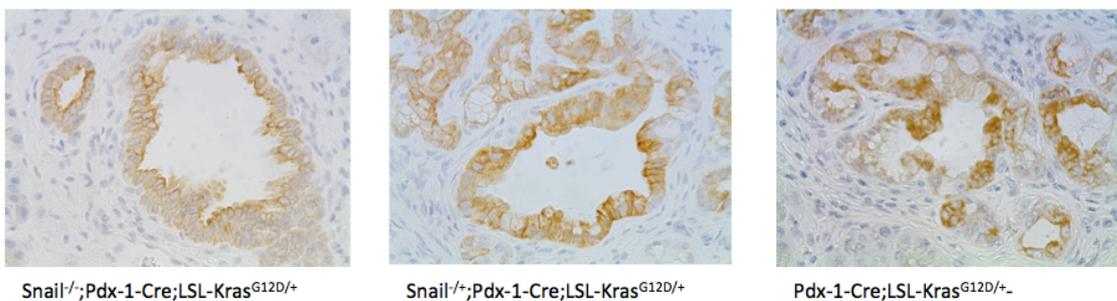


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung von CK-19 bei 12 Monate alten Mäusen

3.5.5 Amylase

Bei der Immunhistochemie von Amylase als wichtigem Marker der exokrinen Pankreasfunktion zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Gruppenvergleich

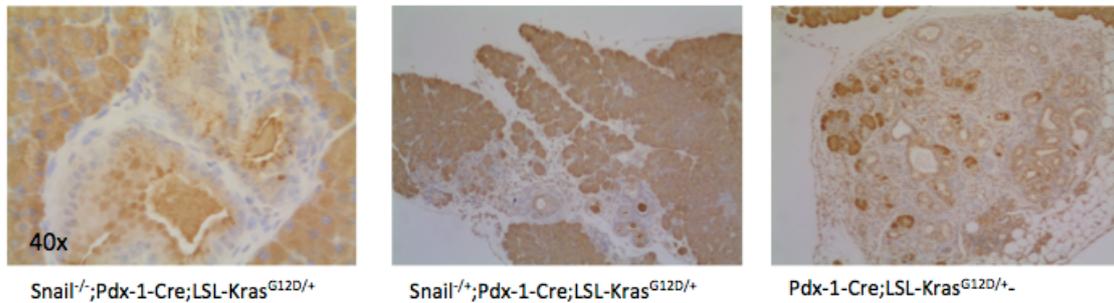


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von Amylase bei 4 Monate alten Mäusen

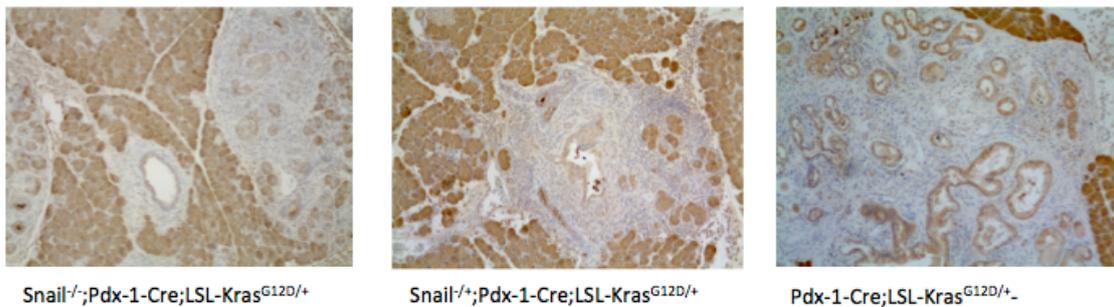


Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung von Amylase bei 8 Monate alten Mäusen

3.5.6 SOX9

Sox-9 gehört zur Familie der Sox (SRY-related high-mobility group [HMG] box) Transkriptionsfaktoren. Neben der Chondrogenese und der Geschlechtsdeterminierung konnte auch für zahlreiche Tumorentitäten eine aberrante Sox-9 Expression nachgewiesen werden (Zhang, Guo et al. 2012, Wang, He et al. 2013).

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten bei den homozygoten den $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen keine bis sehr schwache Positivität für SOX-9. Die heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};$ Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse und die Kontrollgruppe hingegen zeigten eine verstärkte Anfärbung (s. Abb. 33). Diese Ergebnisse werden auch mit der qRT-PCR auf Transkriptionsebene bestätigt.

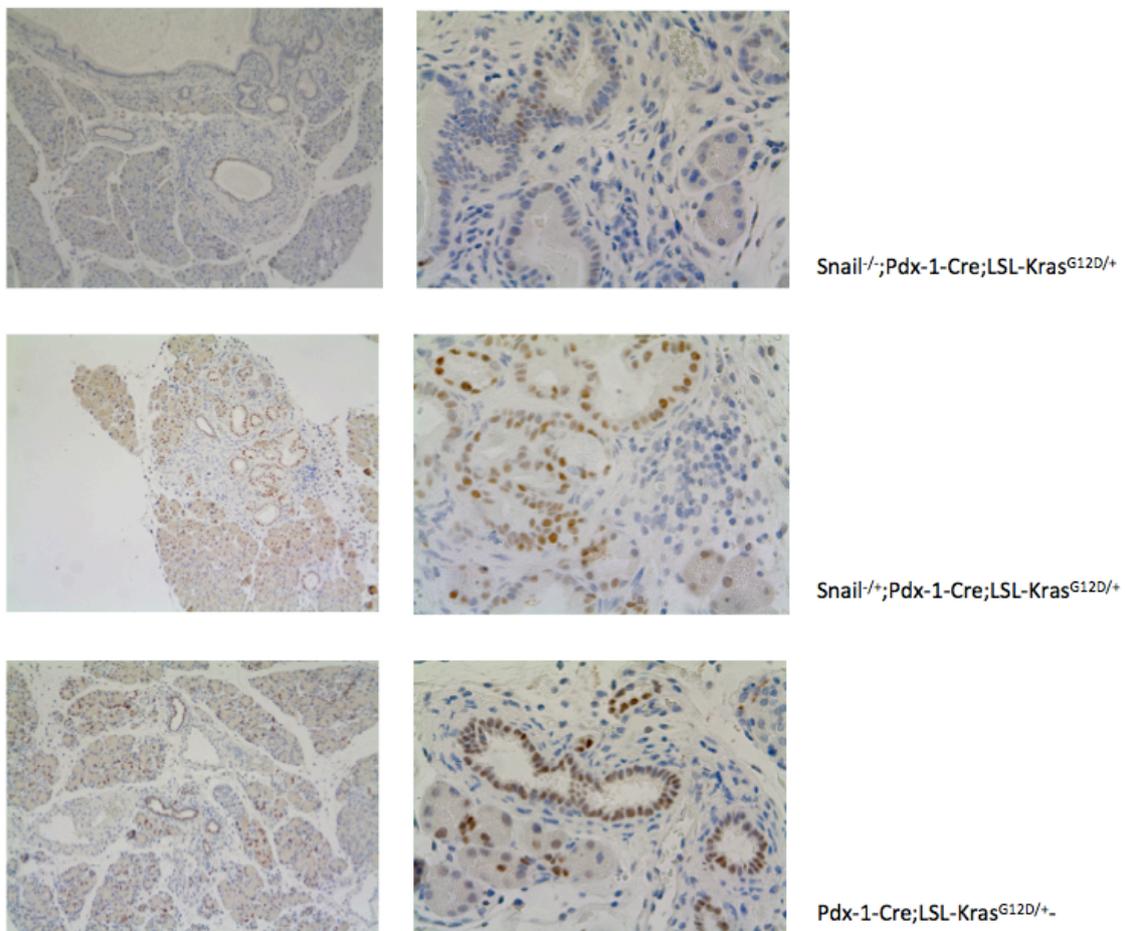


Abbildung 34: Immunhistochemie von Sox9 bei 4 Monate alten Mäusen

3.6 Real-Time PCR

Histopathologisch und Immunhistochemisch zeigte sich bereits ein deutlicher Einfluss des Snail-Knockouts auf die PanIN-Progression und die Expression verschiedener EMT-Marker. Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR wurden Proben von homozygoten und heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen und den Kontrollen ($\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$) auf das Vorhandensein von mRNA der Transkriptionsfaktoren Snail1, Cdh1/E-Cadherin, Twist1 und Sox-9 untersucht.

Die Snail-Expression aller untersuchten Altersgruppen der homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäuse war signifikant niedriger ($p \leq 0,05$) als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 34). Trotz des Knock-Outs von Snail war Snail in den homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen nachweisbar. Dies liegt am ehesten an der unvollständigen Penetranz von Cre in dem Pdx-1-Cre-Mäusen.

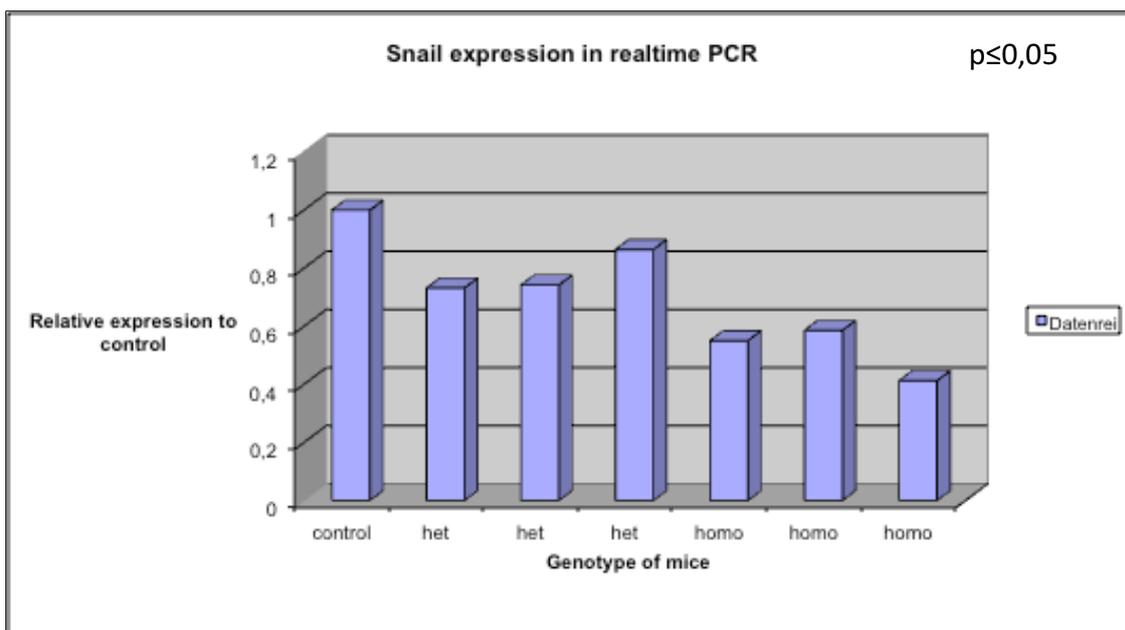


Abbildung 35: Real-Time PCR Snail

Die Expression von des epithelialen EMT-Markern Cdh1 / E-Cadherin war bei allen homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen wider Erwarten signifikant niedriger als in der $\text{Kras};\text{Pdx-1-Cre}$ -Kontrollgruppe. Bei den untersuchten heterozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen war in lediglich einer Probe die Expression von E-Cadherin auf Transkriptionsebene im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (s. Abb. 35).

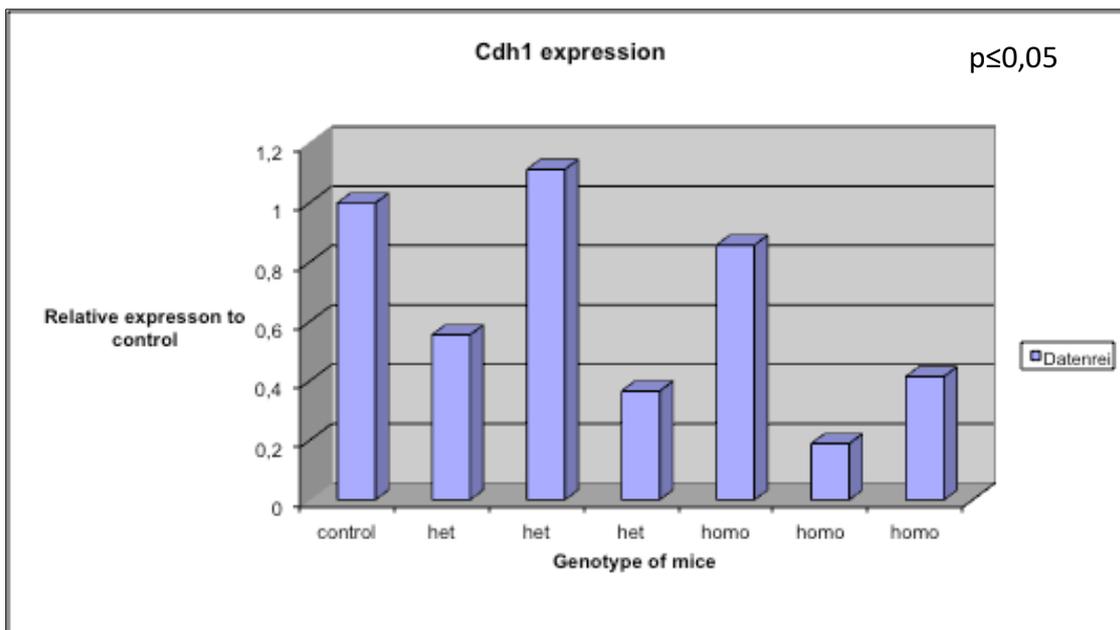


Abbildung 36: Real-Time PCR E-Cadherin

Twist1 ist wie Snail ein Protein der EMT und wird bereits in der Embryonalentwicklung benötigt. Die Expression von Twist ist ebenso mit einer verringerten E-Cadherin Expression assoziiert. Weiterhin konnte für Twist1 ein Einfluss auf den Zellzyklus nachgewiesen werden. Durch Herabregulation von p53 führt es zur Hemmung der Apoptose (Yang, Mani et al. 2004)

In allen untersuchten Proben zeigte sich auf der Transkriptionsebene eine signifikant geringere Expression von Twist im Vergleich zu der Kontrollgruppe (s. Abb. 36).

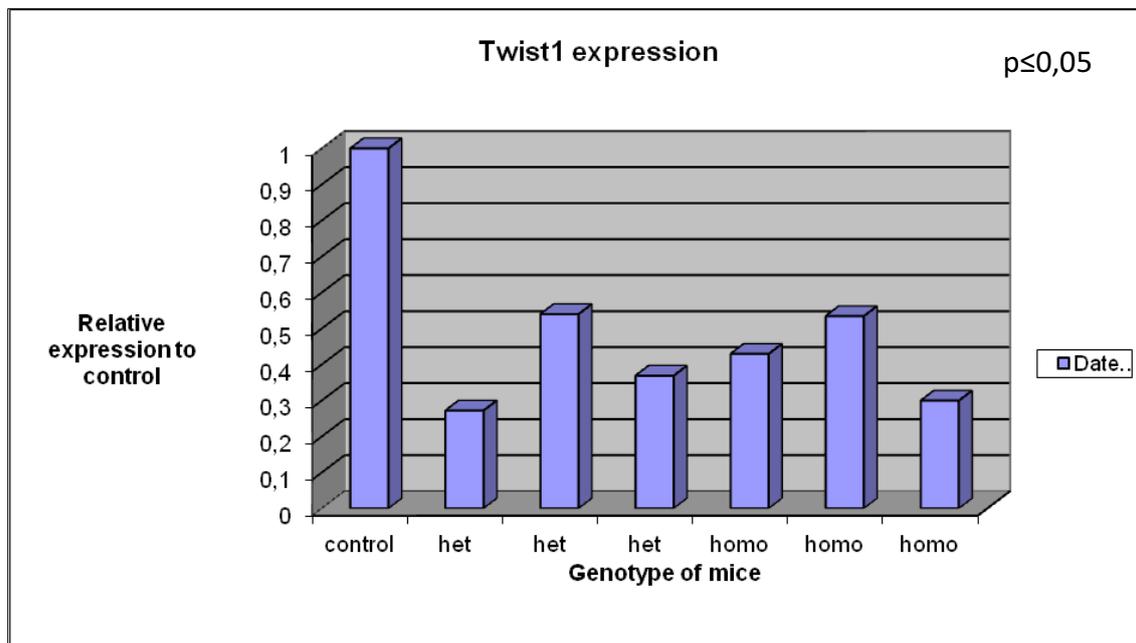


Abbildung 37: Real-time PCR Twist 1

Einhergehend mit den Beobachtungen in der Immunhistochemie für den dukalen Marker Sox-9 zeigt sich in der qRT-PCR ein konkordantes Ergebnis. Sowohl heterozygote als auch homozygote *Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse zeigten eine signifikant niedrigere Sox-9-Expression auf Transkriptionsebene im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

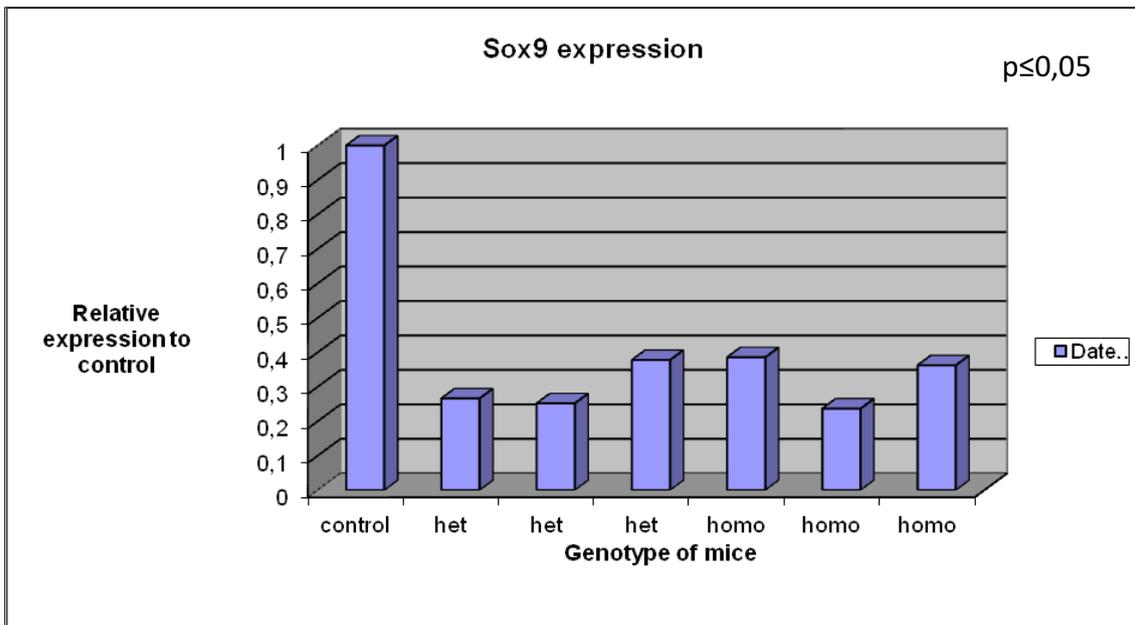


Abbildung 38: Real-time PCR Sox-9

4 Diskussion

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist trotz intensiver Forschungen noch immer eine Tumorerkrankung mit einer extrem schlechten Prognose. Die Gründe hierfür liegen zum einen in der späten Diagnosestellung und der aggressiven Tumorbilologie (Neoptolemos, Stocken et al. 2004). Dem invasiven Karzinom gehen Vorläuferläsionen (PanINs) mit entsprechenden molekulargenetischen Veränderungen voraus. Trotz zahlreicher Studien an Mausmodellen, welche die humane Karzinomentwicklung nahezu identisch rekapitulieren, sind bislang jedoch noch nicht alle Mechanismen, die zur Entstehung dieser Vorläuferläsionen und deren Progression zu invasiven Karzinomen beitragen, vollends verstanden.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines neu generierten Tumormausmodells der Einfluss des Transkriptionsfaktors Snail1 auf die Initiation und Progression von PanINs untersucht. Dazu wurden die PanIN-Läsionen quantifiziert und entsprechende Marker der EMT immunhistochemisch gefärbt. Um diese Ergebnisse zu validieren wurde mittels qRT-PCR die relative Expression von Cdh1, Snail1, Twist1 und Sox9 mRNA bestimmt.

Das mehrstufige Tumorprogressionsmodell wird im Mausmodell rekapituliert

Hingorani et al. zeigten mit ihren Arbeiten, dass transgene Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse das komplette Spektrum von PanIN-Läsionen, welche identisch zu den humanen Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms sind, entwickeln. Weiterhin zeigten die Pankreata dieser Mäuse eine für das Pankreaskarzinom typische ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion. Eine weitere Studie der Arbeitsgruppe zeigte, dass eine zusätzliche p53 Mutation nach dem Durchlaufen der Vorläuferläsionen zur Entwicklung eines invasiven und metastasierenden Pankreaskarzinoms führt. Das mediane Überleben der Mäuse war auf 5 Monate verkürzt und 100% der Versuchstiere starben bis zum Alter von 12 Monaten an einem Pankreaskarzinom (Hingorani, Petricoin et al. 2003,

Hingorani, Wang et al. 2005). Dieses Mausmodell bietet somit eine Möglichkeit die Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen. Die mit dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten wie bei Hingorani et al. beschrieben die mehrstufige Progression der PanIN-Läsionen analog zu den humanen Vorläuferläsionen ohne in ein invasives Karzinom überzugehen. In den Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen fanden sich im Vergleich zu den Kras;Pdx-1-Cre-Mäusen keine Unterschiede in der Histopathologie der PanIN-Läsionen.

Die Initiation und Progression von PanINs ist unter Abwesenheit von Snail verzögert

Bezüglich des hier untersuchten Einfluss von Snail1 auf die Initiation und Progression von PanIN-Läsionen gab es vor der hier vorliegenden Arbeit keine Daten, so dass ein Vergleich mit anderen Studien nicht zu führen ist. Unsere Daten zeigen erstmals *in vivo*, dass unter Abwesenheit von Snail1 die Gesamtzahl an intraepithelialen pankreatischen Vorläuferläsionen sowie deren Progression signifikant niedriger bzw. verlangsamt ist im Vergleich mit Kras;Pdx-1-Cre-Mäusen. Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass der Transkriptionsfaktor Snail1, als regulatorisches EMT-Protein, nicht nur bei invasiven Pankreaskarzinomen, sondern auch in der Entstehung von Vorläuferläsionen eine zentrale Rolle besitzt. Studien hatten bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass Snail1 in Pankreaskarzinomzellen überexprimiert wird und mit einer verminderten E-Cadherin Expression einhergeht. Weiterhin führte ein erhöhte Snail1 Expression zu einem gesteigerten Metastasierungspotenzial (Hotz, Arndt et al. 2007, von Burstin, Eser et al. 2009). Einhergehend mit unseren Beobachtungen konnten Mazur *et al.* *in vivo* nachweisen, dass die Abwesenheit von Notch-2, einem weiteren Induktor der EMT, die PanIn Progression verhindert und das Überleben verlängert. (Mazur, Einwachter et al. 2010). Der Notch-Signalweg spielt ebenso wie Snail1 eine kritische Rolle in der Induktion der EMT. Notch ist zudem über verschiedene Signalkaskaden in der Lage Snail1 und Slug zu modulieren (Wang, Li et al. 2010). Weiterhin konnte in Pan-

kreaskarzinomzellen eine Überexpression von Notch-1, welche zu gesteigerter Invasivität und Zellmigration führte, nachgewiesen werden (Bao, Wang et al. 2011). Zahlreiche Studien haben zudem zeigen können, dass die Expression des Zielgens von Notch, Hes1, in PanIN-Läsionen verstärkt ist (Miyamoto, Maitra et al. 2003, Stanger, Stiles et al. 2005).

Unsere Beobachtungen lassen vermuten, dass die Epitheliale-Mesenchymale Transition bereits in PanIN-Läsionen abläuft und eine entscheidende Rolle in der Progression zum invasiven Karzinom einnimmt. Ähnliches lassen Studienergebnisse von Rhim *et al.* vermuten. Ihre Daten zeigen, dass die EMT bereits ins PanIN-2, PanIN-3 und ADMs nachweisbar sind bevor es zur eigentlichen Tumorformation kommt. Ebenso sind pankreatische Epithelzellen lange vor der Tumorformation im Blutkreislauf und in der Leber nachweisbar (Rhim, Mirek et al. 2012).

In einem nächsten Schritt wäre zu prüfen ob sich unsere Ergebnisse auch auf die Entwicklung von invasiven Karzinomen übertragen lassen und in wie weit Snail1 als therapeutisches Target fungieren könnte. Mit GN-25, einem spezifischen p53-Snail Bindungsinhibitor, steht erstmals ein Molekül zur Verfügung, welches zukünftig zum Einsatz in der Therapie gegen Kras-initiierte Karzinome kommen könnte. Das Tumorsuppressorgen p53 wird durch Kras-induzierte Aktivierung von Snail supprimiert und aus der Zelle eliminiert. GN-25 verhindert diese Snail-p53-Bindung, so dass die p53-Expression in Kras-mutierten Zellen wieder induziert wird. Ein zytotoxischer Effekt auf normale Zellen bzw. Kras-Wildtyp-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Lee, Shen et al. 2010). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass GN-25 die MET induziert und so zu einem verminderten Tumorwachstum und zur Induktion von Apoptose führt. Zudem moduliert GN-25 zahlreiche Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel durch Inhibierung von onkogenen Transkriptionsfaktoren und gesteigerter Expression von Tumorsuppressorgenen, was wiederum zu MET und Apoptose führt (Azmi, Bollig-Fischer et al. 2013). Der Nutzen dieses Snail-Inhibitors muss jedoch noch extensiv in präklinischen und klinischen Studien untersucht werden. Zunächst erscheint es sinnvoll, Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse und Pdx-

1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse mit GN-25 zu behandeln und so den Effekt des Snail-Inhibitors auf die Entstehung von PanIN-Läsionen bzw. invasiven Karzinomen zu evaluieren.

Die verlangsamte Progression der PanIN-Läsionen und ein mögliches verzögertes Auftreten von Pankreaskarzinomen unter Abwesenheit von Snail bieten neben therapeutischen Möglichkeiten auch Optionen im Hinblick auf die Früherkennung von Pankreaskarzinomen und dessen Vorläuferläsionen.

Yachida *et al.* haben in 2010 erstmals zeigen können, dass die Ausbildung von Fernmetastasen erst spät in der Entwicklung von Pankreaskarzinomen auftritt. Zwischen Auftreten der initialen Mutationen und Entstehung des elterlichen, nicht-metastasierenden Klons liegt ein Zeitraum von etwa 10 Jahren. Bis zur Entstehung von Metastasen vergehen nochmal 5 Jahre. Diese Beobachtungen implizieren, dass der Zeitraum der Diagnosestellung in einem kurativen Stadium mehrere Jahre beträgt. Die Herausforderung ist es also einen Tumor in einem noch nicht-metastasierten Stadium zu diagnostizieren (Yachida, Jones et al. 2010).

Bestrebungen einen Tumor bzw. dessen Vorstufen frühzeitig zu erkennen gibt es in Hinblick auf das Pankreaskarzinom insbesondere für das familiäre Pankreaskarzinom. Im Rahmen von jährlichen Screening-Untersuchungen wird mit Hilfe eines multidisziplinären Ansatzes versucht bei Patienten, welche ein erhöhtes Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken tragen, Vorstufen (PanINs, IPMNs) eines Pankreaskarzinoms zu diagnostizieren. Zumeist kommen hier die Endosonographie und MRT-Untersuchungen zum Einsatz. Darüber hinaus werden Biomarker wie zum Beispiel microRNA-196a und -196b herangezogen. Bezüglich des optimalen Zeitpunktes und des Ausmaßes einer operativen Therapie bei auffälligen Befunden besteht bisher kein Konsens (Bartsch, Gress et al. 2012, Fendrich, Langer et al. 2014, Slater, Strauch et al. 2014).

Aufgrund der Epidemiologie des Pankreaskarzinoms scheint ein solch umfangreiches Vorgehen, wie in den Screening-Programmen, in der Normalbevölkerung jedoch nicht sinnvoll. Hier stehen vielmehr nicht-invasive Früherken-

nungsmaßnahmen, wie zum Beispiel das Nutzen von Biomarkern im Vordergrund. Hierzu sind jedoch umfangreiche Untersuchungen notwendig um einen geeigneten und sicheren Biomarker zu detektieren.

Eine inverse Korrelation zwischen Snail1 und E-cadherin Expression zeigte sich nicht

In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich bei den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte Anfärbung von E-Cadherin. Dies geht einher mit den Beobachtungen anderen Studien, die bei verstärkter Snail1 Expression eine verminderte E-Cadherin Expression nachgewiesen haben. Zwischen der Expression von Snail1 und E-Cadherin besteht somit eine inverse Korrelation (Cano, Perez-Moreno et al. 2000, Becker, Rosivatz et al. 2007). Jedoch zeigte sich innerhalb der Gruppen trotz des gleichen Genotyps eine starke Heterogenität in der Anfärbung von E-Cadherin. Diese Beobachtung wurde bereits bei anderen Tumorentitäten wie dem Mamma-, Prostata- und kolorektalem Karzinom gemacht (Umbas, Isaacs et al. 1994, El-Bahrawy, Poulsom et al. 2001, Harigopal, Shin et al. 2005). Mit der qRT-PCR bestätigten sich die Ergebnisse der Immunhistochemie nur teilweise. In 5 von 6 untersuchten Proben zeigte sich wider Erwarten eine signifikant niedrigere E-Cadherin Expression in den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen. Nur eine Probe zeigte eine erhöhte Expression von Cdh1 mRNA. Dies legt die Vermutung nahe, dass einerseits weitere Regulationsmechanismen die E-Cadherin Expression steuern und andererseits Snail1 nicht in allen Zellen ausgeschaltet wurde. Einhergehend damit zeigte die qRT-PCR auch in den homozygoten $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen das Vorhandensein von Snail1 mRNA. Dennoch war die Expression von Snail1 in den $\text{Snail}^{\text{del1}};\text{Pdx-1-Cre};\text{LSL-Kras}^{\text{G12D/+}}$ -Mäusen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Auch in der Immunhistochemie für Snail1 zeigte sich eine deutlich geringere Positivität in den Snail-Knock-Out Mäusen.

Auch wenn bereits in Zelllinien des Pankreaskarzinoms und bei neuroendokrinen Pankreastumoren nachgewiesen werden konnte, dass Snail1 als direkter E-Cadherin Repressor wirkt, (Hotz, Arndt et al. 2007, Fendrich, Maschuw et al. 2012) konnte dieser Zusammenhang mittels qRT-PCR in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. In wie weit unsere auf PanIN-Läsionen bezogenen Daten mit der Expression von E-Cadherin in Pankreastumorzellen vergleichbar sind kann jedoch nicht abschließend bewertet werden. Es lässt sich jedoch vermuten, dass Snail1 in PanIN-Läsionen, welche als gut differenziert angesehen werden müssen, E-Cadherin nur teilweise herunterreguliert. Hotz *et al.* machten mit ihren Daten zur Snail1 Expression in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien ähnliche Beobachtungen. Mit Zunahme des Differenzierungsgrades erfolgte eine Annäherung des Expressionsgrades von Snail1 und E-Cadherin (Hotz, Arndt et al. 2007).

Knock-Out von Snail1 führt zu einer verminderten Twist1 Expression

Twist1 ist wie Snail1 ein Schlüsselprotein der EMT, welches zur Repression von E-Cadherin führt. Der Wirkmechanismus von Twist1 ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Rosivatz, Becker et al. 2002). Twist1 ist zudem ein wichtiger Induktor von N-Cadherin, einem mesenchymalen Markerprotein der EMT, und konnte in zahlreichen Tumorentitäten, wie dem Pankreas-, Mamma-, und Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Yang, Mani et al. 2004, Kwok, Ling et al. 2005, Ohuchida, Mizumoto et al. 2007). Unsere Daten zeigten eine signifikant erniedrigte Twist1 mRNA Expression in den homozygoten und heterozygoten Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen. Dave *et al.* konnten in Zellkulturversuchen bereits zeigen, dass die Expression von Snail1 und Twist1 in Abhängigkeit voneinander steht. Zum einen führt die Abwesenheit von Twist1 zu einer langsameren Snail1 Hochregulation durch TGF- β und zum anderen ist Snail1 für eine vermehrte Twist1 Expression notwendig (Dave, Guaita-Esteruelas et al. 2011).

Knock-Out von Snail führt zu einer verminderten Sox9 Expression

Die PanIN-Entwicklung geht mit der Formation von ADMs (Azinoduktale Metaplasie) einher. Diese ist durch das Ersetzen von Azinuszellen mit Zellen, die duktale Merkmale aufweisen, charakterisiert. Exprimiert werden dann duktale Marker wie CK 19 (s. Abb. 29-31) und SOX-9 (Zhu, Shi et al. 2007). Studien haben gezeigt, dass das Onkogen Kras Azinuszellen in duktale Zellen und PanINs umwandeln kann. Kopp *et al.* wiederum konnten zeigen, dass ADMs und frühe PanIN-Läsionen SOX-9 exprimieren, aus dukталen SOX-9-positiven Zellen jedoch nicht mehrheitlich PanIN-Läsionen entstehen. Vielmehr lassen die Studienergebnisse vermuten, dass SOX-9 exprimiert wird bevor Kras-positive Azinuszellen in duktale Zellen und PanINs umgewandelt werden. Die Kras-abhängige Entstehung von PanINs scheint durch die Expression von SOX-9 sogar beschleunigt zu werden. (Kopp, von Figura et al. 2012, Prevot, Simion et al. 2012). Tanaka *et al.* konnten in einer Studie nachweisen, dass Sox-9 in normalem Pankreasgewebe in 82,7% der Zellen des Gangepithels exprimiert wird. In Pankreaskarzinomzellen fand sich zu lediglich 0,8% eine Positivität. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass in IPMNs die Rate an Sox-9 positiven Zellen mit Zunahme der Tumorprogression sank (Tanaka, Kuroki et al. 2013). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten sowohl in der Immunhistochemie als auch in der qRT-PCR eine verminderte Expression von Sox-9 in den Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen. Studien, die sich mit dem Einfluss von Snail1 auf Sox-9 befassen, liegen bisher nicht vor. Nachgewiesen werden konnte jedoch eine Koexpression von Slug (Snail2) und Sox-9, welche die Tumorigenese und das Metastasierungspotenzial von humanen Mammakarzinomzelllinien fördert (Guo, Keckesova et al. 2012). Anhand der bisher vorliegenden Daten und unseren Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass Sox-9 an der frühen Entwicklung von PanIN-Läsionen beteiligt ist. Um dies zu verifizieren und die klinische Relevanz festzustellen sind jedoch weitere Studien von großer Notwendigkeit.

Knock-Out von Snail führt zu einer verminderten MMP-7 Expression

Miyoshi *et al.* konnten für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) eine positive Korrelation zwischen der Snail-Expression und der MMP-7-Expression nachweisen. Eine verstärkte MMP-2, MMP-7 und MT1-MMP Expression führte zu einer verstärkten Entdifferenzierung, portalen Tumorinvasion und intrahepatischen Metastasen beim HCC. (Miyoshi, Kitajima *et al.* 2004, Miyoshi, Kitajima *et al.* 2005). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass MMP 7 auch in kolorektalen Adenomen mit schweren Dysplasien exprimiert wird, so dass sich vermuten lässt das MMP 7 eine wichtige Rolle im Wachstum und der Konversion von kolorektalen Adenomen zur Malignomen spielt (Qasim, Ali *et al.* 2013). In humanen Pankreaskarzinomen und intraepithelialen pankreatischen Neoplasien konnte ebenfalls eine vermehrte Expression von MMP-7 festgestellt werden, welche mit dem Voranschreiten der Progression akkumuliert (Crawford, Scoggins *et al.* 2002). Weiterhin wird MMP 7 für die Transdifferenzierung der Azinuszellen zu dukталen Zellen benötigt (Sawey, Johnson *et al.* 2007). Unsere Beobachtungen zeigten ebenfalls eine deutlich stärkere Expression von MMP-7 mit Zunahme der PanIN-Progression. Darüber hinaus konnte die Korrelation zwischen Snail1 und MMP-7 bestätigt werden. Sowohl homozygote als auch heterozygote Snail^{del1};Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse zeigten ein deutlich geringere MMP-7 Expression in den immunhistochemischen Färbungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der vorliegenden Arbeit der *in vivo* Nachweis erbracht werden konnte, dass unter Abwesenheit von Snail1 die Initiation und Progression von PanIN-Läsionen verzögert ist. Weiterhin ist Snail1 als Schlüsselprotein der EMT an der Regulation zahlreicher weiterer Proteine, wie Sox-9, Twist1 und MMP-7 beteiligt.

Als limitierender Faktor dieser Arbeit ist zum einen das Tumormausmodell zu nennen. Mausmodelle haben sich in der Vergangenheit als äußerst nützlich erwiesen um ein besseres Verständnis molekularer Krankheitsmechanismen zu erlangen und sind auch aktuell die besten Modellorganismen. Die molekularen

und zellulären Veränderungen in der humanen Tumorprogression können jedoch nur limitiert rekapituliert werden.

Des Weiteren handelt es sich bei den in der Arbeit erhobenen Daten um rein deskriptive Daten. Weitere Untersuchungen sind notwendig um auch auf funktioneller Ebene ein Verständnis für den Einfluss von Snail1 auf die PanIN-Entwicklung zu erhalten.

4.1 Ausblick

Vorherige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der EMT und einer schlechten Prognose für diverse humane Karzinome. Die EMT scheint der entscheidende Mechanismus für die Metastasierung von Tumoren darzustellen. Da die Metastasierung bei den meisten Tumoren ursächlich für das Versterben der Patienten ist, könnte eine Verhinderung derselbigen zu einer deutlichen Verlängerung des Langzeitüberlebens führen. Weiterhin ist insbesondere für das Pankreaskarzinom von enormer Relevanz die Früherkennung zu verbessern. Die Identifizierung von nicht-invasiven Vorstufen des Pankreaskarzinoms ist von elementarer Bedeutung, da Patienten in Frühstadien der Erkrankung behandelt und kurativen Therapieansätzen zugeführt werden könnten. Dies würde die Überlebensrate drastisch verbessern. Da kein bildgebendes Verfahren in der Lage ist, PanINs bzw. deren Progression zum invasiven Pankreaskarzinom nachzuweisen, gibt es zur Zeit noch keine Möglichkeit präventiv in das Tumorstadium einzugreifen.

Die EMT als therapeutisches Ziel scheint daher in der Behandlung des Pankreaskarzinoms sehr vielversprechend zu sein.

Der Einfluss von Snail1 und weiteren EMT-regulatorischen Proteinen in der frühen Karzinom- bzw. PanIN-Entstehung bietet somit zahlreiche Ansätze für weiterführende Studien. Insbesondere die klinische Relevanz von Snail1 entweder als Biomarker in der Früherkennung oder als therapeutisches Target muss anhand weiterer Studien untersucht werden.

5 Literaturverzeichnis

Aguirre, A. J., N. Bardeesy, M. Sinha, L. Lopez, D. A. Tuveson, J. Horner, M. S. Redston and R. A. DePinho (2003). "Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **17**(24): 3112-3126.

Alberga, A., J. L. Boulay, E. Kempe, C. Dennefeld and M. Haenlin (1991). "The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers." Development **111**(4): 983-992.

Arumugam, T., V. Ramachandran, K. F. Fournier, H. Wang, L. Marquis, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, C. D. Logsdon, D. J. McConkey and W. Choi (2009). "Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer." Cancer Res **69**(14): 5820-5828.

Azmi, A. S., A. Bollig-Fischer, B. Bao, B. J. Park, S. H. Lee, G. Yong-Song, G. Dyson, C. K. Reddy, F. H. Sarkar and R. M. Mohammad (2013). "Systems analysis reveals a transcriptional reversal of the mesenchymal phenotype induced by SNAIL-inhibitor GN-25." BMC Syst Biol **7**: 85.

Bao, B., Z. Wang, S. Ali, D. Kong, Y. Li, A. Ahmad, S. Banerjee, A. S. Azmi, L. Miele and F. H. Sarkar (2011). "Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells." Cancer Lett **307**(1): 26-36.

Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.

Bartsch, D. K., T. M. Gress and P. Langer (2012). "Familial pancreatic cancer--current knowledge." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **9**(8): 445-453.

Bartsch, D. K., R. Kress, M. Sina-Frey, R. Grutzmann, B. Gerdes, C. Pilarsky, J. W. Heise, K. M. Schulte, M. Colombo-Benkmann, C. Schleicher, H. Witzigmann, O. Pridohl, M. B. Ghadimi, O. Horstmann, W. von Bernstorff, L. Jochimsen, J. Schmidt, S. Eisold, L. Estevez-Schwarz, S. A. Hahn, K. Schulmann, W. Bock, T. M. Gress, N.

Zugel, K. Breitschaft, K. Prenzel, H. Messmann, E. Endlicher, M. Schneider, A. Ziegler, W. Schmiegel, H. Schafer, M. Rothmund and H. Rieder (2004). "Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany." Int J Cancer **110**(6): 902-906.

Becker, K. F., E. Rosivatz, K. Blechschmidt, E. Kremmer, M. Sarbia and H. Hofler (2007). "Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers." Cells Tissues Organs **185**(1-3): 204-212.

Boulay, J. L., C. Dennefeld and A. Alberga (1987). "The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers." Nature **330**(6146): 395-398.

Brabletz, T., A. Jung, S. Reu, M. Porzner, F. Hlubek, L. A. Kunz-Schughart, R. Knuechel and T. Kirchner (2001). "Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10356-10361.

Bueno de Mesquita, H. B., P. Maisonneuve, C. J. Moerman, S. Runia and P. Boyle (1991). "Life-time history of smoking and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands." Int J Cancer **49**(6): 816-822.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo and M. A. Nieto (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.

Carver, E. A., R. Jiang, Y. Lan, K. F. Oram and T. Gridley (2001). "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition." Mol Cell Biol **21**(23): 8184-8188.

Cates, J. M., R. H. Byrd, L. E. Fohn, A. D. Tatsas, M. K. Washington and C. C. Black (2009). "Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma." Pancreas **38**(1): e1-6.

Chang, C. J., C. H. Chao, W. Xia, J. Y. Yang, Y. Xiong, C. W. Li, W. H. Yu, S. K. Rehman, J. L. Hsu, H. H. Lee, M. Liu, C. T. Chen, D. Yu and M. C. Hung (2011). "p53

regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs." Nat Cell Biol **13**(3): 317-323.

Christofori, G. (2006). "New signals from the invasive front." Nature **441**(7092): 444-450.

Crawford, H. C., C. R. Scoggins, M. K. Washington, L. M. Matrisian and S. D. Leach (2002). "Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas." J Clin Invest **109**(11): 1437-1444.

Dave, N., S. Guaita-Esteruelas, S. Gutarra, A. Frias, M. Beltran, S. Peiro and A. G. de Herreros (2011). "Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition." J Biol Chem **286**(14): 12024-12032.

De Wever, O., W. Westbroek, A. Verloes, N. Bloemen, M. Bracke, C. Gespach, E. Bruyneel and M. Mareel (2004). "Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding." J Cell Sci **117**(Pt 20): 4691-4703.

Dominguez, D., B. Montserrat-Sentis, A. Virgos-Soler, S. Guaita, J. Grueso, M. Porta, I. Puig, J. Baulida, C. Franci and A. Garcia de Herreros (2003). "Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor." Mol Cell Biol **23**(14): 5078-5089.

Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.

El-Bahrawy, M. A., R. Poulson, R. Jeffery, I. Talbot and M. R. Alison (2001). "The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma." Hum Pathol **32**(11): 1216-1224.

Ellenrieder, V., S. F. Hendler, W. Boeck, T. Seufferlein, A. Menke, C. Ruhland, G. Adler and T. M. Gress (2001). "Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation." Cancer Res **61**(10): 4222-4228.

Elloul, S., M. B. Elstrand, J. M. Nesland, C. G. Trope, G. Kvalheim, I. Goldberg, R. Reich and B. Davidson (2005). "Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma." Cancer **103**(8): 1631-1643.

Escriva, M., S. Peiro, N. Herranz, P. Villagrasa, N. Dave, B. Montserrat-Sentis, S. A. Murray, C. Franci, T. Gridley, I. Virtanen and A. Garcia de Herreros (2008). "Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis." Mol Cell Biol **28**(5): 1528-1540.

Feldmann, G., C. Karikari, M. dal Molin, S. Durringer, P. Volkmann, D. K. Bartsch, S. Bisht, J. B. Koorstra, P. Brossart, A. Maitra and V. Fendrich (2011). "Inactivation of Brca2 cooperates with Trp53(R172H) to induce invasive pancreatic ductal adenocarcinomas in mice: a mouse model of familial pancreatic cancer." Cancer Biol Ther **11**(11): 959-968.

Fendrich, V., P. Langer and D. K. Bartsch (2014). "Familial pancreatic cancer--status quo." Int J Colorectal Dis **29**(2): 139-145.

Fendrich, V., K. Maschuw, J. Waldmann, M. Buchholz, J. Rehm, T. M. Gress, D. K. Bartsch and A. König (2012). "Epithelial-mesenchymal transition is a critical step in tumorigenesis of pancreatic neuroendocrine tumors." Cancers (Basel) **4**(1): 281-294.

Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.

Gu, G., J. Dubauskaite and D. A. Melton (2002). "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." Development **129**(10): 2447-2457.

Guo, W., Z. Keckesova, J. L. Donaher, T. Shibue, V. Tischler, F. Reinhardt, S. Itzkovitz, A. Noske, U. Zurrer-Hardi, G. Bell, W. L. Tam, S. A. Mani, A. van Oudenaarden and R. A. Weinberg (2012). "Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state." Cell **148**(5): 1015-1028.

Harigopal, M., S. J. Shin, M. P. Murray, S. K. Tickoo, E. Brogi and P. P. Rosen (2005). "Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma." World J Surg Oncol **3**: 73.

Herreros-Villanueva, M., E. Hijona, A. Cosme and L. Bujanda (2012). "Mouse models of pancreatic cancer." World J Gastroenterol **18**(12): 1286-1294.

Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." Cancer Cell **4**(6): 437-450.

Hingorani, S. R., L. Wang, A. S. Multani, C. Combs, T. B. Deramaudt, R. H. Hruban, A. K. Rustgi, S. Chang and D. A. Tuveson (2005). "Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice." Cancer Cell **7**(5): 469-483.

Hotz, B., M. Arndt, S. Dullat, S. Bhargava, H. J. Buhr and H. G. Hotz (2007). "Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **13**(16): 4769-4776.

Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, M. R. Anver, A. V. Biankin, G. P. Boivin, E. E. Furth, T. Furukawa, A. Klein, D. S. Klimstra, G. Kloppel, G. Y. Lauwers, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, L. Perez-Gallego, M. Redston and D. A. Tuveson (2006). "Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations." Cancer Res **66**(1): 95-106.

Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." Am J Surg Pathol **25**(5): 579-586.

Hruban, R. H., R. E. Wilentz and S. E. Kern (2000). "Genetic progression in the pancreatic ducts." Am J Pathol **156**(6): 1821-1825.

Huber, M. A., N. Kraut and H. Beug (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 548-558.

Hugh, T. J., S. A. Dillon, G. O'Dowd, B. Getty, M. Pignatelli, G. J. Poston and A. R. Kinsella (1999). "beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma." Int J Cancer **82**(4): 504-511.

Hwang, R. F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K. D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D. B. Evans and C. D. Logsdon (2008). "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression." Cancer Res **68**(3): 918-926.

Javle, M. M., J. F. Gibbs, K. K. Iwata, Y. Pak, P. Rutledge, J. Yu, J. D. Black, D. Tan and T. Khoury (2007). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer." Ann Surg Oncol **14**(12): 3527-3533.

Joo, Y. E., J. S. Rew, C. S. Park and S. J. Kim (2002). "Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma." Pancreatology **2**(2): 129-137.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Klein, A. P., K. A. Brune, G. M. Petersen, M. Goggins, A. C. Tersmette, G. J. Offerhaus, C. Griffin, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. Kern and R. H. Hruban (2004). "Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds." Cancer Res **64**(7): 2634-2638.

Kopp, J. L., G. von Figura, E. Mayes, F. F. Liu, C. L. Dubois, J. P. t. Morris, F. C. Pan, H. Akiyama, C. V. Wright, K. Jensen, M. Hebrok and M. Sander (2012). "Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Cell **22**(6): 737-750.

Kwok, W. K., M. T. Ling, T. W. Lee, T. C. Lau, C. Zhou, X. Zhang, C. W. Chua, K. W. Chan, F. L. Chan, C. Glackin, Y. C. Wong and X. Wang (2005). "Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target." Cancer Res **65**(12): 5153-5162.

Lee, S. H., G. N. Shen, Y. S. Jung, S. J. Lee, J. Y. Chung, H. S. Kim, Y. Xu, Y. Choi, J. W. Lee, N. C. Ha, G. Y. Song and B. J. Park (2010). "Antitumor effect of novel small chemical inhibitors of Snail-p53 binding in K-Ras-mutated cancer cells." Oncogene **29**(32): 4576-4587.

Li, Y., T. G. VandenBoom, 2nd, D. Kong, Z. Wang, S. Ali, P. A. Philip and F. H. Sarkar (2009). "Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells." Cancer Res **69**(16): 6704-6712.

Masugi, Y., K. Yamazaki, T. Hibi, K. Aiura, Y. Kitagawa and M. Sakamoto (2010). "Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer." Hum Pathol **41**(8): 1061-1068.

Mazur, P. K., H. Einwachter, M. Lee, B. Sipos, H. Nakhai, R. Rad, U. Zimmer-Strobl, L. J. Strobl, F. Radtke, G. Kloppel, R. M. Schmid and J. T. Siveke (2010). "Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(30): 13438-13443.

McKay, C. J., P. Glen and D. C. McMillan (2008). "Chronic inflammation and pancreatic cancer." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(1): 65-73.

Miyamoto, H., T. Murakami, K. Tsuchida, H. Sugino, H. Miyake and S. Tashiro (2004). "Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins." Pancreas **28**(1): 38-44.

Miyamoto, Y., A. Maitra, B. Ghosh, U. Zechner, P. Argani, C. A. Iacobuzio-Donahue, V. Sriuranpong, T. Iso, I. M. Meszoely, M. S. Wolfe, R. H. Hruban, D. W. Ball, R. M. Schmid and S. D. Leach (2003). "Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis." Cancer Cell **3**(6): 565-576.

Miyoshi, A., Y. Kitajima, S. Kido, T. Shimonishi, S. Matsuyama, K. Kitahara and K. Miyazaki (2005). "Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma." Br J Cancer **92**(2): 252-258.

Miyoshi, A., Y. Kitajima, K. Sumi, K. Sato, A. Hagiwara, Y. Koga and K. Miyazaki (2004). "Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells." Br J Cancer **90**(6): 1265-1273.

Moody, S. E., D. Perez, T. C. Pan, C. J. Sarkisian, C. P. Portocarrero, C. J. Sterner, K. L. Notorfrancesco, R. D. Cardiff and L. A. Chodosh (2005). "The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence." Cancer Cell **8**(3): 197-209.

Moreno-Bueno, G., F. Portillo and A. Cano (2008). "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer." Oncogene **27**(55): 6958-6969.

Moustakas, A. and C. H. Heldin (2007). "Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression." Cancer Sci **98**(10): 1512-1520.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Murray, S. A., E. A. Carver and T. Gridley (2006). "Generation of a Snail1 (Snai1) conditional null allele." Genesis **44**(1): 7-11.

Nabeshima, K., T. Inoue, Y. Shimao and T. Sameshima (2002). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration." Pathol Int **52**(4): 255-264.

Natalwala, A., R. Spychal and C. Tselepis (2008). "Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract." World J Gastroenterol **14**(24): 3792-3797.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, J. A. Dunn, J. Almond, H. G. Beger, P. Pederzoli, C. Bassi, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, F. Lacaine, J. Buckels, M. Deakin, F. A. Adab, R. Sutton, C. Imrie, I. Ihse, T. Tihanyi, A. Olah, S. Pedrazzoli, D. Spooner, D. J. Kerr, H. Friess, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2001). "Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial." Ann Surg **234**(6): 758-768.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." N Engl J Med **350**(12): 1200-1210.

Oettle, H., P. Neuhaus, A. Hochhaus, J. T. Hartmann, K. Gellert, K. Ridwelski, M. Niedergethmann, C. Zulke, J. Fahlke, M. B. Arning, M. Sinn, A. Hinke and H. Riess (2013). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial." JAMA **310**(14): 1473-1481.

Ohuchida, K., K. Mizumoto, S. Ohhashi, H. Yamaguchi, H. Konomi, E. Nagai, K. Yamaguchi, M. Tsuneyoshi and M. Tanaka (2007). "Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice." Int J Cancer **120**(8): 1634-1640.

Pecina-Slaus, N. (2003). "Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells." Cancer Cell Int **3**(1): 17.

Peinado, H., E. Ballestar, M. Esteller and A. Cano (2004). "Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex." Mol Cell Biol **24**(1): 306-319.

Perl, A. K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb and G. Christofori (1998). "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma." Nature **392**(6672): 190-193.

Polyak, K. and R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." Nat Rev Cancer **9**(4): 265-273.

Prevot, P. P., A. Simion, A. Grimont, M. Colletti, A. Khalailah, G. Van den Steen, C. Sempoux, X. Xu, V. Roelants, J. Hald, L. Bertrand, H. Heimberg, S. F. Konieczny, Y. Dor, F. P. Lemaigre and P. Jacquemin (2012). "Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia." Gut **61**(12): 1723-1732.

Qasim, B. J., H. H. Ali and A. G. Hussein (2013). "Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-7 in human colorectal adenomas using specified automated cellular image analysis system: a clinicopathological study." Saudi J Gastroenterol **19**(1): 23-27.

Quint, K., M. Tonigold, P. Di Fazio, R. Montalbano, S. Lingelbach, F. Ruckert, B. Alinger, M. Ocker and D. Neureiter (2012). "Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition." Int J Oncol **41**(6): 2093-2102.

Raut, C. P., J. F. Tseng, C. C. Sun, H. Wang, R. A. Wolff, C. H. Crane, R. Hwang, J. N. Vauthey, E. K. Abdalla, J. E. Lee, P. W. Pisters and D. B. Evans (2007). "Impact of resection status on pattern of failure and survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma." Ann Surg **246**(1): 52-60.

Rhim, A. D., E. T. Mirek, N. M. Aiello, A. Maitra, J. M. Bailey, F. McAllister, M. Reichert, G. L. Beatty, A. K. Rustgi, R. H. Vonderheide, S. D. Leach and B. Z. Stanger (2012). "EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation." Cell **148**(1-2): 349-361.

Rosivatz, E., I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Lubber, R. Busch, H. Hofler and K. F. Becker (2002). "Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer." Am J Pathol **161**(5): 1881-1891.

Rosivatz, E., K. F. Becker, E. Kremmer, C. Schott, K. Blechschmidt, H. Hofler and M. Sarbia (2006). "Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract." Virchows Arch **448**(3): 277-287.

Roy, H. K., P. Iversen, J. Hart, Y. Liu, J. L. Koetsier, Y. Kim, D. P. Kunte, M. Madugula, V. Backman and R. K. Wali (2004). "Down-regulation of SNAIL suppresses MIN mouse tumorigenesis: modulation of apoptosis, proliferation, and fractal dimension." Mol Cancer Ther **3**(9): 1159-1165.

Roy, L. D., M. Sahraei, D. B. Subramani, D. Besmer, S. Nath, T. L. Tinder, E. Bajaj, K. Shanmugam, Y. Y. Lee, S. I. Hwang, S. J. Gendler and P. Mukherjee (2011). "MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition." Oncogene **30**(12): 1449-1459.

Sawey, E. T., J. A. Johnson and H. C. Crawford (2007). "Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19327-19332.

Schneider, G., C. Lersch and R. M. Schmid (2003). "[Pancreatic carcinogenesis. Clinical implications]." Chirurg **74**(3): 165-170.

Schock, F. and N. Perrimon (2002). "Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 463-493.

Seymour, A. B., R. H. Hruban, M. Redston, C. Caldas, S. M. Powell, K. W. Kinzler, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994). "Allelotype of pancreatic adenocarcinoma." Cancer Res **54**(10): 2761-2764.

Slater, E. P., K. Strauch, S. Rospleszcz, A. Ramaswamy, I. Esposito, G. Kloppel, E. Matthai, K. Heeger, V. Fendrich, P. Langer and D. K. Bartsch (2014). "MicroRNA-196a and -196b as Potential Biomarkers for the Early Detection of Familial Pancreatic Cancer." Transl Oncol **7**(4): 464-471.

Smalley, M. J. and T. C. Dale (2001). "Wnt signaling and mammary tumorigenesis." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(1): 37-52.

Sohn, T. A., C. J. Yeo, J. L. Cameron, L. Koniaris, S. Kaushal, R. A. Abrams, P. K. Sauter, J. Coleman, R. H. Hruban and K. D. Lillemoe (2000). "Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators." J Gastrointest Surg **4**(6): 567-579.

Stanger, B. Z., B. Stiles, G. Y. Lauwers, N. Bardeesy, M. Mendoza, Y. Wang, A. Greenwood, K. H. Cheng, M. McLaughlin, D. Brown, R. A. Depinho, H. Wu, D. A. Melton and Y. Dor (2005). "Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas." Cancer Cell **8**(3): 185-195.

Stoker, M. and M. Perryman (1985). "An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts." J Cell Sci **77**: 209-223.

Tanaka, T., T. Kuroki, T. Adachi, S. Ono, M. Hirabaru, A. Soyama, A. Kitasato, M. Takatsuki, T. Hayashi and S. Eguchi (2013). "Evaluation of SOX9 expression in

pancreatic ductal adenocarcinoma and intraductal papillary mucinous neoplasm." Pancreas **42**(3): 488-493.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.

Umbas, R., W. B. Isaacs, P. P. Bringuier, H. E. Schaafsma, H. F. Karthaus, G. O. Oosterhof, F. M. Debruyne and J. A. Schalken (1994). "Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer." Cancer Res **54**(14): 3929-3933.

Vega, S., A. V. Morales, O. H. Ocana, F. Valdes, I. Fabregat and M. A. Nieto (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." Genes Dev **18**(10): 1131-1143.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-532.

von Burstin, J., S. Eser, M. C. Paul, B. Seidler, M. Brandl, M. Messer, A. von Werder, A. Schmidt, J. Mages, P. Pagel, A. Schnieke, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur (2009). "E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex." Gastroenterology **137**(1): 361-371, 371 e361-365.

Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." Br J Surg **91**(5): 586-594.

Wang, H., L. He, F. Ma, M. M. Regan, S. P. Balk, A. L. Richardson and X. Yuan (2013). "SOX9 regulates low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) and T-cell factor 4 (TCF4) expression and Wnt/beta-catenin activation in breast cancer." J Biol Chem **288**(9): 6478-6487.

Wang, Z., Y. Li, D. Kong and F. H. Sarkar (2010). "The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness." Curr Drug Targets **11**(6): 745-751.

Wilentz, R. E., C. A. Iacobuzio-Donahue, P. Argani, D. M. McCarthy, J. L. Parsons, C. J. Yeo, S. E. Kern and R. H. Hruban (2000). "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." Cancer Res **60**(7): 2002-2006.

Wu, Y. and B. P. Zhou (2010). "Snail: More than EMT." Cell Adh Migr **4**(2): 199-203.

Yachida, S., S. Jones, I. Bozic, T. Antal, R. Leary, B. Fu, M. Kamiyama, R. H. Hruban, J. R. Eshleman, M. A. Nowak, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and C. A. Iacobuzio-Donahue (2010). "Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer." Nature **467**(7319): 1114-1117.

Yang, J., S. A. Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson and R. A. Weinberg (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." Cell **117**(7): 927-939.

Yang, Z., S. Rayala, D. Nguyen, R. K. Vadlamudi, S. Chen and R. Kumar (2005). "Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions." Cancer Res **65**(8): 3179-3184.

Yin, T., C. Wang, T. Liu, G. Zhao, Y. Zha and M. Yang (2007). "Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance." J Surg Res **141**(2): 196-203.

Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." J Clin Invest **119**(6): 1429-1437.

Zeng, G., M. Germinaro, A. Micsenyi, N. K. Monga, A. Bell, A. Sood, V. Malhotra, N. Sood, V. Midda, D. K. Monga, D. M. Kokkinakis and S. P. Monga (2006). "Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma." Neoplasia **8**(4): 279-289.

Zhang, K., D. Chen, X. Jiao, S. Zhang, X. Liu, J. Cao, L. Wu and D. Wang (2011). "Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling." Lab Invest **91**(3): 426-438.

Zhang, K., X. Jiao, X. Liu, B. Zhang, J. Wang, Q. Wang, Y. Tao and D. Zhang (2010). "Knockdown of snail sensitizes pancreatic cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation." Int J Mol Sci **11**(12): 4891-4892.

Zhang, Y., X. Guo, L. Xiong, X. Kong, Y. Xu, C. Liu, L. Zou, Z. Li, J. Zhao and N. Lin (2012). "MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma." FEBS Lett **586**(24): 4362-4370.

Zhu, L., G. Shi, C. M. Schmidt, R. H. Hruban and S. F. Konieczny (2007). "Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia." Am J Pathol **171**(1): 263-273.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuvorderst Herrn Prof. Dr. med. Volker Fendrich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Ich danke für die stets gute Zusammenarbeit und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Mein wissenschaftliches Interesse und beruflicher Werdegang hat er nachhaltig geprägt und stets gefördert.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Detlef K. Bartsch ganz herzlich für die Ermöglichung der Promotion in seinem Labor und seiner Abteilung danken.

Ebenfalls danke ich den an der Entstehung dieser Arbeit beteiligten Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Jens Waldmann aus der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie und Herrn Dr. Matthias Lauth aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der AG Fendrich für das produktive und harmonische Miteinander.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie für die gute Zusammenarbeit bedanken: Frau Aninja Baier, Frau Brunhilde Chaloupka, Frau Carmen Bollmann, Frau Elvira Matthäi, Frau Silvia Roth, Frau Dr. Emily Slater und Frau Dr. Annette Wunderlich.

Ein großer Dank gilt meinem Freund und meinen Freunden, die mir tatkräftig zu Seite gestanden haben und mich stets motiviert haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an meine Eltern aussprechen. Ihre ständige Unterstützung hat mich stets angespornt und gefördert meine Ziele zu verfolgen.

7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg.

Adamkiewicz, Alter, Bahr, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhardt, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Greger, Gress, Grimm, Groß, Hertl, Hegele, Hofmann, Höffken, Hoyer, Hundt, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Kim-Berger, Klose, Klaus, Köhler, König, Koolmann, Kühnert, Langer, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Meier, Maisch, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Rausch, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schofer, Seitz, Sekundo, Schmidt, Schneider, Schrader, Sesterhenn, Skwara, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiller, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Waldmann, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin, Zovko.

