

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

---

**Die Inhibition des Transkriptionsfaktors Snail durch PEG und  
GN25 in Zelllinien des humanen duktales Adenokarzinoms des  
Pankreas (SUIT-2/007 und SUIT-2/028)**

---

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Janina Olivia Dengler aus Mannheim

Marburg, 2018

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 20.03.2018**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.**

**Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer**

**Referent: Prof. Dr. med. Volker Fendrich**

**1. Korreferent: Prof. Dr. T. Stiewe**

**2. Korreferent: Prof. Dr. T. Gress**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abstract</b> .....	<b>6</b>
1.1 The Inhibition of Snail by PEG and GN25 in human pancreas carcinoma cell lines (SUIT-2/007 and SUIT-2/028) .....	6
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
2.1 Das Pankreaskarzinom.....	8
2.1.1 Übersicht .....	8
2.1.2 Epidemiologie.....	9
2.1.2.1 Äußere Einflussfaktoren.....	10
2.1.2.2 Genetische Faktoren.....	13
Keimbahnmutationen.....	13
Sporadische Mutationen.....	15
2.1.3 Vorläuferläsionen .....	16
2.1.3.1 Die vier wichtigsten Mutation im PDAC.....	18
Kras .....	18
p16/INK4a.....	19
p53 .....	20
Smad4 .....	21
2.1.4 Inflammation und Mikroenvironment im Pankreaskarzinom.....	22
2.2 Die EMT und ihre invasiven Fähigkeiten .....	26
EMT in der Embryogenese .....	27
EMT in der Wundheilung.....	27
EMT in der Karzinogenese.....	27
2.2.1 Die EMT im Pankreaskarzinom .....	28
.....	29
Kras .....	29
Der Cadherin-Switch .....	30
TGF- $\beta$ .....	31
NF- $\kappa$ B und die Inflammation .....	32
Cancer stem cells .....	33
miRNA.....	34
Die Chemo-Resistenz .....	34
2.3 Der Transkriptionsfaktor Snail.....	35
2.4 Die Inhibitoren .....	44
2.4.1 GN25.....	44

2.4.2 PEG.....	44
<b>3 Zielsetzung.....</b>	<b>46</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>47</b>
4.1 Auflistung Material und Methoden.....	47
4.1.1 Geräte .....	47
4.1.2 Glas- und Plastikware.....	47
4.1.3 Chemikalien und Medien.....	48
4.1.4 Rezepturen selbst hergestellter Lösunge.....	48
MTT-Lösung:.....	48
Stop-Lösung / 100 ml:.....	48
4.2 Zelllinien .....	49
4.2.1 Zellen lagern und auftauen .....	49
4.2.2 Zellinkubation und Zellwachstum .....	49
4.2.3 Mykoplasmen-PCR.....	50
4.2.4 Zellbeurteilung.....	50
4.2.5 Passagieren der Zellen .....	51
4.3 Der MTT-Assay.....	52
4.4 Proliferation .....	53
4.4.1 Ermittlung der benötigten Zellzahlen .....	53
4.4.2 Ansetzen der Proliferation .....	53
4.4.3 Auswertung und MTT-Assay .....	55
4.5 Statistische Auswertung.....	56
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
5.1 GN25 inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	57
5.1.1 GN25 in SUI2-007 .....	58
5.1.2 GN25 in SUI2-028 .....	59
5.2 GN25 inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Dosis .....	59
5.2.1 GN25 in SUI2-2/007 .....	60
5.2.2 GN25 in SUI2-2/028 .....	62
5.3 PEG inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	65
5.3.1 PEG in SUI2-007 .....	65

5.3.2 PEG in SUIT2-028 .....	66
5.4 PEG inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Dosis .....	66
5.4.1 PEG in SUIT2-007 .....	67
5.4.2 PEG in SUIT2-028 .....	69
5.5 GN25 besitzt im Vergleich zu PEG ein höheres Potential zur Inhibition von Pankreaskarzinomzellen .....	72
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>7 Abkürzungen .....</b>	<b>79</b>
<b>8 Referenzen .....</b>	<b>80</b>
<b>9 Anhang .....</b>	<b>100</b>
9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	100
9.2 Danksagung .....	102

# 1 Abstract

## 1.1 The Inhibition of Snail by PEG and GN25 in human pancreas carcinoma cell lines (SUIT-2/007 and SUIT-2/028)

### Background

The major reasons for the fatal prognosis of the ductal pancreatic adenocarcinoma are its chemoresistance and its early metastasis. Thereby the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) plays an important role, which is characterized by the loss of cell-cell-junctions, cell polarity and the expression of E-Cadherin. A crucial mediator of EMT is the transcription factor Snail, which represses the expression of E-Cadherin by multiple pathways. Unfortunately, therapeutic strategies for inhibition of Snail are barely available. In this study we examined the *in vitro* inhibition of Snail by PEG and GN25 in the human pancreatic cancer cell lines SUIT-2/007 and SUIT-2/028.

### Materials and methods

For our research we employed subcell lines of SUIT-2, SUIT-2/007 (cell line with high metastatic potential) and SUIT-2/028 (cell line with poor metastatic potential) which were cultured at RPMI/10% FBS. After assessing the required number of cells, the cell lines were incubated with the inhibitors PEG and GN25 over 24h, 72h and 144h with ascending concentrations (PEG: 5% and 10%; GN25: 0,5 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 6 $\mu$ M, 8 $\mu$ M, 10 $\mu$ M). After the appropriate period of incubation cell vitality has been measured via MTT assay at the ELISA reader at 570nm and 630nm.

### Results

The inhibition of the cell lines with PEG showed a dose dependent growth repression of both cell lines, whereupon significant reduction of viable cells

could be seen only after 144 hours of incubation ( $p < 0,001$ ). This effect was comparable between the two different cell lines.

Even more obvious was the inhibition of the cell lines seen by treatment with GN25. There we could observe a significant repression of growth after 72 hours of incubation, which was still present after 144 hours ( $p < 0,001$ ). Moreover, there was a highly significant decrease of viable cells starting from  $5\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). This effect was comparable between the two cell lines, too.

### **Conclusion**

PEG and GN25 showed a significant dose dependent inhibition of Snail at pancreatic cancer cells *in vitro*, whereupon GN25 induced repression of cell growth occurred faster and in lower doses compared to the inhibition by PEG.

PEG and particularly GN25 represent potential new approaches for the therapy of metastatic pancreatic cancer.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Pankreaskarzinom

#### 2.1.1 Übersicht

Das duktales Adenokarzinom stellt mit einem Anteil von mehr als 85% die häufigste maligne Entität des Pankreas dar und erhielt seinen Namen aufgrund seiner histologischen Ähnlichkeit mit duktalem Zellen (Herold, 2010), (Li *et al.*, 2004). Es entwickelt sich zumeist im Pankreaskopf, wo es im Verlauf häufig zur Stenose des Ductus pancreaticus sowie des Ductus choledochus führt und sowohl Maldigestion als auch einen Ikterus hervorruft (Herold, 2010). Die Ausbreitung erfolgt einerseits per continuitatem wobei benachbarte Organe und Gewebe wie Lymphknoten, Milz und Peritonealraum infiltriert werden (Hezel *et al.*, 2006). Zum anderen besteht eine ausgeprägte Tendenz zur generalisierten Dissemination über Lymphbahnen und Blutgefäße, wobei die Metastasierung bevorzugt in die Leber und die Lunge erfolgt (Herold, 2010), (Hezel *et al.*, 2006), (Li, 2013).

Aufgrund seiner Häufigkeit ist das duktales Adenokarzinom die am besten untersuchte Tumorentität des Pankreas und daher Gegenstand dieser Arbeit.

Das Pankreaskarzinom ist eine rasch progredient verlaufende Erkrankung und stellt im Vergleich zu anderen Karzinomen eine der am schnellsten tödlich verlaufenden Krebserkrankungen dar (Hidalgo, 2010). Trotz intensiver Forschung sowie neuer Diagnostik- und Therapieansätze liegt die 5-Jahresüberlebensrate noch immer unter 5 % (Krantz *et al.*, 2012), (Jemal *et al.*, 2010). Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt im Durchschnitt bei unter 6 Monaten (Hezel *et al.*, 2006), (Krantz *et al.*, 2012).

Die Ursachen für die schlechte Prognose sind vielseitig. Eines der Hauptprobleme stellt die späte Diagnosestellung bei anfangs fehlenden bzw. eher unspezifischen Symptomen dar (Herold, 2010), (Krantz *et al.*, 2012). So zeigt sich bei mehr als zwei Drittel aller Patienten mit Pankreaskarzinom bei



Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium, das durch die lokale Inresektabilität und/oder die metastatische Ausbreitung einer Operation nicht mehr zugänglich ist (Raimondi *et al.*, 2009). Des Weiteren ist das PDAC durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung gekennzeichnet (Singh e Settleman, 2010), was die Entwicklung wirksamer systemischer Therapien erschwert.

Die Mechanismen, die zu diesen Merkmalen und deren Auswirkungen auf die bis dato unzureichende Therapie führen, werden in der Pathogenese und den molekulargenetischen Vorgängen der Karzinogenese deutlich.

### **2.1.2 Epidemiologie**

Vor allem in Europa, aber auch weltweit, zeigen epidemiologische Untersuchungen einen deutlichen Rückgang der Mortalität durch Krebserkrankungen (Malvezzi *et al.*, 2013). Dieser insgesamt positive Trend lässt sich im Hinblick auf das Pankreaskarzinom leider nicht beobachten. Innerhalb der letzten Jahre zeigt sich vor allem in den westlichen Industrienationen ein signifikanter Anstieg der Inzidenz und so stellt es mittlerweile die dritthäufigste maligne Erkrankung des Verdauungstraktes dar (Raimondi *et al.*, 2009), (Robert-Koch-Institut). In Deutschland liegt die Inzidenz des Pankreaskarzinoms derzeit bei mehr als 18 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr (RKI, 2007/2008) und in der westlichen Welt sind steigende Mortalitätsraten beider Geschlechter zu verzeichnen (Raimondi *et al.*, 2009), (Malvezzi *et al.*, 2013). Im Hinblick auf diese epidemiologischen Veränderungen ist es nicht verwunderlich, dass das Pankreaskarzinom in den letzten Jahren auf Platz vier der häufigsten Karzinom-assoziierten Todesursachen vorgerückt ist (Malvezzi *et al.*, 2013). Zum Teil ist diese Entwicklung auf sensitivere Detektionsmethoden und der damit verbesserten diagnostischen Sicherheit zurückzuführen (Raimondi *et al.*, 2009). Des Weiteren spielt der allgemeine demographische Wandel mit zunehmender Lebenserwartung und steigendem Alter der Bevölkerung eine große Rolle (Raimondi *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen entwickelt sich das duktales Pankreaskarzinom durch das multifaktorielle Zusammenspiel vieler Einflussgrößen. Ein einzelner maßgeblicher Risikofaktor, wie etwa beim Bronchialkarzinom das Rauchen, konnte für die Entstehung des Pankreaskarzinoms bisher nicht identifiziert werden (Hidalgo, 2010).

Diese multiplen Faktoren, die in unterschiedlichem Maße Einfluss auf die Entwicklung des PDAC nehmen, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

- Äußere Einflussfaktoren
- Genetische Prädisposition / Hereditäre Erkrankungen

#### **2.1.2.1 Äußere Einflussfaktoren**

Die Suche nach äußeren Umwelteinflüssen ist bereits seit geraumer Zeit Gegenstand zahlreicher experimenteller Studien und deskriptiver Arbeiten. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen ließen sich in den letzten Jahren einige an der Entstehung des Pankreaskarzinoms beteiligte Risikofaktoren identifizieren.

Geographische Beobachtungen zeigten eine signifikant höhere Prävalenz des PDAC in nördlichen Ländern (z. B. Island, Finnland, Nordamerika) als in Äquator-nahen Regionen (Curado, 2007). Es ist zu vermuten, dass dies z.T. auch auf die flächendeckendere medizinische Versorgung und die damit einhergehenden höheren Detektionsraten zurückzuführen ist (Raimondi *et al.*, 2009). Andererseits wird diese Beobachtung durch weitere epidemiologische Untersuchungen unterstützt, die einen Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Vitamin-D-Spiegel im Serum und einem damit einhergehenden erhöhten Erkrankungsrisiko nachweisen konnten (Giovannucci *et al.*, 2006), (Grant e Mohr, 2009). Auch die unterschiedliche Prävalenz der Erkrankung innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen untermauert diese These. Während asiatische Bevölkerungsgruppen das geringste Erkrankungsrisiko aufweisen ist die Prävalenz innerhalb der schwarzen Bevölkerung am höchsten

(Horner M.J., 2009); gleichzeitig herrscht hier die höchste Prävalenz an Vitamin-D-Mangel (Ginde *et al.*, 2009).

Der negative Einfluss von Nikotinkonsum konnte fast ausnahmslos in allen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte nachgewiesen werden. Demnach haben Raucher ein um 70-100 % erhöhtes Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken (Iodice *et al.*, 2008). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen abusivem Alkoholkonsum und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines PDAC konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Jiao *et al.*, 2009). Maßgeblich erschwert wird die eindeutige Zuordnung des Risikofaktors Alkohol v.a. durch die häufige Kombination mit Nikotinabusus (Jiao *et al.*, 2009). Sekundär muss jedoch sein Einfluss hinsichtlich der Entstehung der Alkohol-induzierten Pankreatitis postuliert werden (s.u.).

Der Einfluss von Ernährung und Diät auf das Erkrankungsrisiko muss aufgrund der diskrepanten Datenlage kontrovers diskutiert werden. Eine signifikante Reduktion des Risikos konnte bis dato lediglich für die supplementäre Einnahme von Vitamin D nachgewiesen werden (Giovannucci *et al.*, 2006). Vermutet wird jedoch auch ein positiver Effekt durch mediterrane Ernährung, Substitution verschiedener Spurenelemente wie Folsäure (Larsson *et al.*, 2006) sowie die Kombination mehrerer Nahrungsergänzungsmittel (Larsson, Giovannucci, *et al.*, 2007).

Obgleich der Einfluss von körperlicher Aktivität und Sport umstritten ist, konnten mehreren Studien einen Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Kalorienzufuhr und der Entstehung des PDAC beobachten (Patel *et al.*, 2005). Zwar sind die genauen Mechanismen, denen dies zugrunde liegt noch unklar (Khasawneh *et al.*, 2009), es konnte jedoch in einigen Metaanalysen gezeigt werden, dass ein erhöhter BMI mit einem signifikant höheren Risiko einher geht an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Larsson, Orsini, *et al.*, 2007) und Adipositas im jungen Erwachsenenalter mit einem um bis zu 6 Jahre früheren Auftreten der Erkrankung assoziiert ist (Li, D., Morris, J. S., *et al.*, 2009). Zudem konnte im transgenen Mausmodell (Kras/G12D; Pdx-1/Cre) eine verlangsamte

PDAC-Entwicklung unter Kalorienrestriktion nachgewiesen werden (Lanza-Jacoby *et al.*, 2013).

Beobachtungen der letzten Jahre zeigten Chemo-präventive Effekte einiger Medikamenten auf verschiedene Krebserkrankungen. So konnte beispielsweise eine präventive Wirkung von ASS und NSAIR auf die Entstehung gastrointestinaler Malignome beobachtet werden (Raimondi *et al.*, 2009). Hinsichtlich der Entwicklung des PDAC wurde für einige Zeit eine Chemo-präventive Wirkung für Statine postuliert; in anderen Untersuchungen konnte diese Vermutung jedoch nicht bestätigt werden (Bonovas *et al.*, 2008).

Metformin gilt derzeit als das einzige Medikament, für das eine signifikante Risikoreduktion nachgewiesen werden konnte (Kisfalvi *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu führt die Einnahme von Insulin-Sensibilisierern sowie die exogene Zufuhr von Insulin zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko (Li, D., Yeung, S. C., *et al.*, 2009). Diese Beobachtung wird unterstützt durch die Ergebnisse von Hassan *et al.*, die in einer prospektiv randomisierten Studien ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Patienten mit Typ II Diabetes im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen konnten (Hassan *et al.*, 2007).

Es ist bekannt, dass sich maligne Erkrankungen auf dem Boden bestehender, benigner Erkrankung entwickeln können. Analog hierzu zeigt sich für das Pankreaskarzinom ein bis zu 14fach erhöhtes Erkrankungsrisiko beim Vorliegen einer chronischer Pankreatitis (Hart *et al.*, 2008).

Auch virale und bakterielle Infektionen und die darauffolgende Inflammation werden mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Insbesondere vorausgegangene Infektionen mit Hepatitis B und C zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines duktales Pankreaskarzinoms (Hassan *et al.*, 2008), (El-Serag *et al.*, 2009).

Die Möglichkeit eines Helicobacter-pylori-assoziierten erhöhten Erkrankungsrisikos wird bis dato aufgrund diskrepanter Daten noch diskutiert (Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2001), (Lindkvist *et al.*, 2008).

Grundsätzlich muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Inflammation an sich, unabhängig von der Art des Erregers oder des Auslösers, einen

maßgeblichen Risikofaktor für die Entstehung und das Fortschreiten von Pankreasdysplasien darstellt (Guerra *et al.*, 2011).

### **2.1.2.2 Genetische Faktoren**

Neben äußeren Risikofaktoren sind häufig genetische Veränderung ursächlich für die Entstehung des Pankreaskarzinom und seiner Vorläuferläsionen (Hezel *et al.*, 2006), (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012). Unterschieden werden muss hierbei zwischen familiär gehäuft auftretenden Karzinomen bei hereditären Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen, die zur Ausbildung sporadischer Pankreaskarzinome führen können.

#### **Keimbahnmutationen**

Als Ergebnis der Forschung der letzten Jahre konnten einige genetische Mutationen identifiziert werden, die mit einem gehäuften Auftreten von Pankreaskarzinomen assoziiert sind. Die Mehrzahl dieser Mutationen sind nicht allein ursächlich für die Entstehung des PDAC, sondern im Rahmen hereditärer Syndrome an der Entstehung multipler Malignome beteiligt (Landi, 2009).

FAMMM (Familial atypical mole-malignant Melanoma) (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005), (Shi *et al.*, 2009)

Das FAMMM-Syndrom bezeichnet eine hereditäre Erkrankung, die zunächst lediglich mit der Ausbildung verschiedener Arten von Melanomen assoziiert wurde. Ihr zugrunde liegen Mutationen im CDKN2A-Gen (Hezel *et al.*, 2006), (Raimondi *et al.*, 2009). Die Träger einer dieser Mutationen haben ein bis zu 13fach erhöhtes Risiko an einem PDAC zu erkranken, wobei die Penetranz sehr variabel ist.

Hereditäre Pankreatitis (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005)

Der hereditären Pankreatitis können Mutationen verschiedener Gene zugrunde liegen, die jedoch alle ein Krankheitsbild hervorrufen (Howes *et al.*, 2004). Das am häufigsten betroffene Gen ist PRSS1 auf dem Chromosom 7q (Landi, 2009), (Howes *et al.*, 2004). Das kumulative Risiko bei dieser Mutation an einem Pankreaskarzinom zu erkranken beträgt bei 75jährigen 49-55%. Anders als bei anderen hereditären Syndromen, die für die Entstehung eines PDAC ursächlich sein können, besteht keine Assoziation mit weiteren Malignomen (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005).

Peutz-Jeghers-Syndrom (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005), (Shi *et al.*, 2009)

Als Peutz-Jeghers-Syndrom wird ein Symptomkomplex bezeichnet der neben der Ausbildung von multilokulären Muttermalen mit der Entwicklung verschiedener maligner Erkrankungen assoziiert ist (Raimondi *et al.*, 2009). Hierzu gehören neben Tumoren des Gastro-Intestinal-Traktes, der Brust und inneren weiblichen Genitalien, des Hodens und der Lunge auch das Pankreaskarzinom (Giardiello *et al.*, 2000). Die betroffenen Patienten haben ein bis zu 40fach erhöhtes Risiko an einem PDAC zu erkranken (Giardiello *et al.*, 2000).

Familiärer Brustkrebs (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005), (Shi *et al.*, 2009)

Dem familiären Brustkrebs zugrunde liegt eine Mutation des BRCA-2-Gens (Breast-Cancer-2), das sich auf dem Chromosom 13q befindet (Petersen *et al.*, 2006), (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012). Neben einer erhöhten Inzidenz für Brustkrebs geht sie ebenfalls mit einem signifikant höheren Risiko für die Entwicklung eines PDAC einher. Murphy *et al.* vermuteten, dass bis zu 17% der Patienten mit familiärem Pankreaskarzinom eine Mutation im BRCA-2-Gen tragen (Murphy *et al.*, 2002).

Weitere Keimbahnmutationen, die im Verdacht stehen das Risiko für die Entstehung eines PDAC zu erhöhen, werden derzeit noch kontrovers diskutiert. Hierzu zählt neben der zystischen Fibrose (Mutation im CFTR-Gen) (Maisonneuve *et al.*, 2007) auch die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP, Mutation im APC-Gen) (Giardiello *et al.*, 1993) und das Lynch-Syndrom (HNPCC, Mutation im MSH2- oder MLH1-Gen) (Geary *et al.*, 2008).

### **Sporadische Mutationen**

Im Zuge der Entwicklung modernster technischer Methoden konnten in den letzten Jahren multiple Gene und Proteine identifiziert werden, denen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und der Progression des Pankreaskarzinoms zukommt (Hezel *et al.*, 2006), (Petersen *et al.*, 2006), (Hruban *et al.*, 2005), (Shi *et al.*, 2009). Ungeachtet dieser Vielzahl an Mutationen kristallisierten sich 4 Gene heraus, deren Einfluss von herausragender Bedeutung ist:

- Kras
- Smad4
- p16<sup>CDKN2A</sup> und
- p53 (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012)

Sie stellen die am häufigsten mutierten Gene im Pankreaskarzinom dar und das schrittweise Auftreten ihrer Mutationen korreliert mit den morphologischen Veränderungen die mit der Entwicklung der Vorläuferläsionen bis hin zum metastasierenden Karzinom einher gehen (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012), (Shen *et al.*, 2013).

Die Bedeutung dieser Mutationen wird im Folgenden gemeinsam mit den biochemischen und molekulargenetischen Prozessen, die im Rahmen der Entstehung eines Pankreaskarzinoms stattfinden, näher beleuchtet.

### 2.1.3 Vorläuferläsionen

Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz, wie sie beispielsweise bereits beim kolorektalen Karzinom bekannt ist, entsteht auch das invasiv-duktales Pankreaskarzinom aus präkanzerogenen Vorstufen (Hruban *et al.*, 2000). Durch klinische und histopathologische Untersuchungen konnte die Existenz dreier verschiedener Vorläuferläsionen ermittelt werden, die sich sowohl in ihrer histomorphologischen und makroskopischen Erscheinung, als auch in den von ihnen exprimierten Biomarkern unterscheiden. Zu diesen Vorläuferläsionen zählen die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die Muzinös-Zystische Neoplasie (MCN) sowie die Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie (IPMN) (Maitra *et al.*, 2005).

MCNs bestehen aus Ovar-ähnlichen Zellen mit unterschiedlichen Dysplasie-Graden und wachsen in schleimproduzierenden, zystischen Strukturen (Hezel *et al.*, 2006), (Zamboni *et al.*, 2013).

IPMNs haben auf histologischer Ebene Ähnlichkeit mit PanIN-Läsionen, bilden jedoch große zystische Läsionen aus, die auch makroskopisch sichtbar und somit mit Hilfe der heutigen Bildgebung zu detektieren sind (Adsay *et al.*, 2004). Die häufigsten und damit am besten untersuchten Präkanzerosen stellen die PanIN-Läsionen (Pancreatic Intraductal Neoplasia) dar, die in bis zu 30% der Pankreata nachgewiesen werden können (Hezel *et al.*, 2006). Die aktuell gültige Klassifikation dieser Läsionen wurde in 2001 durch Hruban *et al.* festgelegt, wonach die PanIN's anhand ihrer strukturellen Veränderungen in drei Stadien (PanIN1 - PanIN3) eingeteilt werden (Hruban *et al.*, 2001).



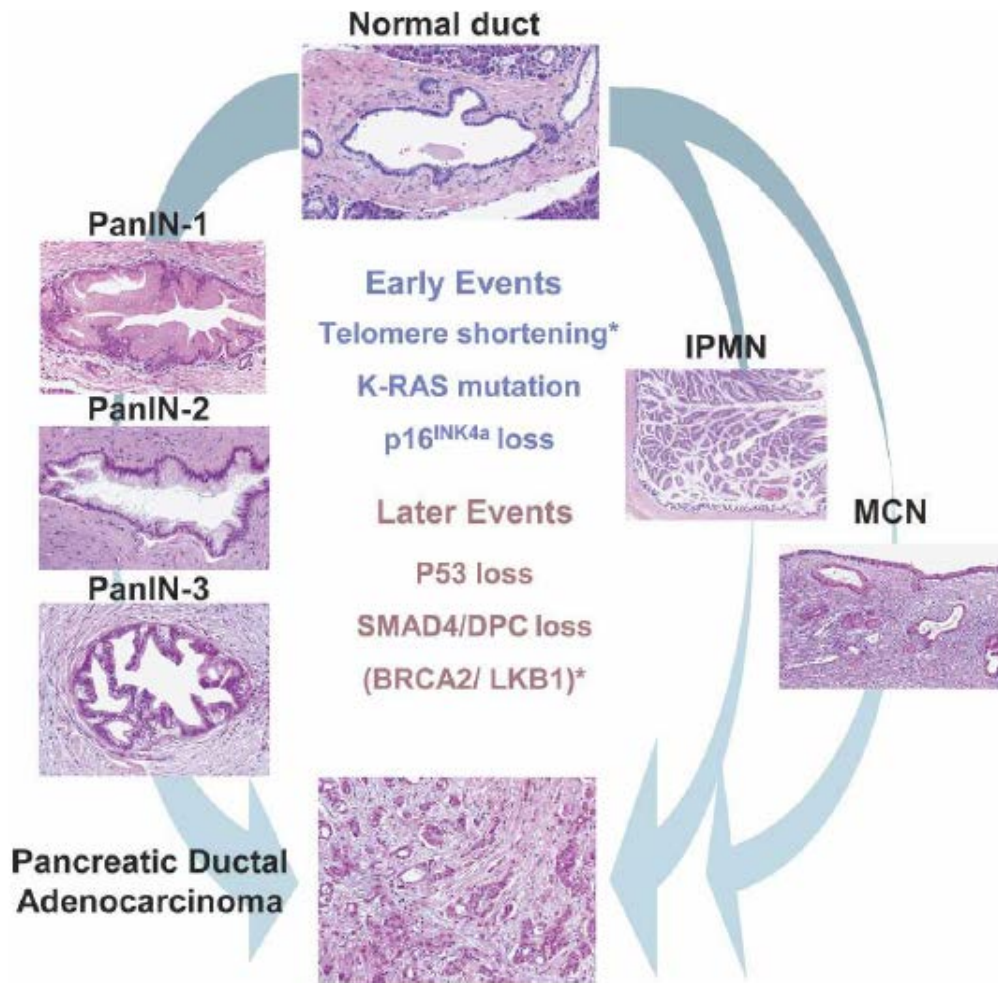


Abb. 1: Die Vorstufen des Pankreaskarzinoms

Diese Veränderungen reichen von der Umwandlung der Epithelzellen in säulenförmige, muzinöse Zellen in den PanIN1-Läsionen, über den Verlust der Zellpolarität mit geringgradigen Zellatypien in den PanIN2-Läsionen bis hin zur Entwicklung nuklearer Atypien, vollständigem Verlust der Polarität und Ausbildung von Zell-Clustern in den high-grade PanIN3-Läsionen (Hruban *et al.*, 2001). Durch Durchbrechen der Basalmembran kann sich aus diesen high-grade Dysplasien ein invasives Karzinom entwickeln. Erst kürzlich konnten Kawada *et al.* in einer histopathologischen Studie diesen Zwischenschritt in der Karzinogenese beweisen (Kawada *et al.*, 2013).

Neben diesen histologischen Veränderungen gehen mit dem Fortschreiten der Präkanzerosen auch einige molekulargenetische Prozesse einher, die die

Pankreaszellen zur Ausbildung weiterer Dysplasien befähigen (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2013).

### 2.1.3.1 Die vier wichtigsten Mutation im PDAC

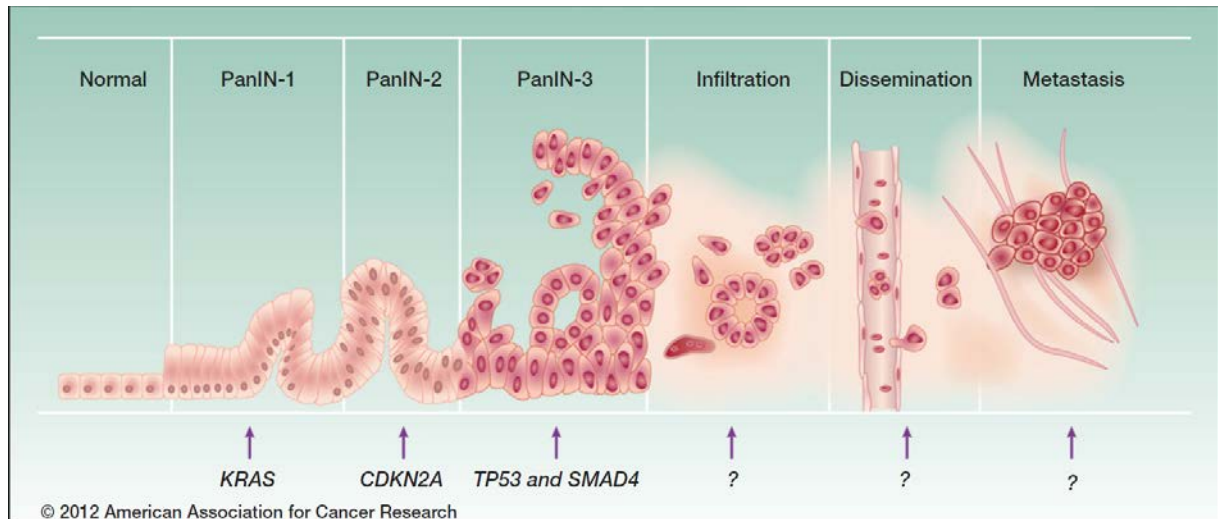


Abb. 2: Die Entwicklung der PanINs bis hin zum invasiven Karzinom

### Kras

Eine der wichtigsten Mutationen in diesen Zusammenhang ist die des Proto-Onkogens Kras (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012). Es gehört der RAS-Familie, einer Gruppe von GTP-bindenden transmembranösen Proteinen, an und spielt eine herausragende Rolle in der Vermittlung von extrazellulären Signalen hinsichtlich Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Malumbres e Barbacid, 2003).

Die Mutation von Kras betrifft meist Codon 12 und hat den Verlust der GAP-Sensitivität zur Folge. Dies resultiert in einer ständigen Aktivierung von Kras und damit zu einer Dysregulation der Transkription von Wachstumsfaktoren (Hezel *et al.*, 2006), (Malumbres e Barbacid, 2003).

Eine Mutation im Kras-Gen lässt sich bereits bei 30% aller PanIN-Läsionen und bei mehr als 95% aller Pankreaskarzinome nachweisen (Rozenblum *et al.*, 1997) und stellt damit das Karzinom mit der höchsten Prävalenz an Kras-

Mutationen dar (Almoguera *et al.*, 1988). Zugleich ist es die früheste genetische Veränderungen die in Pankreaszellen nachzuweisen ist und seine Mutation allein kann zur Ausbildung sowie zur Progression der PanINs führen (Shen *et al.*, 2013). Weiterhin konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden, dass die Mutation von Kras nicht nur für die Entstehung, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Pankreaskarzinoms obligat ist (Collins *et al.*, 2012), (Fleming *et al.*, 2005).

Durch seine herausragende Rolle in der Karzinogenese ist das Proto-Onkogen von großem Interesse für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Seine ständige intrinsische Aktivierung und die völlige Desensibilisierung gegenüber regulierender Proteine sind jedoch einige der Gründe weshalb bis dato keine erfolversprechenden Chemotherapeutika entwickelt werden konnten (Van Cutsem *et al.*, 2004).

Nichts desto trotz ist eine Mutation von Kras alleine nicht ausreichend und bedarf der Kombination mit weiteren genetischen Veränderungen um eine Progression der Vorläuferläsionen zum invasiven Karzinom hervorzurufen (Hingorani *et al.*, 2005), (Guerra *et al.*, 2007).

### **p16/INK4a**

Die zweithäufigste Mutation und somit der nächste Schritt in der Karzinogenese des PDAC betrifft den CDKN2A-Lokus auf dem Chromosomenabschnitt 9p21. Dieser Locus zeigt eine Mutation in multiplen humanen Malignomen und kodiert für zwei unterschiedliche Proteine mit überlappenden Leserastern, p16<sup>INK4a</sup> und ARF (Alternative Reading Frame) (Sherr, 2001). P16/INK4a fungiert als Kontrolleinheit in der Zellteilung und führt durch Inhibition von CDK4 und CDK6 zum Arrest der Zelle in der G1-Phase (Liu *et al.*, 1999). ARF stabilisiert durch Bindung an dessen Inhibitor MDM2 den Tumorsuppressor p53, welcher ebenfalls eine wichtige Kontrollfunktion im Zellzyklus erfüllt (Zhang *et al.*, 1998). Mithilfe o.g. Mechanismen trägt p16/INK4a in besonderem Maße zur Aufrechterhaltung der normalen Zellentwicklung und Homöostase bei und die Freisetzung exogener und endogener Stressfaktoren führt *in vivo* zu seiner vermehrten Expression (Krishnamurthy *et al.*, 2004).

Eine Mutation des CDKN2A-Lokus und seiner kodierenden Proteine p16/INK4a und ARF kann somit durch den Ausfall wichtiger Kontrollpunkte bei der Zellteilung zu einem unkontrolliertem Zellwachstum und einem Progress der Karzinogenese führen (Wilentz *et al.*, 1998).

Im sporadisch auftretenden PDAC zeigt sich die Deletion eines Allels (LOH) von p16/INK4a bei bis zu 95% aller Karzinome (Hustinx *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten mehrere Studien nachweisen, dass die Mutation von Kras und p16/INK4a in Kombination zu einer Progression von Vorläuferzellen zum invasiven Pankreaskarzinom und im weiteren Verlauf zur Ausbildung von Metastasen führt (Hingorani *et al.*, 2005), (Guerra *et al.*, 2007).

### **p53**

Ein weiterer wichtiger Baustein bei der Karzinogenese des PDAC ist der Tumorsuppressor p53, der auf dem Chromosom 17p kodiert wird (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2012). Eine Mutation von p53 lässt sich in über 50% aller Pankreaskarzinome nachweisen und stellt die häufigste Mutation in humanen Karzinomen dar (Rozenblum *et al.*, 1997). Als Kontrollinstanz in verschiedenen Phasen des Zellzyklus fungiert er als essentieller Regulator der Zellteilung (Levine, 1997). Das normalerweise sehr instabile Protein wird bei Detektion von DNA-Schäden posttranslational stabilisiert und kumuliert in der Zelle (Cadwell e Zambetti, 2001). Dies führt zunächst zum Arrest des Zellzyklus und abhängig vom Ausmaß der Schädigung werden Reparaturmechanismen initiiert oder die Apoptose eingeleitet.

Liegt eine Mutation in der kodierenden Gensequenz vor kann das Protein seine Funktion als Kontrollinstanz nicht mehr wahrnehmen. Zudem kann das mutierte Protein p53<sup>MT</sup> die Funktion des Wildtyp-Allels hemmen und somit auch dessen Funktion beeinträchtigen. Dieser Mechanismus wird als dominant-negativer Effekt bezeichnet (Weinberg, 2006).

Eine Mutation des Tumorsuppressors tritt meist in fortgeschrittenen Vorläuferläsionen auf. Shen *et al.* konnten durch immunhistochemische Verfahren zeigen, dass seine Expression in PanIN1- und PanIN2-Läsionen eher schwach, im Gegensatz dazu jedoch in PanIN3-Läsionen und im invasiven

Pankreaskarzinom stark erhöht ist (Shen *et al.*, 2013). Dies impliziert, dass die Bedeutung von p53 in der Karzinogenese vor allem in der Progression der Vorläuferläsionen zum invasiven Karzinom liegt.

Auch hier ist jedoch der additive Effekt der Kombination mit einer Kras-Mutation von Bedeutung. Multiple Untersuchungen konnten zeigen, dass v.a. die Kombination beider Faktoren ursächlich für die Entstehung eines invasiven Karzinoms sowie die Ausbildung von Metastasen ist (Shen *et al.*, 2013), (Hingorani *et al.*, 2005), (Guerra *et al.*, 2007).

## **Smad4**

Der letzte Faktor unter den vier wichtigsten Mutationen in der Karzinogenese des PDAC ist der Tumorsuppressor Smad4 (Hahn *et al.*, 1996). Dieses Protein wird von seinem zugehörigen Smad4-Gen kodiert und gehört der Smad-Superfamilie an (Hahn *et al.*, 1996). Sein Name setzt sich zusammen aus zwei homologen Proteinen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* (SMA = „small“) (Derynck e Zhang, 1996) und *Drosophila melanogaster* (MAD = „mothers against decapentaplegic“) (Sekelsky *et al.*, 1995).

Die karzinogene Rolle des mutierten Smad4-Proteins konnte schon in anderen Malignomen, wie dem kolorektalen Karzinom beobachtet werden (Miyaki *et al.*, 1999). Besonders häufig liegt jedoch eine Mutation im Pankreaskarzinom vor, in dem sich in 50% der Fälle ein homozygoter Verlust und in 90% der Karzinome ein Verlust der Heterozytogenität nachweisen lässt (Hahn *et al.*, 1996), (Wilentz *et al.*, 1998). In früheren Untersuchungen wurde vermutet, dass eine genetische Veränderung von Smad4 erst in sehr fortgeschrittenen PanIN-Läsionen sowie im invasiven Karzinom auftritt. In jüngeren Studien konnte jedoch mittels immunhistochemischer Verfahren eine gleichmäßige Verteilung der Expression über die PanIN-Stadien bis hin zum invasiven Karzinom nachgewiesen werden (Shen *et al.*, 2013).

Physiologisch erfolgt seine Aktivierung über den TGF- $\beta$ -Signalweg, wobei durch Zusammenschluss der zwei TGF- $\beta$ -Rezeptoren I und II die Phosphorylierung von RSmad erfolgt. Dieses kann nun in den Nucleus transportiert werden, wo

es sich mit Smad4 und einigen weiteren Co-Faktoren zu einem Komplex zusammenschließt. Dieser fungiert nun als Transkriptionsfaktor und ruft die Expression multipler Gene hervor, die für die Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose, etc. von Bedeutung sind (Siegel e Massague, 2003). Somit stellt der TGF- $\beta$ -Signalweg bzw. seine Dysregulation im Rahmen einer Mutation einen der wichtigsten Signalwege für die Entwicklung des Pankreaskarzinoms dar (Mccleary-Wheeler *et al.*, 2012).

Die Auswirkungen des Verlustes von Smad4 werden jedoch nicht hauptsächlich in der Progression des Malignoms selbst, sondern vor allem in der Interaktion mit dem das Karzinom umgebenden Gewebe vermutet (Peng *et al.*, 2002). Die in den benachbarten Zellen und der Extrazellulärmatrix ablaufenden Prozesse spielen in der Pathophysiologie des PDAC eine entscheidende Rolle (s.u.). In mehreren unabhängigen Studien konnte nach Wiederherstellung der Funktion von Smad4 sowohl ein Rückgang der Neoangiogenese als auch die Regeneration der Extrazellulärmatrix beobachtet werden (Duda *et al.*, 2003). Zudem konnten *Iacobuzio-Donahue et al.* zeigen, dass der Verlust von Smad4 mit einer fortgeschrittenen Metastasierung einhergeht (Iacobuzio-Donahue *et al.*, 2009). Die Datenlage bezüglich der prognostischen Aussagekraft des Smad4-Status ist derzeit noch diskrepant, jedoch deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust von Smad4 als aussagekräftigen negativen prognostischen Marker zu werten ist (Liu, 2001).

Zusammenfassend ist das duktales Pankreaskarzinom durch seine Heterogenität an genetischen Veränderungen und deren komplexes Zusammenspiel untereinander charakterisiert und eine weiterführende Erforschung dieser Signalwege ist für ein umfassendes Verständnis des Pankreaskarzinoms obligat.

#### **2.1.4 Inflammation und Mikroenvironment im Pankreaskarzinom**

Hinsichtlich dieses komplexen Zusammenspiels multipler Faktoren die zur Ausbildung und Progression des PDAC führen, rückten in jüngerer Zeit nicht nur die molekulargenetischen Veränderungen im Pankreaskarzinom selbst,

sondern auch die Bedeutung begleitender Reaktionen zunehmend ins Blickfeld der Forschung. Hieraus entwickelte sich das Verständnis für ein Zusammenspiel der Vorgänge im Karzinom und seinem umgebenden Gewebe, der sog. „Mikroumwelt“ (Neesse *et al.*, 2011). Dieser Begriff umfasst das den Tumor umgebende Stroma, das sich aus einer heterogenen Masse aus zellulären und azellulären Komponenten zusammensetzt; v.a. aus Myofibroblasten und Fibroblasten (CAF), Immunzellen, Gefäßen, extrazellulärer Matrix, Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Chu *et al.*, 2007). Diese Faktoren verursachen einen bindegewebigen Umbau in Kombination mit einer verminderten Vaskularisation des Stromas.

Diese Umbauvorgänge sind kennzeichnend für das PDAC, welches eines der Stroma-reichsten Karzinome darstellt (Feig *et al.*, 2012). In histopathologischen Untersuchungen zeigten sich sogar Karzinome mit einem größerer Anteil an Stromazellen als an Pankreaskarzinomzellen selbst (Chu *et al.*, 2007). Dies ergibt sich als logische Konsequenz aus der Beobachtung von Collins *et al.*, dass die Mutation von Kras, die zu >95% im PDAC vorliegt, nicht nur die Entwicklung des PDAC selbst sondern auch des umgebenden Stromas fördert (Collins *et al.*, 2012) .

Das Wissen um die Rolle der Mikroumwelt an der Entwicklung und Ausbreitung von Malignomen ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis des Pankreaskarzinoms. Durch die komplexen Interaktionen der verschiedenen Faktoren untereinander wird nicht nur das Wachstum des Tumors selbst, sondern auch die Dissemination von Metastasen gefördert und Apoptose-Mechanismen verhindert (Hwang *et al.*, 2008). Kadaba *et al.* konnten in einem 3D-Tumor-Modell zeigen, dass je größer der Anteil an Stromazellen ist, desto schneller das Tumorwachstum und die Invasion und desto geringer die Apoptoserate innerhalb des Karzinoms ist (Kadaba *et al.*, 2013). Beobachtungen zur Identifizierung von prognostischen Markern konnten zeigen, dass die Aktivität des Stromas prognostisch aussagekräftiger ist, als das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (Erkan *et al.*, 2008).

Auch die Ursachen für die ausgeprägte Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie, sowie die äußerst schlechte Bioverfügbarkeit der Chemotherapeutika sind größtenteils in der Mikroumwelt zu finden.

Einwandernde Fibrozyten werden zu Kollagen-produzierenden Myofibroblasten umgewandelt (Lin *et al.*, 2012) und verursachen eine fortschreitende Fibrosierung mit

abnehmender Vaskularisation des Gewebes (Provenzano *et al.*, 2012). Auch die Pankreas-Sternzellen, die physiologischerweise im Pankreasgewebe nur in sehr geringer Zahl vorhanden sind, tragen durch Produktion des fibrösen Stromas (Hwang *et al.*, 2008) und Aktivierung der Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- $\beta$  (Vonlaufen *et al.*, 2008) zur Entstehung der Mikroumwelt bei.

Einer der Signalwege die zur Aktivierung dieser Umbaumechanismen führen ist der Hedgehog-Signalweg, mit seinem wichtigsten Vertreter SHh (Sonic-Hedgehog). Dieser spielt während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle in der Organogenese, ist jedoch im adulten Pankreas nicht mehr nachzuweisen (Ingham e McMahon, 2001). Sowohl im Pankreaskarzinom als auch in anderen Malignomen konnte die Reaktivierung dieses Signalweges beobachtet werden. Dabei ist er bereits in frühen PanIN-Läsionen nachweisbar (Prasad *et al.*, 2005) und fördert sowohl die Entwicklung als auch die Metastasierung des PDAC durch die Aktivierung des Stromas und dessen desmoplastische Umwandlung (Bailey *et al.*, 2008). Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Inhibition des Hedgehog-Signalwegs neben der Rückbildung des desmoplastischen Gewebes eine signifikante Verbesserung der Verfügbarkeit der Chemotherapeutika durch Verbesserung der Vaskularisation hervorruft (Provenzano *et al.*, 2012), (Olive *et al.*, 2009).

Auch die direkte enzymatische Inhibition von Stromabestandteilen wie der Hyaluronsäure führt durch die Ausbildung neuer Gefäße zu einer verminderten Chemoresistenz und damit zur Akkumulation und verbesserten Verfügbarkeit von Gemcitabine (Jacobetz *et al.*, 2013).

Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Umwandlung des Stromas kommt dem Notch-Signalweg zu. Dieser existiert, vergleichbar mit dem Hedgehog-Signalweg, normalerweise nur in der Embryogenese und ist im adulten Gewebe nicht mehr aktiv (Lai, 2004). Die pathologische Reaktivierung dieses Signalwegs führt ebenfalls zur Entwicklung und zum Progress des Pankreaskarzinoms und seiner Vorläuferläsionen (Sjolund *et al.*, 2005).



Auch der begleitenden inflammatorischen Reaktion kommt eine wichtige Rolle in der Stroma-vermittelten Karzinomprogression zu. *Guerra et al.* konnten zeigen, dass die alleinige Mutation von Kras gemeinsam mit dem Vorliegen einer Pankreatitis zur Ausbildung von PanINs und sogar zu einem invasiven Pankreaskarzinom führen kann. Zudem konnte unter anti-inflammatorischer Therapie die Regeneration der Gewebedysplasien und die Verlangsamung der PanIN-Progression beobachtet werden (*Guerra et al.*, 2011).

Die Ausbildung eines permissiven Milieus für die Aufrechterhaltung dieser Entzündungsreaktion wird hervorgerufen durch eine weitere Gruppe an Effektoren die an der Stromabildung beteiligt sind: Immunzellen und deren Mediatoren (*Scarlett et al.*, 2011). Diese verursachen die Ausbildung eines immunsuppressiven Umfelds, welches die Entstehung und Verbreitung der Karzinomzellen erleichtert (*Chu et al.*, 2007). Von Bedeutung sind diesbezüglich v.a. Mastzellen, die bereits in sehr frühen Vorläuferstadien nachzuweisen sind und das Tumorwachstum fördern (*Ma et al.*, 2013), sowie immunsuppressive Zellen die dem Knochenmark entstammen und ebenfalls das Tumorwachstum unterstützen (*Porembka et al.*, 2012).

Die Bedeutung der Entzündungsreaktion spiegelt sich auch in der Vielzahl an Zytokinen und Immunmodulatoren wider, die bereits identifiziert werden konnten (*Li et al.*, 2011). Diese vermitteln über IL-6- (*Lesina et al.*, 2011), IL-10 (*Tan et al.*, 2009), CXCR2- (*Ijichi et al.*, 2011) oder T2-Helferzellen (*De Monte et al.*, 2011) die Progression der PanIN-Läsionen zum invasiven Karzinom. Umgekehrt konnten in multiplen Therapiestudien durch die Inhibition von Immunmodulatoren eine signifikant höhere Überlebensrate erzielt werden (*Ijichi et al.*, 2011) (*Zheng et al.*, 2013).

Neben den beschriebenen existieren noch unzählige weitere Faktoren, die im Zusammenspiel untereinander die Mikroumwelt des Pankreaskarzinoms formen und ein weiterführendes Verständnis dieser Prozesse ist für den Entwurf multimodaler Therapiekonzepte essentiell.

## 2.2 Die EMT und ihre invasiven Fähigkeiten

Die Fähigkeit von Zellen sich gezielt zu transformieren wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts im Rahmen der embryologischen Forschung entdeckt (Duval, 1879), rückte jedoch erst im Laufe der letzten 40 Jahre in den Fokus der Tumorforschung (Hay, 2005).

Als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man die Transdifferenzierung einer epithelialen zu einer mesenchymalen Zelle und die mit ihr einhergehenden morphologischen und molekulargenetischen Veränderungen (Hay, 2005), (Thiery *et al.*, 2009).

Epithelzellen liegen meist in einschichtigen Zelllagen vor und unterliegen einer ausgeprägten apiko-basalen Polarität. Durch starke Zell-Zell-Verbindungen besitzen sie eine sehr begrenzte Motilität. Diese Zellverbindungen werden durch verschiedenste transmembranöse Proteine gebildet, welche als molekulargenetische Marker von der Zelle exprimiert werden; zu nennen sind hierbei vor allem E-Cadherin, Occludin und Claudin (Kalluri e Weinberg, 2009).

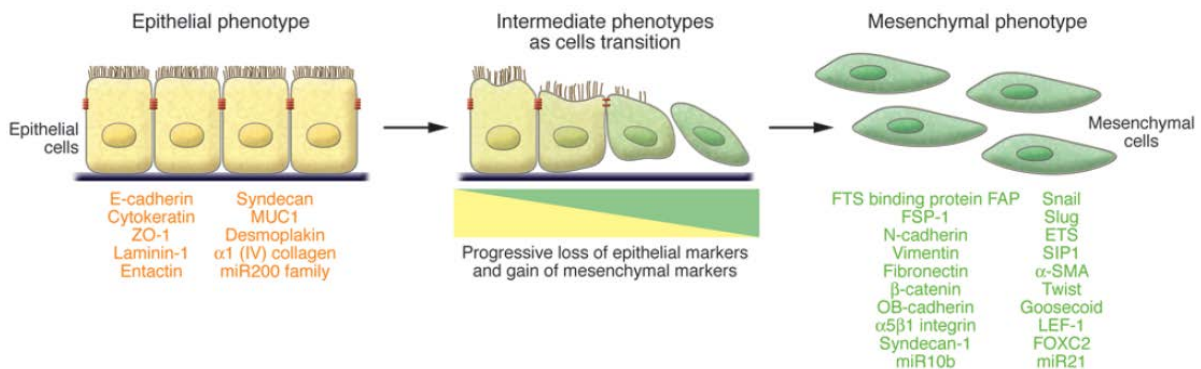


Abb. 3: Die morphologischen Veränderungen während der EMT

Im Gegensatz dazu zeichnen sich die spindelförmig umgewandelten Mesenchymzellen durch ihre zum Großteil aufgehobenen Zell-Zell-Kontakte, durch eine hohe Motilität und nur sehr schwache Zell-Matrix-Kontakte aus. Sie

besitzen eine anterior-posteriore Polarität und exprimieren mesenchymale Marker wie N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin (Kalluri e Weinberg, 2009). Da die EMT nicht nur in der Karzinogenese beobachtet werden kann, unterteilt man sie in drei Kategorien (Kalluri e Weinberg, 2009).

### **EMT in der Embryogenese**

Für die Morpho- und Organogenese ist die EMT, die sich im Verlauf der Embryonalentwicklung mehrfach wiederholt, essentiell. Sie wird gesteuert durch eine Vielzahl an Effektoren, die z.T. auch bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen (Kokkinos *et al.*, 2010).

### **EMT in der Wundheilung**

Bei Gewebeschädigungen wie Verletzung oder Entzündung spielt die EMT eine wichtige Rolle zur Regeneration des Gewebes und Wiederherstellung seiner Integrität. Bei andauernder Gewebeschädigung, wie z. B. im Rahmen einer chronischen Inflammation, führt sie jedoch durch Fibrosierung zur Destruktion des Mesenchyms (Potenta *et al.*, 2008).

### **EMT in der Karzinogenese**

Diese Form der epithelial-mesenchymalen Transition findet nur in Zellen statt, in denen eine genetische oder epigenetische Veränderung stattgefunden hat. Durch diese Aberrationen werden multiple Signalwege und Effektoren aktiviert, die entweder in Kooperation miteinander oder unabhängig voneinander, die EMT fördern (Thiery, 2002), (Thiery *et al.*, 2009).

### 2.2.1 Die EMT im Pankreaskarzinom

Die EMT im Rahmen der Karzinogenese ist nicht nur ein Trigger für die Ausbildung (Thiery *et al.*, 2009),(Kalluri, 2009), sondern auch für die Ausbreitung und Metastasierung von Malignomen, da sie die Tumorzellen zur Migration befähigt (Hanahan e Weinberg, 2011). Durch genetische Veränderungen und die daraus resultierende Aktivierung nachfolgender Signalwege können die transformierten Zellen den Zellverband verlassen (Delamination). Diese Zellen sind vor allem in der invasiven Peripherie des Tumors lokalisiert, von wo aus sie einer Metastasierungskaskade folgen (Thiery, 2002). Nach der Lösung der Zellen aus ihrem Verband folgt der Durchbruch durch die Basalmembran (Invasion) und der Übertritt in Lymph- oder Blutgefäße (Intravasation). Diese können sie in anderen Organen wieder verlassen (Extravasation) um sich dort anzusiedeln (Huber *et al.*, 2005). Um sich in dem fremden Gewebe zu vermehren und Makrometastasen bilden zu können, ist eine Re-Transformation zur Epithelzelle notwendig, was als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet wird (Thiery e Sleeman, 2006). Eine Erklärung für das Stattfinden der MET ist, dass die EMT-fördernden Signale aus der Mikroumwelt des Primarius in den entfernten Organen entfallen und so keine weiteren Stimuli für die EMT bestehen (Bissell *et al.*, 2002).

Lange Zeit bestand eine kontroverse Diskussion darüber, ob das Vorliegen von EMT-Zellen lediglich einen Artefakt in *in vitro* kultivierten Zellen darstellt (Tarin *et al.*, 2005). Diese Vermutung konnte jedoch durch die Identifikation von EMT-Zellen in späteren *in-vivo*-Experimenten widerlegt werden (Flier *et al.*, 2010).

Bis vor einiger Zeit wurde zudem angenommen, dass die epithelial-mesenchymale Transition und die damit verbundene Metastasierung erst in fortgeschrittenen Karzinomen stattfinden kann (Cairns, 1975). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Fähigkeit zur EMT eher als eine dem Malignom grundsätzlich inhärente Eigenschaft anzusehen ist (Klein, 2009), (Gupta *et al.*, 2005). Rhim *et al.* konnten im transgenen Mausmodell (Pdx1-Cre; Kras<sup>G12D</sup>; p53) das Vorliegen von EMT-Zellen sowie deren Invasion bereits in PanIN2- und PanIN3-Läsionen nachweisen (Rhim *et al.*, 2012). Zudem ist zu beobachten, dass Karzinome in denen eine epithelial-mesenchymale Transition

stattgefunden hat ein hohes Malignitätspotential haben (Krantz *et al.*, 2012) und mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind (Masugi *et al.*, 2010).

Die Induktion der EMT entsteht durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die in einem komplexen Netzwerk miteinander interagieren (Peinado *et al.*, 2007) und die im Folgenden näher beleuchtet werden.

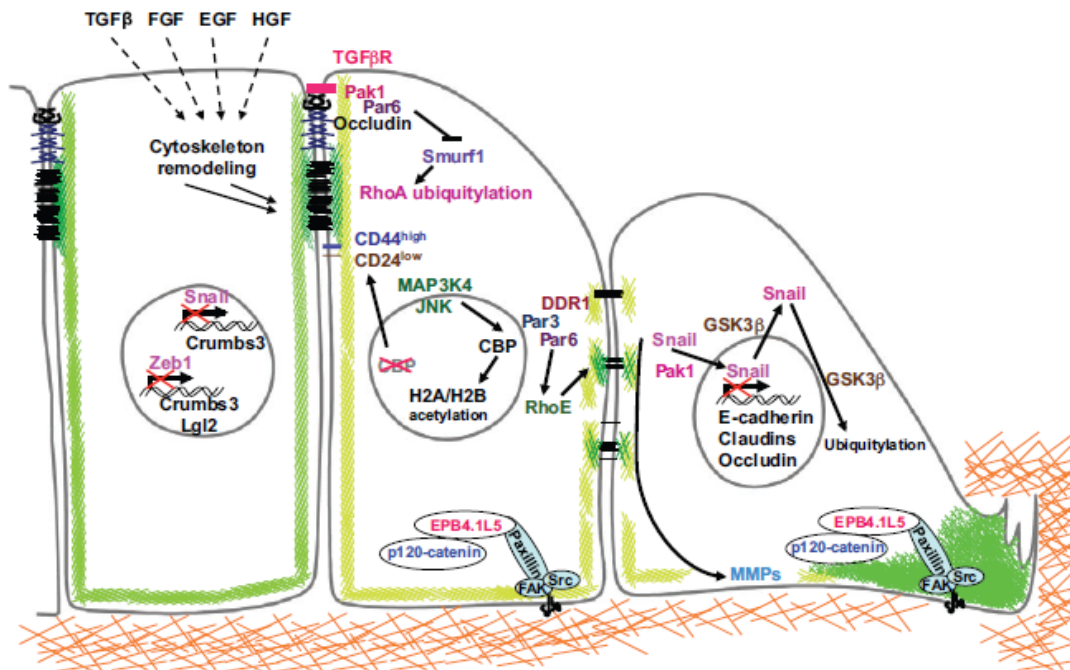


Abb. 4: Signalwege während der EMT

## Kras

Nicht nur für die Entstehung des PDAC sondern auch für die EMT ist das Vorliegen einer genetischen Veränderung von Kras essentiell. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Induktion bzw. Expression von mutiertem Kras alleine zu unkontrollierter Proliferation, Verlust von E-Cadherin und Zunahme der N-Cadherin-Expression führt (Hingorani *et al.*, 2003). Dies kann über mehrere Signalwege aktiviert werden, von denen der wichtigste jedoch der RAS/MAPK-Signalweg zu sein scheint (Janda *et al.*, 2002).

Singh *et al.* konnten in einem *in-vitro*-Experiment durch die Inhibition von Kras in Kras<sup>mt</sup>-Zelllinien, das Vorliegen von Kras-abhängigen und Kras-unabhängigen

Populationen nachweisen (Singh *et al.*, 2009). Die Kras-abhängigen Zellen zeigten, im Gegensatz zu den unabhängigen Zellen, einen gut differenzierten, epithelialen Phänotyp ohne EMT-Merkmale (Singh *et al.*, 2009). Durch diese Beobachtung könnten sich neue Therapieansätze ergeben.

### **Der Cadherin-Switch**

Wie bereits oben erwähnt stellt ein Hauptmerkmal der EMT, neben dem Verlust anderer epithelialer Marker, vor allem die Abnahme von E-Cadherin und die gleichzeitig zunehmende Expression von N-Cadherin dar. Dies wird als sog. „Cadherin-Switch“ bezeichnet (Berx e Van Roy, 2009). Als wichtiger Bestandteil der tight-junctions bedeutet ein Verlust von E-Cadherin das Aufbrechen dieser Zell-Zell-Kontakte und damit eine erhöhte Mobilität der Zelle. Der Verlust von E-Cadherin ist assoziiert mit der Entdifferenzierung von Tumorzellen, infiltrativem Tumorwachstum und disseminierter Metastasierung (Rhim *et al.*, 2012), (Onder *et al.*, 2008), wohingegen die Re-Expression von E-Cadherin zur mesenchymal-epithelialen Transition und Tumorsuppression führt (Seidel *et al.*, 2004). Gleichzeitig führt die vermehrte Expression von N-Cadherin zu einem vermehrt invasiven Wachstum und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Hotz *et al.*, 2007).

Entscheidend hierfür ist jedoch nicht alleine der Abbau der Zell-Zell-Verbindungen, vielmehr werden durch den Cadherin-Switch eine Reihe von Signalwegen induziert, die kausal für die Progression des Pankreaskarzinoms sind (Perl *et al.*, 1998).

Eine dieser Kaskaden ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Heuberger e Birchmeier, 2010). Physiologischerweise erfolgt die Ubiquinierung von  $\beta$ -Catenin durch die Bindung an einen Proteinkomplex bestehend v.a. aus Axin, APC (Adenomatosis polyposis coli) und GSK3 $\beta$  (Glykogen-Synthase Kinase 3 $\beta$ ) (Rao e Kuhl, 2010). Im Rahmen des Cadherin-Switch erfolgt jedoch die Bindung von Wnt (Wingless-Int-Gen) an seinen Rezeptor „Frizzled“. Dies induziert die Aktivierung des Proteins „Dishevelled“, welches an den Proteinkomplex bindet und ihn inaktiviert (Macdonald *et al.*, 2009). Dadurch akkumuliert  $\beta$ -Catenin in der Zelle und wird in den Nukleus transportiert, wo es

als Co-Faktor die Transkription multipler zellproliferativer Gene fördert (Logan e Nusse, 2004).

## **TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  stellt ein Protein aus der Transforming Growth Factor  $\beta$ -Superfamilie dar (Herpin *et al.*, 2004). Es reguliert eine Reihe von Prozessen, die an der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose beteiligt sind und ist einer der maßgeblichen Induktoren der epithelial-mesenchymalen Transition (Thiery *et al.*, 2009). Es wird von verschiedenen Immunzellen, insbesondere Makrophagen, exprimiert und durch inflammatorische Stimuli, Hypoxie, Integrine, etc. freigesetzt (Wipff e Hinz, 2008). Die durch TGF- $\beta$  induzierten Vorgänge können durch unterschiedliche Signalwege vermittelt werden, wobei hier zwischen der bedeutsamen Smad-abhängigen und der Smad-unabhängigen Signaltransduktion unterschieden wird (Singh *et al.*, 2011).

Im Rahmen der Smad-abhängigen Signalkaskade bindet TGF- $\beta$  als Dimer an den TGF- $\beta$ -Rezeptor 2, der daraufhin den TGF- $\beta$ -Rezeptor 1 phosphoryliert. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung von Smad2 und Smad3, die daraufhin ein Heterodimer mit Smad4 bilden können. Dieser Komplex wandert in den Nukleus und fungiert dort als Transkriptionsfaktor für Gene wie p27, die an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind (Shi e Massague, 2003). Smad4 wiederum besitzt die Fähigkeit über positive Rückkopplung eine weitere Ausschüttung von TGF- $\beta$  zu induzieren und somit die EMT zu verstärken (Derynck *et al.*, 2001).

Die Rolle von TGF- $\beta$  scheint sehr paradox und wurde daher lange diskutiert (Ikushima e Miyazono, 2010). Sowohl im gesunden Organismus als auch in den frühen Stadien der Karzinogenese wirkt es zunächst anti-inflammatorisch und tumorsuppressiv (Heldin *et al.*, 2009), wohingegen es in späteren Tumorstadien eine tumorprogressive Rolle einnimmt und selbst die EMT fördert (Ellenrieder *et al.*, 2001).

Mutationen im TGF- $\beta$ -Signalweg werden häufig durch genetische Veränderungen von Smad4 hervorgerufen, selten können jedoch auch direkte Mutationen der TGF- $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen werden (Maitra e Hruban,

2008). Auch Aberrationen im ERK/MAPK-, RhoA- oder NF- $\kappa$ B-Signalweg können ursächlich für den Verlust der TGF- $\beta$ -vermittelten Kontrollfunktionen sein (Maier, H. J. *et al.*, 2010).

## **NF- $\kappa$ B und die Inflammation**

Das Protein NF-  $\kappa$ B bildet aufgrund seiner anti-apoptotischen und inflammatorischen Wirkung ein Verbindungsstück zwischen Inflammation und EMT (Grivennikov *et al.*, 2010). In den meisten Zellen liegt das vollständig ausgebildete Protein in gebundener, und damit inaktiver Form vor (Gilmore, 2006). Seine Aktivierung erfolgt durch Wachstumsfaktoren, Cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), virale und bakterielle Antigene, sowie physikalische und chemische Noxen (Fitzgerald *et al.*, 2007). In Malignomen scheint einer seiner wichtigsten Aktivatoren TNF- $\alpha$  zu sein (Maier, H. J. *et al.*, 2010), (Lopez-Novoa e Nieto, 2009).

In aktivierter Form kann es nun in den Nukleus wandern und dort als Transkriptionsfaktor agieren. Dabei bindet es an bestimmte DNA-Sequenzen, das sog. „ $\kappa$ B-Motiv“, das auf multiplen Genen vorhanden ist. Die Wirkung von NF- $\kappa$ B zeichnet sich somit durch Schnelligkeit und Unselektivität aus (Perkins, 2007).

Durch seine inflammatorische Wirkung trägt NF- $\kappa$ B zur EMT, Invasion und Bildung von Metastasen bei (Maier, H. J. *et al.*, 2010), (Wu *et al.*, 2009). Zum anderen kann es auch auf direktem Wege Proteine aktivieren, die eine entscheidende Rolle in der EMT spielen, wie etwa Snail und Zeb (Julien *et al.*, 2007).

Wie oben bereits beschrieben trägt die begleitende Entzündungsreaktion nicht nur maßgeblich zur Entstehung, sondern auch zur Ausbreitung von Karzinomen bei (Guerra *et al.*, 2007). So konnten Rhim *et al.* zeigen, dass im Rahmen einer Pankreatitis (induziert zum einen durch Cerulein, zum anderen durch Ligatur des Pankreasgangs) nicht nur die PanIN-Progression, sondern auch die Menge an zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blut zunimmt (Rhim *et al.*, 2012). Unter der Therapie mit Dexamethason zeigte sich jedoch eine signifikante Rückbildung der PanINs sowie der CTCs (Rhim *et al.*, 2012). Ein ähnlicher



Effekt konnte auch durch *Rothwell et al.* bestätigt werden, die unter anti-inflammatorischer Therapie eine Reduktion der Mortalität des Pankreaskarzinoms beobachteten (*Rothwell et al.*, 2011).

## **Cancer stem cells**

Im Laufe der letzten Jahre rückte eine weitere Zellpopulation in den Fokus der Wissenschaft, deren Existenz und Bedeutung lange kontrovers diskutiert wurde (*Jordan*, 2009), mittlerweile jedoch in multiplen Studien nachgewiesen werden konnte (*Garcia-Silva et al.*, 2013). Diese sog. Cancer stem cells (CSC) ähneln in ihrer Morphologie und ihrem molekulargenetischen Muster Stammzellen und können in den unterschiedlichsten Karzinomen nachgewiesen werden (*Mani et al.*, 2008). Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas machen sie weniger als 1% der Gesamtzellzahl aus, besitzen jedoch im Vergleich zu den normalen Tumorzellen eine 100fach höhere Tumorigenität (*Floor et al.*, 2011). Sie sind gekennzeichnet durch die Expression verschiedener Biomarker wie CD44, CD24 (*Lee et al.*, 2008), CD133 (*Hermann et al.*, 2007) und ALDH (*Rasheed et al.*, 2010) und somit mit Hilfe immunhistochemischer Methoden nachweisbar. Ihre Bedeutung wird an den sie kennzeichnenden Charakteristika deutlich. Neben ihrer Resistenz gegenüber der Apoptose, besitzen sie die Fähigkeit der Selbsterneuerung, der Absiedelung in andere Organe sowie das Potential zur Differenzierung in die unterschiedlichsten Zellarten (*Gupta et al.*, 2009). Diese Merkmale verleihen ihnen einen Stammzellcharakter und machen sie gänzlich unempfindlich gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (*Abel e Simeone*, 2013).

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CSCs einen signifikanten prognostischen Marker für das Überleben, die Metastasenbildung und die Chemo-Resistenz eines Karzinoms darstellen (*Mani et al.*, 2008), (*Rasheed et al.*, 2010), (*Polyak e Weinberg*, 2009). Auch deren vermehrte Expression von ALDH ist mit einer schlechteren Prognose, erhöhter Selbsterneuerungstendenz (*Krantz et al.*, 2012) und vermehrter Metastasierung assoziiert (*Rasheed et al.*, 2010).

Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Zellen, die eine EMT durchlaufen haben, eine Vielzahl CSC-ähnlicher Eigenschaften und Merkmale übernehmen (Floor *et al.*, 2011), (Rasheed *et al.*, 2010), (Polyak e Weinberg, 2009).

## **miRNA**

Als Mikro-RNAs bezeichnet man eine Gruppe nicht-kodierender RNA-Stränge, die durch Bindung an mRNA deren post-translationale Veränderung auslösen und dadurch die Degradation der mRNA und seines kodierenden Proteins verursachen. Einige Mitglieder der miRNA-200-Superfamilie sowie miRNA 205 bewirken eine Hemmung der EMT im duktalem Pankreaskarzinom (Kent *et al.*, 2009). Einer der Hauptsignalwege diesbezüglich ist in der Repression des Proteins Zeb1 zu vermuten (Wellner *et al.*, 2009). In Pankreaskarzinomen mit stattgefundenener EMT konnte eine reziproke Expression von miRNA-200 und ZEB1 nachgewiesen werden, während ansteigende Konzentrationen von Zeb1 wiederum die EMT, die Ausbildung von CSCs sowie die Chemo-Resistenz förderten (Burk *et al.*, 2008). Wellner *et al.* konnten zudem beobachten, dass Zeb1 die Expression von miRNA-200 hemmt (Wellner *et al.*, 2009). Umgekehrt bewirkt eine Re-Expression von miRNA-200 im PDAC eine Supprimierung von Zeb1 und damit eine erhöhte Sensibilität für Chemotherapeutika (Li, Y. *et al.*, 2009).

## **Die Chemo-Resistenz**

Ein Merkmal des Pankreaskarzinoms und gleichzeitig einer der Hauptgründe für seine schlechte Prognose ist seine Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika, die in der EMT selbst und den mit ihr einhergehenden Veränderungen begründet ist (Sarkar *et al.*, 2009). Arumugam *et al.* konnten zeigen, dass im Vergleich zwischen Chemo-resistenten und Chemo-sensiblen Zelllinien lediglich in den resistenten Zellen eine EMT stattgefunden hatte (Arumugam *et al.*, 2009).

Wie bereits erwähnt wird diese Resistenz sowohl im Pankreaskarzinom als auch in anderen Malignomen in hohem Ausmaß durch die Cancer stem cells verursacht (Singh e Settleman, 2010), (Izumiya *et al.*, 2012). Erst vor Kurzem konnten *Quint et al.* zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen, die eine Resistenz gegenüber Gemcitabine aufweisen, Stammzell-Eigenschaften besitzen (Quint *et al.*, 2012).

Auch die Mikroumwelt und das den Tumor umgebende Stroma bilden aufgrund seiner verringerten Gefäßversorgung, seiner erhöhten Matrixsynthese und dem Kollagen-I-reichen Stroma eine für Chemotherapeutika nur schwer zu durchdringende Barriere (Hwang *et al.*, 2008), (Li *et al.*, 2012).

Diese Stroma-Reaktionen und damit die Aufrechterhaltung der Barriere werden durch multiple Mediatoren mit unterschiedlichen Signalwegen vermittelt, auf die im Weiteren näher eingegangen wird.

### **2.3 Der Transkriptionsfaktor Snail**

Wie bereits beschrieben stellt die epithelial-mesenchymale Transition einen essentiellen Schritt in der Progression und Invasion des Pankreaskarzinoms und anderer Malignome dar (Kalluri, 2009), (Hanahan e Weinberg, 2011). Im Laufe der letzten Jahre gelang die Identifikation einiger Transkriptionsfaktoren, denen eine Schlüsselrolle in der Induktion der EMT zukommt. Hierunter zählt neben Slug, Zeb1, Zeb2 (Peinado *et al.*, 2007), Twist (Yang *et al.*, 2010) und E12/E47 (Perez-Moreno *et al.*, 2001) insbesondere der Transkriptionsfaktor Snail.

Zur humanen Snail-Superfamilie gehören Snail (Snai1) (Paznekas *et al.*, 1999), Slug (Snai2) (Rhim *et al.*, 1997) und die weniger gut untersuchten Proteine Scratch1 und Scratch2 (Nakakura *et al.*, 2001). Erstmals entdeckt wurde Snail in *Drosophila melanogaster* (Grau *et al.*, 1984), wo es als Inhibitor des Proteins „Shotgun“, dem Homolog zum humanen E-Cadherin, fungiert (Nieto, 2002). Das Snail-Gen, welches für das Snail-Protein kodiert, befindet sich auf dem 20q13.1-Lokus (Paznekas *et al.*, 1999). Seine molekulare Struktur besteht aus einer hoch konservierten C-terminalen Region. Diese enthält 4 bis 6 Zinkfinger,

welche die Bindung von Snail an DNA-Sequenzen ermöglichen (Manzanares *et al.*, 2001). Allerdings zeigen auch andere Motive auf dem Snail-Gen repressive Fähigkeiten, wie die SNAG-Region, die ebenfalls an E-Boxen binden kann (Nakayama *et al.*, 1998).

Obgleich eine vermehrte Expression von Snail bereits in mehreren Malignomen beobachtet werden konnte, zeigt es im duktalem Adenokarzinom des Pankreas mit einer Prävalenz von ca. 80 % seine stärkste Ausprägung (Hotz *et al.*, 2007), (Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005). Die erhöhte Expression von Snail korreliert hoch signifikant mit stark invasivem Wachstum, hohem metastatischem Potential und sehr schlechter Prognose (Peinado *et al.*, 2007), (Yin *et al.*, 2007).

Grundsätzlich ist die Snail-vermittelte EMT nicht nur von Bedeutung für die Tumorprogression, sie spielt auch eine essentielle Rolle in der Embryogenese (Hay, 1995). So konnte nachgewiesen werden, dass im Snail<sup>-/-</sup>-Mausmodell aufgrund der fehlenden EMT keine Gastrulation stattfindet, was zum Tod des Embryos führt (Carver *et al.*, 2001).

Der Einfluss von Snail und Slug ist jedoch nicht nur auf die Induktion der EMT beschränkt, sondern konnte auch in vielen anderen Entwicklungsprozessen, wie der neuronalen Differenzierung, der Entscheidung über Schicksal und Überleben von Zellen, der Verhinderung von Apoptose und der Wundheilung nachgewiesen werden (Nieto, 2002), (Savagner *et al.*, 2005).

Die für die Tumorforschung bis heute wichtigste Funktion von Snail besteht in der Repression von E-Cadherin. In 2000 konnten sowohl Cano *et al.*, als auch Battle *et al.* erstmals die Funktionsweise von Snail auf molekularer Ebene entschlüsseln. Sie identifizierten die sog. E2-Box auf der Promoter-Region von CDH1 als die konsensuelle Bindungssequenz für Snail (5'-CANNTG-3'-Sequenz) und erbrachten damit den Nachweis einer direkten Repression von E-Cadherin durch Snail (Cano *et al.*, 2000), (Battle *et al.*, 2000). Diese Repression erfolgt sowohl im Rahmen der Embryogenese, als auch bei der Induktion der malignen EMT und befähigt damit Tumorzellen zur Invasion und Progression. Trotz der gleichen Bindungssequenz zeigt Slug im Vergleich zu Snail eine deutlich geringere Bindungsaffinität an die E2-Box (Bolos *et al.*, 2003) und in Abhängigkeit des jeweiligen Vorgangs können Snail und Slug miteinander

kooperieren oder auch konkurrieren (Labonne e Bronner-Fraser, 2000). In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich insgesamt eine deutlich stärkere Expression von Snail im Vergleich zu Slug, wobei Snail eher im Zentrum des Tumors, Slug eher in den Randzonen lokalisiert war (Hotz *et al.*, 2007). Die Aktivierung von Slug alleine resultiert nicht in der Repression von E-Cadherin, so dass seine Funktion in der Aufrechterhaltung der EMT vermutet wird (Hotz *et al.*, 2007) und zu diesem Zweck mit Snail kooperiert (Uchikado *et al.*, 2005).

Die repressive Regulation von E-Cadherin durch Snail konnte in zahlreichen weiteren Studien bestätigt werden und darin besteht nach dem heutigen Stand der Forschung seine Hauptfunktion [93], (De Craene *et al.*, 2005).

Die Stilllegung des CDH1-Gens kann jedoch nicht nur durch Transkriptionsfaktoren, sondern auch durch Hypermethylierung erfolgen (Maier, H.J. *et al.*, 2010). Von Burstin *et al.* konnten in ihrem *in-vivo*-Experiment den Nachweis einer E-Cadherin-Repression durch einen Snail/HDAC1/HDAC2-Komplex erbringen und damit eine Verbindung zwischen Snail-vermittelter und epigenetischer E-Cadherin-Hemmung herstellen (Von Burstin *et al.*, 2009). Direkte Mutationen im CDH1-Gen konnten ebenfalls nachgewiesen werden, sind jedoch insgesamt als eher selten anzusehen (Cheng *et al.*, 2001).

Neben seiner repressiven Wirkung auf E-Cadherin konnten im Laufe der Forschung multiple weitere Funktionen von Snail beobachtet werden, die neben hemmenden auch aktivierende Effekte zeigten (Lan *et al.*, 2010). Unter diesen im weiteren Verlauf identifizierten Ziel-Genen fand sich auch eine Gruppe von Proteinen, die als epitheliale oder mesenchymale Marker fungieren und zum Teil durch Snail gehemmt (Desmoplakin) (Cano *et al.*, 2000) oder aktiviert werden (Vimentin, Fibronectin) (Cano *et al.*, 2000).

Die Repression von E-Cadherin verursacht die Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen und damit der Zellstabilität (Gumbiner *et al.*, 1988). Einen synergistischer Effekt dazu ruft Snail durch die Hemmung von Claudin-1, Occludin und ZO-1 hervor, die durch Bildung der tight junctions und Bindung an das Aktin-Zytoskelett maßgeblich zur Zellpolarität und –stabilität beitragen (Itoh *et al.*, 1997). Während E-Cadherin und Occludin durch Hemmung der Transkription supprimiert werden (Ikenouchi *et al.*, 2003), erfolgt die Repression

von ZO-1 und Claudin-1 durch alternatives Splicen in der posttranskriptionellen Phase (Ohkubo e Ozawa, 2004).

Auch eine direkte Veränderungen des Aktinproteins als essentiellen Baustein des Zytoskeletts durch Snail konnte *in vitro* nachgewiesen werden (De Craene *et al.*, 2005).

Des Weiteren konnten *Guaita et al.* zeigen, dass Snail die Aktivität von Zeb1 erhöht und somit wiederum zum Progress der EMT und der Metastasenbildung beiträgt (*Guaita et al.*, 2002).

Ein erst in jüngster Zeit in den Fokus der Forschung gerücktes Ziel-Gen ist der Tumorsuppressor p53 (*Lee et al.*, 2009). *Lee et al.* konnten zeigen, dass Snail eine direkte Hemmung von p53 hervorruft (*Lee et al.*, 2009), vermittelt durch *Kras<sup>mt</sup>* [199]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diese *Kras*-vermittelte Snail-Aktivierung über den ATR-Signalweg erfolgt (*Lee et al.*, 2009). Durch die Bindung von Snail an p53 kann dieses seine Funktion als Tumorsuppressor nicht mehr wahrnehmen, was in einer verminderten Apoptose (Vousden e Prives, 2009), sowie in einer verminderten Degradation von Slug (*Wang et al.*, 2009) resultiert. Da keine verminderte Expression von p53-mRNA detektiert werden konnte, ist eine direkte Komplexbildung von Snail mit p53 zu vermuten (*Lee et al.*, 2009).

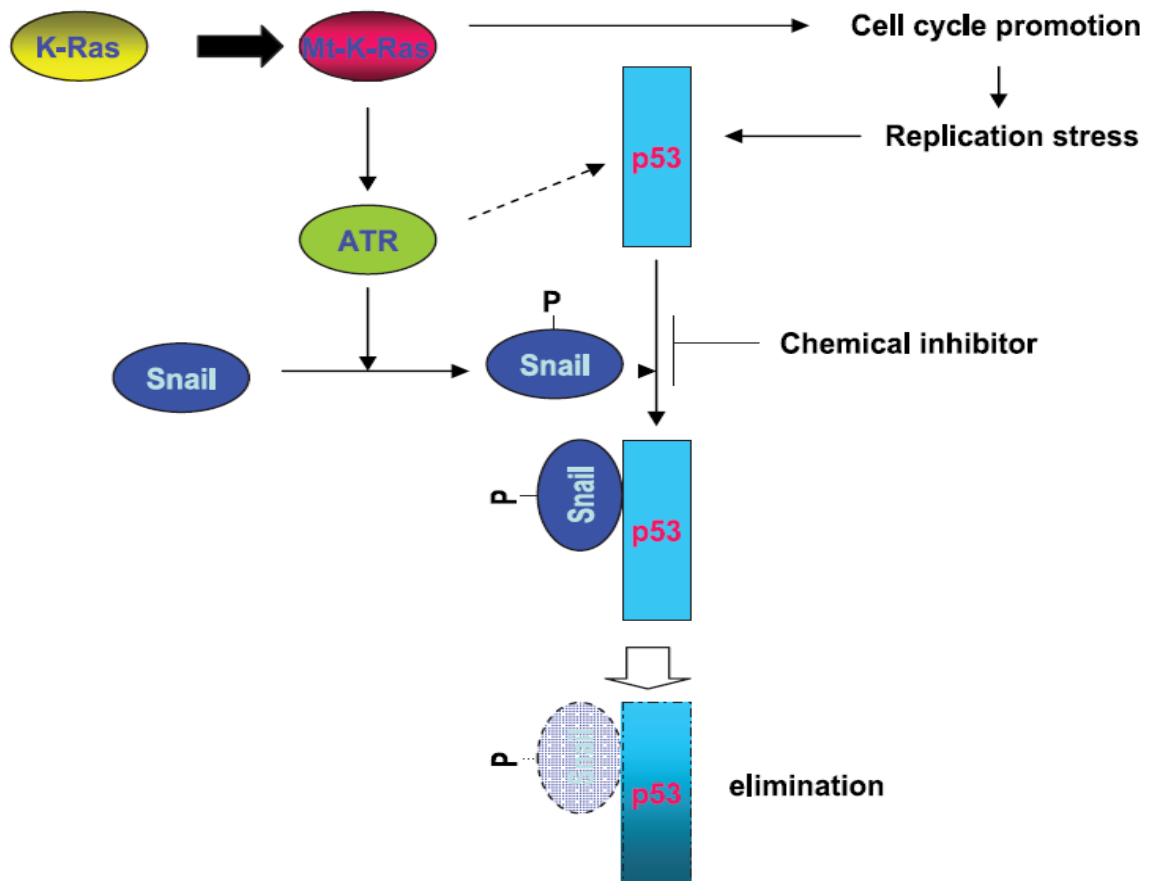


Abb. 5: Die Snail-induzierte Hemmung von p53 in Kras-mutierten Zellen

Wie bereits beschrieben, ist das PDAC durch seine CSC gekennzeichnet, welche maßgeblich zur Chemo-Resistenz und zum Überleben der Tumorzellen beitragen [143]. *Hwang et al.* konnten zeigen, dass Snail essentiell und alleinig dazu in der Lage ist diese Stammzell-Eigenschaften zu vermitteln (*Hwang et al.*, 2011). Auch zuvor konnte bereits die Korrelation einer Snail-Überexpression mit dem Auftreten von CSC in Malignomen beobachtet werden (*Mani et al.*, 2008). In ihrer Studie konnten *Hwang et al.* die Existenz einer Snail-IL8-vermittelten Signalkaskade nachweisen, die durch direkte Bindung von Snail an die E-Box des IL-8-Promotors erfolgt und an deren Ende die Bildung CD44-positiver Zellen steht (*Hwang et al.*, 2011).

Bemerkenswerterweise kann Snail selbst sein eigenes Ziel sein. *Peiró et al.* beobachteten die Bindung von Snail an seinen eigenen Promotor und damit verbunden seine Repression (*Peiro et al.*, 2006). Slug wiederum vermittelt

durch die Bindung an den Snail-Promotor eine Aktivierung von Snail (Sakai *et al.*, 2006).

Insgesamt sind die Snail-vermittelten Signalwege während der Embryogenese und der Malignom-assoziierten EMT außerordentlich zahlreich und ihr Zusammenspiel sehr komplex. Dies kann jedoch nur Anlass sein die Wirkung und den Einfluss dieses essentiellen Bausteins für die Progression von Karzinomen weiter zu untersuchen.

Über die Faktoren wiederum, die zur Aktivierung von Snail führen herrschte lange Zeit Unklarheit und erste Erkenntnisse diesbezüglich wurden erst im Laufe der letzten Jahre gewonnen.

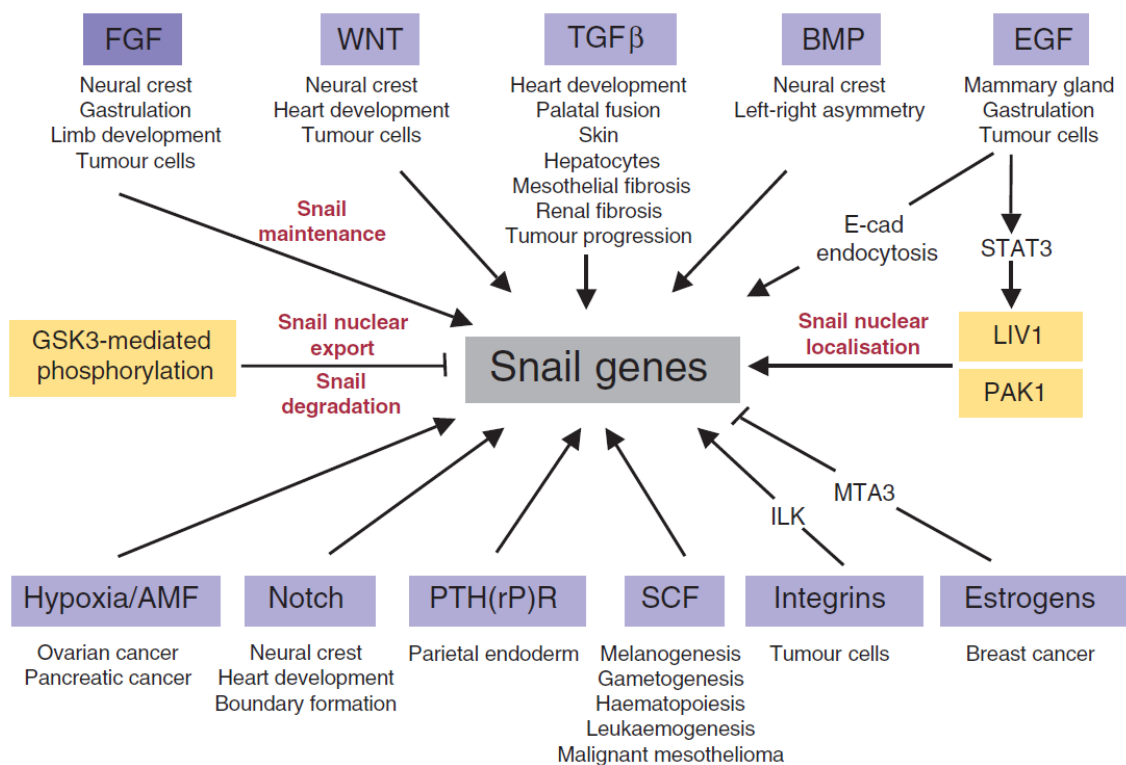


Abb. 6: Die Induktoren und Inhibitoren von Snail



Eine herausragende Bedeutung diesbezüglich spielen die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, welche im Rahmen der Entwicklung multipler Organsysteme eine Aktivierung von Snail verursachen (Valdes *et al.*, 2002). Unter diesen ist TGF- $\beta$  von größter Bedeutung. Seine induktive Wirkung auf die EMT konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits mehrfach gezeigt werden (Janda *et al.*, 2002). Peinado *et al.* konnten in ihrem *in-vitro*-Experiment eine direkte Aktivierung von Snail durch TGF- $\beta$ 1 nachweisen (Peinado *et al.*, 2003). Dabei konnten sie die TGF- $\beta$ 1-vermittelte EMT-Progression durch Induktion von Snail über den MAPK-Signalweg aufzeigen und stellten fest, dass die Kooperation zwischen TGF- $\beta$ 1 und FGF2 ebenfalls zur vermehrten Expression von Snail führt (Peinado *et al.*, 2003).

Das Snail-Protein ist grundsätzlich sehr instabil und seine Regulation erfolgt durch Ser/Thr-Phosphorylierung (Zhou *et al.*, 2004) und Lys-Oxidation (Peinado *et al.*, 2005).

Bei der Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  wird Snail aus dem Nukleus exportiert und daraufhin durch Proteasomen abgebaut (Zhou *et al.*, 2004). Durch Hemmung der GSK-3 $\beta$ -Aktivität reichert sich Snail im Zellkern an und kann als Transkriptionsfaktor agieren (Bachelder *et al.*, 2005). Hieran beteiligt sind mehrere Signalwege, die die Hemmung von GSK-3 $\beta$  bewirken. Dazu zählt der Wnt-Signalweg (Rao e Kuhl, 2010), der Hedgehog-Signalweg (Hao *et al.*, 2013) und der Snail-Signalweg selbst, der durch verschiedene Wachstumsfaktoren induziert werden kann (Zhou e Hung, 2005). Im Rahmen des Wnt-Signalwegs akkumuliert zudem  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und wird ebenfalls in den Nukleus transportiert (Kim *et al.*, 2002), wo es selbst als Aktivator für Wnt fungiert.

Im Gegensatz dazu bewirkt die PAK1-vermittelte Phosphorylierung von Snail seine Translokation in den Nukleus und fördert somit seine transkriptionelle Aktivität (Yang *et al.*, 2005).

Wie bereits beschrieben spielt auch das den Tumor umgebende Stroma eine entscheidende Rolle bei der Invasion und Metastasierung und eines der Charakteristika des Pankreaskarzinoms ist sein Kollagen-I-reiches Stroma (Hezel *et al.*, 2006). Obgleich Kollagen-I grundsätzlich als Barriere gegen eine Invasion betrachtet werden kann, konnte in mehreren Studien eine Assoziation mit einem hohen Metastasierungspotential und einer schlechten Prognose

nachgewiesen werden (Ramaswamy *et al.*, 2003). Shields *et al.* konnten eine Aktivierung von Snail durch Kollagen-I im 3D-Matrix-Modell nachweisen, welche durch den TGF- $\beta$ /Smad3-Signalweg vermittelt wird (Shields *et al.*, 2011). Das somit aktivierte Snail im Stroma führt zu einem Progress der Invasion und des Tumorwachstums durch die Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Membran-Typ-1-MMP (MT1-MMP) (Shields *et al.*, 2011).

Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle von Snail in der Mikroumwelt des Pankreaskarzinoms, deren Regulation auch durch den Hedgehog-Signalweg stark beeinflusst wird (Katoh e Katoh, 2009).

Auch die Hypoxie stellt einen wichtigen Trigger für Tumorprogression und Metastasierung (Lu e Kang, 2010) dar und ist ein spezifisches Merkmal des PDAC (Harris, 2002). Vermittelt wird diese meist durch die Aktivierung von HIF- $\alpha$ 1 (Majmundar *et al.*, 2010), der wiederum zur Aktivierung sowohl von Snail als auch von Slug führt (Yang e Wu, 2008).

Neben den genannten konnten mittlerweile multiple weitere Faktoren identifiziert werden, die an der Aktivierung von Snail beteiligt sind, wie FGF, EGF, Notch, PTHrP, Integrine (Barrallo-Gimeno e Nieto, 2005) und SOX2 (Herreros-Villanueva *et al.*, 2013).

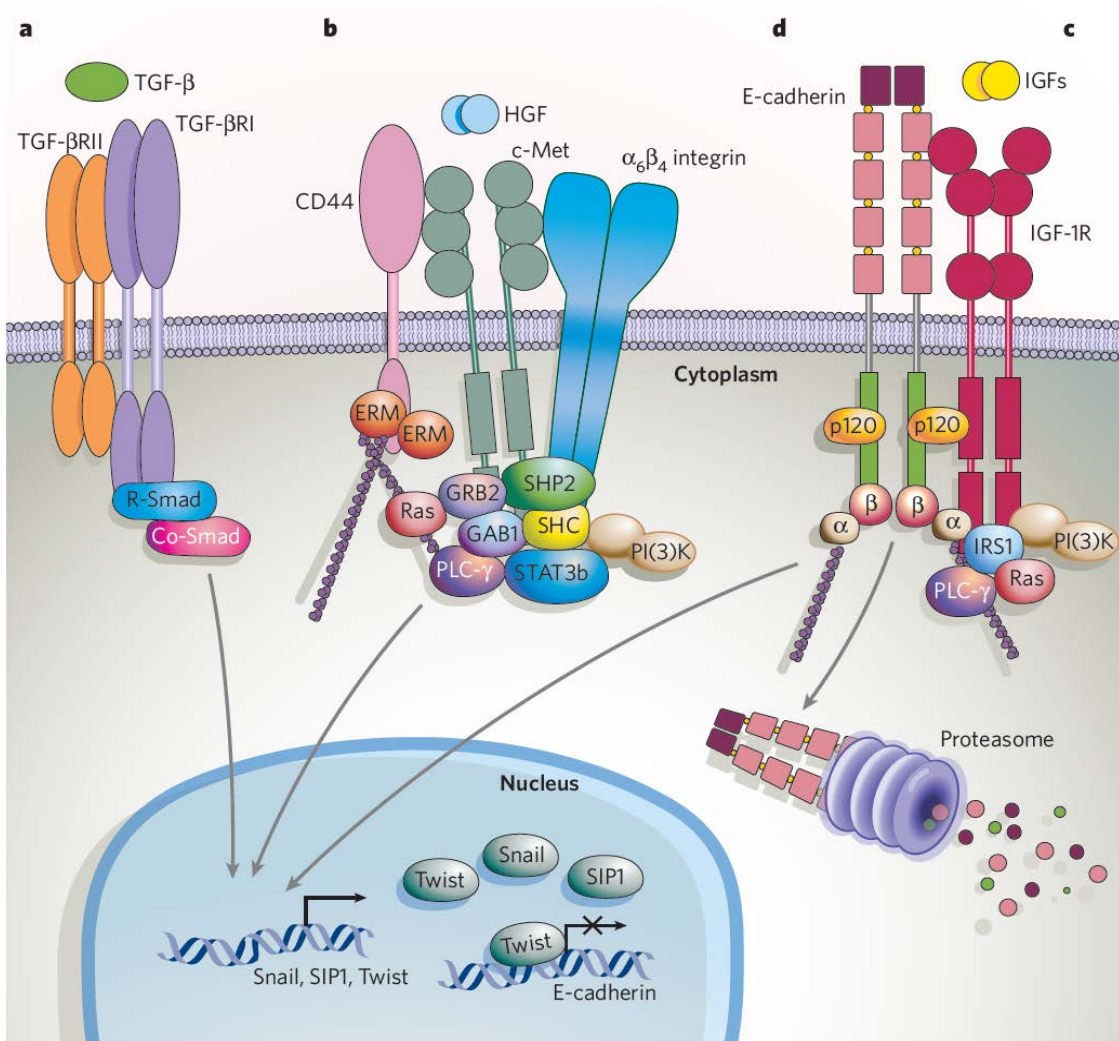


Abb. 7: Signalwege zur Aktivierung von Snail

Aus diesem komplexen Netzwerk aus Induktoren, Effektoren und Regulatoren ergibt sich die herausragende Funktion von Snail besonders im Pankreaskarzinom [93], aber auch in vielen anderen Karzinomen. Die Aktivierung von Snail setzt multiple Signalkaskaden in Gang, die eine massive Förderung von Tumorprogression, Invasion und Bildung distanter Metastasen sowie Cancer stem cells verursachen (Hotz *et al.*, 2007). Dies führt zur Ausbildung stark entdifferenzierter Zellen (Hotz *et al.*, 2007) und der charakteristischen Resistenz gegenüber Chemotherapie und Radiatio (Yin *et al.*, 2007).

## 2.4 Die Inhibitoren

Aufgrund dieser bestehenden Chemo-Resistenz des PDAC und aktuell fehlender effektiver Therapien ist die Erforschung neuer Wirkstoffe von essentieller Bedeutung. Sowohl für PEG als auch für GN25 konnte bereits eine chemopräventive Wirkung nachgewiesen werden, so dass sie vielversprechende Wirkstoffe darstellen.

### 2.4.1 GN25

Im Jahr 2010 führten *Lee et al.* eine Suche zur Identifikation kleiner chemischer Inhibitoren durch und es gelang ihnen die Synthese des Inhibitors GN25, welcher spezifisch die Bindung von Snail an p53 in Kras-mutierten Zellen verhindert (*Lee et al.*, 2010). Weiterhin konnten sie zeigen, dass durch die Inkubation von Karzinomzellen mit GN25 eine Reaktivierung von p53<sup>WT</sup> stattfindet und damit der negativ-dominante Effekt überwunden werden kann (*Lee et al.*, 2010), welcher die Maskierung von p53<sup>WT</sup> durch das p53<sup>MT</sup>-Allel in heterozygot mutierten Zellen beschreibt (Weinberg, 2006).

Interessant hierbei war auch, dass der Inhibitor auf normale Zellen bzw. Zellen mit Kras<sup>WT</sup>-Status keine zytotoxische Wirkung ausübte (*Lee et al.*, 2010).

Diese Ergebnisse lassen auf eine wirkungsvolle Therapieoption gegen das PDAC schließen, in dem Snail eine Schlüsselrolle in der Ausbreitung und Metastasierung hat. Weiterführende Studien diesbezüglich fehlen jedoch bisher, so dass die weitere Untersuchung der Wirkung von GN25 auf Zellen des duktales Pankreaskarzinoms Gegenstand dieser Arbeit ist.

### 2.4.2 PEG

Polyethylenglykol besteht aus einem Bestandteil pflanzlicher Zellwände und wird hauptsächlich zur Behandlung chronischer Obstipation verwendet. Aufgrund seiner rein pflanzlichen Herkunft hat PEG kaum Nebenwirkung oder zytotoxische Eigenschaften.

Einige Studien konnten neben der bekannten laxativen Wirkung auch einen chemopräventiven Effekt feststellen (Corpet e Tache, 2002), der jedoch bisher ausschließlich für das Kolonkarzinom untersucht wurde (Dorval *et al.*, 2006).

In ihren *in vitro*-Untersuchungen konnten Roy *et al.* erstmals Signalwege identifizieren, durch die PEG seine Wirkung entfaltet. Neben der vermehrten Re-Expression von E-Cadherin konnten sie auch eine signifikante Inhibition von Snail durch die Anwendung von PEG nachweisen (Roy *et al.*, 2006).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchten Wali *et al.* die weiterführenden Wirkmechanismen. Sie konnten zeigen, dass die Behandlung von Kolonkarzinom-Zellen mit PEG zu einer EGFR-vermittelten Inhibition von Snail führt (Wali *et al.*, 2008). Aufgrund seiner Größe ist PEG nicht fähig, durch die Zellwand zu diffundieren und seine Wirkungsweise war daher lange unklar. Durch die Bindung an EGFR kann PEG eine Signalkaskade induzieren und somit indirekt die Inhibition von Snail bewirken (Wali *et al.*, 2008).

Seine geringen Nebenwirkungen und hohe Verfügbarkeit machen PEG zu einem sehr attraktiven Wirkstoff zur Therapie von Malignomen.

Ob jedoch neben der chemopräventiven auch eine chemotherapeutische Wirkung von PEG auf Karzinomzellen besteht ist bisher nicht untersucht.

Da bisher jedoch keinerlei Untersuchungen zur karzinoziden Wirkung von PEG auf das PDAC existieren, war dies das zweite Ziel dieser Arbeit.

### 3 Zielsetzung

In Zusammenschau der oben beschriebenen Eigenschaften des duktales Adenokarzinoms des Pankreas ergibt sich die Problematik einer effektiven Therapie. Trotz multipler neuer Therapieansätze konnte seine Prognose in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert werden und das PDAC ist mittlerweile die vierthäufigste durch Malignome verursachte Todesursache. Dies macht deutlich wie wichtig die Erforschung neuer Therapieansätze ist.

Ziel dieser Arbeit war die Testung neuer Inhibitoren des Transkriptionsfaktors Snail auf das Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms *in vitro*. Hierzu wurden nach Austestung der benötigten Zellzahlen, die Zelllinien Suit2-007 und Suit2-028 mit den Inhibitoren PEG und GN25 in aufsteigenden Konzentrationen und über verschiedene Zeiträume inkubiert.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Auflistung Material und Methoden

#### 4.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Destillierungsanlage	Sartorius biotech	S/N 13700043
Drainagesauger Medap	Arbor Tech	51500
Elektrische Pipette accu-jet pro	Brand	10 B 6894
Inkubationsschrank CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus	
Magnetrührer	Heidolph	50310
Mastercycler S1 vapo.protect	Eppendorf	6325XQ200983
Mikroskop Labor Lux S	Leitz	20-505.030
Mikroskop TMS	Nikon	302052
Photometer Precision Microplate Reader	Molecular Devices	E10643
Rüttler MS1 Minishaker	IKA	03.004017
Sterilbank Hera Safe	Heraeus	HS 12
Waage Explorer	Heraeus	490203
Zentrifuge Minifuge T	Heraeus	

#### 4.1.2 Glas- und Plastikware

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Eppendorf Cups 1,5ml	Sarstedt	72.706
Falcon Tube 15ml	Sarstedt	62.554.512
Falcon Tube 50ml	Sarstedt	62.547.254
Neubauer Zählkammer	Sarstedt	
Kanülen Microlance 22G	Braun	300900
Pipettenspitzen Eppendorf Reference (0,1µ-2,5µ, 0,5µ-10µ, 10µ-100µ, 50µ-200µ, 100µ-1000µ)	Eppendorf	
Pipettenspitzen Tipone (0,1µ-10µ, 1µ-100µ, 1µ-155µ)	Star Lab	
Serological Pipette (2ml, 5ml, 10ml, 30ml)	Sarstedt	86.1253.001

Spritzen Inject 1ml	Braun	
Sterilfilter Millex-GS	Millipore	SLGS 025 OS
Tissue Culture Flask (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt	83.1813.002
96-well, TissueCulture Plate	Sarstedt	1.83.1835

#### 4.1.3 Chemikalien und Medien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Bovine fetal serum	Biochrome AG	S 0615
Cryosure DMSO >99,9%	WAK-Chemie Medical	WAK-DMSO-10
DMEM	PAA laboratories GmbH	
Dulbecco`s PBS	PAA laboratories GmbH	H15-002
GN25		
HCl 10N	Roth	0710
Isopropanol	Sigma Aldrich	33539-2,5L-R
Mykoplasmen-Kit	Qiagen viral mini kit	
PEG 3350	Sigma Aldrich Life Science	83276-250G-F
Penicillin/Streptomycin	PAA laboratories	P11-010
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	Qiagen	52904
RPMI + L-Glutamine 500ml	PAA laboratories GmbH	E15-840
Sodium Dodecyl-Sulfat >99 %	Roth	2326.2
Thiazolyl-Blue Tetrazolium Bromide	Sigma Aldrich	M5655-G
Trypanblau		
Trypsin0,05%/EDTA0,02%-Solution	Biochrome AG	L 2143

#### 4.1.4 Rezepturen selbst hergestellter Lösunge

##### MTT-Lösung:

1 mg Thiazolyl-Blue Tetrazolium Bromide auf 1ml Dulbecco`s PBS

##### Stop-Lösung / 100 ml:

85 ml Isopropanol

15 ml SDS (20%)

0,4 ml 10N HCl



## **4.2 Zelllinien**

Die Zelllinie SUIT-2 stammt ursprünglich aus der Lebermetastase eines japanischen Patienten, der an einem Pankreaskarzinom erkrankt war. Aus der originären Zelllinie erfolgte die Herstellung von 28 Subzelllinien, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden (Iwamura *et al.*, 1987).

Die Subzelllinie SUIT2-007 zeigt ein stark entdifferenziertes Wachstum vergesellschaftet mit einem hohen Metastasierungspotential, wohingegen SUIT2-028 eine gut differenzierte Zelllinie mit geringem Metastasierungspotential darstellt (Taniguchi *et al.*, 1992).

Beide sind aufgrund ihrer verhältnismäßig einfachen Kultivierung sowie ihrer unterschiedlichen Charakteristika häufig verwendete Zelllinien für die Erforschung neuer Therapieansätze beim Pankreaskarzinom (Iwamura *et al.*, 1997).

### **4.2.1 Zellen lagern und auftauen**

Die Zellen der Zelllinien Suit-2/007 und Suit-2/028 wurden bei -180 °C im Stickstofftank gelagert. Unter entsprechenden Schutzmaßnahmen wurden diese aus ihren Behältern entnommen und bei Raumtemperatur oder im lauwarmen Wasserbad aufgetaut. Danach erfolgte das Zusetzen von 10 ml Medium tropfenweise und das Zentrifugieren bei 1000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 30 ml 10%igem FCS-Medium überführt.

### **4.2.2 Zellinkubation und Zellwachstum**

Die Zellinkubation und das Wachstum erfolgte bei standardisierten Bedingungen im Inkubationsschrank, in dem eine 5%ige Konzentration an CO<sub>2</sub> sowie eine Temperatur von 37 °C herrscht. Eine erhöhte Luftfeuchtigkeit wurde durch ein Wasserbad erreicht, welches in regelmäßigen Abständen gesäubert

und neu befüllt wurde und in welchem sich ein Kupferstab zur Keimreduktion befand.

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 30 ml 10%igem FCS-Medium kultiviert. Die Flaschen waren mit einem luftdurchlässigen und keimundurchlässigen Deckel ausgestattet. Das Medium bestand aus RPMI-Medium, welches mit 50ml fetalem Kälberserum (10%ig) und 10ml einer Antibiotika-Mischung aus Penicillin und Streptomycin (2%ig) versetzt wurde. Die Flaschen wurden im Inkubationsschrank bei o. g. Bedingungen gelagert und inkubiert.

#### **4.2.3 Mykoplasmen-PCR**

Nach dem Auftauen der Zelllinien und bevor weitere Anzuchtungen oder Inkubationen durchgeführt werden erfolgte zunächst die Testung auf Verunreinigung durch Mykoplasmen mittels PCR. Hierzu wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit verwendet und nach dessen Protokoll verfahren. Nach Ausschluss einer Verunreinigung konnten u. g. Untersuchungen durchgeführt werden.

#### **4.2.4 Zellbeurteilung**

Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage. Die Beurteilung wann eine Passagierung notwendig war erfolgte durch Inspektion der Zellen unter dem Lichtmikroskop, wobei sowohl die Zelldichte als auch die Morphologie der Zellen beurteilt wurden. Zudem wurde anhand des Farbumschlags des Mediums der Säuregehalt abgeschätzt.

Als Vorbereitung auf die eigentliche Arbeit wurden die Zellen zunächst sowohl mit RPMI als auch mit DMEM inkubiert, um etwaige Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen bei unterschiedlichem Medium zu detektieren. Die mit RPMI inkubierten Zellen zeigten ein homogeneres Wachstumsmuster und eine gleichmäßigere Morphologie, so dass die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit RPMI durchgeführt wurden.

Die Passagierung erfolgte entsprechend dem Wachstumsverhalten der Zelllinien in einem Verhältnis 1:10.

#### **4.2.5 Passagieren der Zellen**

Die benötigten Reagenzien lagerten bei +8°C und wurden etwa eine Stunde vor dem Passagieren der Zellen aus dem Kühlschrank entnommen, um keine kälteinduzierte Toxizität auf die Zellen wirken zu lassen. Das Passagieren der Zelllinien erfolgte unter der Sterilbank mit integrierter Abluft, die ebenfalls einige Minuten vor dem Passagieren angeschaltet wurde; auch die verwendeten Materialien waren steril verpackt.

Zunächst erfolgte das Absaugen und Verwerfen des alten Mediums mit dem Drainagesauger, wobei darauf geachtet wurde den Zellrasen nicht zu beschädigen. Daraufhin folgte das Spülen des Zellrasens mit 10ml PBS-Lösung zur Entfernung eventuell zurück gebliebener Mediumreste und das Absaugen des PBS. Danach wurden ca. 3ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Flasche hinzugegeben, um den Zellrasen vom Flaschenboden zu lysieren. Dazu wurden die Flaschen erneut in den Inkubatorschrank gelegt. Nach spätestens 10 Minuten war der Vorgang abgeschlossen und die Zellen waren komplett gelöst. Als nächstes wurde die Flasche mit 10ml PBS gespült um alle Zellen von den Flaschewänden zu spülen. Die entstandene Suspension aus Zellen, Trypsin/EDTA-Lösung und PBS wurde nun abpipettiert und in ein 50ml-Falconröhrchen überführt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation im Minifuge T für 5 Minuten bei 1000 rpm, wobei sich die Zellen in einem Pellet am Boden des Röhrchens verdichteten. Der Überstand aus Lösungsmitteln wurde nun abgesaugt und verworfen.

Anschließend erfolgte durch auf- und abpipettieren das Resuspendieren des Zell-Pellets mit 3ml RPMI-Medium zur Herstellung einer homogenen Suspension.

Anschließend erfolgte das Befüllen der Kulturflaschen mit 30ml frischem Medium und das Verteilen der Zellen im Verhältnis 1:10.

Abschließend erfolgte nach jeder Passagierung die Kontrolle der Zellen unter dem Lichtmikroskop zur Beurteilung von Vitalität, Morphologie und homogener Verteilung.

### 4.3 Der MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein seit 30 Jahren bekanntes und noch immer häufig angewandtes Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Zellvitalität. Entwickelt und erstmals beschrieben wurde es vom *Tim Mosmann* (California, USA) im Jahre 1983 im *Journal of Immunological Methods* (Mosmann, 1983).

Das Prinzip des Assays beruht auf einer Reduktion des Substrats und anschließender kolorimetrischer Messung der Zellen mit dem Photometer. Die Ausgangsform des Substrats MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) liegt zunächst als wasserlösliches, hellgelbes Pulver vor, das in PBS gelöst wird. Nach Beimpfung der Zellen mit dieser Lösung wird das Substrat zu einem wasserunlöslichen Formazan-Salz reduziert. Im Zuge dieser Reaktion schlägt die Farbe des MTT von hellgelb zu dunkellila um und das Produkt fällt aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit als Salz aus. Durch Zugabe von Isopropanol können diese Salze wieder gelöst werden und es entsteht eine homogene, dunkellila-farbene Lösung (Berridge, 1996).

Diese Lösung kann nun durch kolorimetrische Verfahren in ihrer Intensität gemessen werden. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme eines Photometers (ELISA-Reader) mit dem die optische Dichte bei einer optimalen Wellenlänge und einer Referenz-Wellenlänge gemessen wird.

Schon *Mosmann* selbst konnte zeigen, dass die Absorption direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist und bereits sehr kleine Zellzahlen detektiert werden können. Des Weiteren konnte er nachweisen, dass nur lebende Zellen mit einem funktionierenden Metabolismus in der Lage sind die Reaktion durchzuführen und dass abhängig von der Intensität des Zellmetabolismus auch die Intensität der Reaktion differierte (Mosmann, 1983). Dies resultiert aus der Tatsache, dass das MTT, welches nicht Zellmembran-permeabel ist, über

Endozytose aufgenommen und das entstehende Formazan nach erfolgter Reaktion durch Exozytose auf der Zelloberfläche präsentiert werden muss (Mosmann, 1983), (Carmichael *et al.*, 1987).

Die großen Vorteile des MTT-Assay liegen neben seiner schnellen Durchführbarkeit in der fehlenden Verwendung radioaktiver Stoffe. Des Weiteren zeigt der Test eine hohe Präzision der Ergebnisse und durch das Fehlen aufwändiger Zwischenschritte oder Waschschriffe können Fehlerquellen auf ein Minimum reduziert werden (Carmichael *et al.*, 1987).

Bis heute wird der MTT-Assay häufig als ein einfaches, schnelles und verlässliches Testverfahren zur Messung von Proliferationen angewendet (Sylvester, 2011).

## **4.4 Proliferation**

### **4.4.1 Ermittlung der benötigten Zellzahlen**

Vor Beginn der eigentlichen Arbeit erfolgte zunächst eine Proliferation mit unbehandelten Zellen in verschiedenen Konzentrationen zur Austestung der benötigten Zellzahlen. Hierbei zeigte sich ein optimales Wachstumsverhalten bei einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well. Bei diesen Konzentrationen zeigten die Zellen ein suffizientes und gleichmäßiges Wachstumsverhalten; bei höheren Konzentrationen war das Zellwachstum durch den Mangel an Platz und Medium gehemmt.

### **4.4.2 Ansetzen der Proliferation**

Der Ansatz für die Proliferation erfolgte 24 Stunden vor der geplanten Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren. Hierzu wurde die benötigte Zellzahl zur Inkubation der well-plates durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Hierzu wurden die Zellen zunächst abgelöst, zentrifugiert und mit neuem Medium resuspendiert wie oben beschrieben. Zudem erfolgte die Herstellung einer Lösung aus 100 µl Trypanblau und 800 µl PBS. Die Zellsuspension wurde nun 1:10 mit der Trypanblau/PBS-Lösung verdünnt und in einen Eppendorf-Cup überführt.

Daraufhin wurde die Neubauer-Zählkammer vorbereitet. Die Stege der Kammer wurden leicht angefeuchtet und das Deckglas fest angedrückt bis die Regenbogen-artigen Newton-Ringe als Zeichen der Haftung entstanden.

Nun wurden ca. 80µl der Zellsuspension in die Kammer pipettiert und die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 10 ausgezählt.

Jedes der 4 Quadrate (L) wurde ausgezählt und der Mittelwert daraus berechnet. Dabei wurde darauf geachtet dass die Verteilung der Zellen in den 4 Quadraten annähernd gleich war, d.h. eine homogene Verteilung der Zellen vorlag, um ein repräsentatives Ergebnis für die gesamte Zellsuspension zu erhalten.

Gezählt wurden nur die vitalen Zellen, was durch den vorherigen Zusatz von Trypanblau gewährleistet wurde. Dieser Farbstoff kann nur tote Zellen, deren Membran nicht mehr intakt ist, anfärben. Die vitalen Zellen zeigen keinerlei Farbveränderung und können so gut von den avitalen Zellen unterschieden werden.

Anschließend erfolgte anhand des errechneten Mittelwerts der Zellen in der Neubauer-Zählkammer die Ermittlung der Zellzahl pro ml Zellsuspension mit Hilfe folgender Formel:

$$\rightarrow L_{\text{Mittelwert}} \times \text{Vorverd\u00fcnnung} (=10) \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

( $10^4$  steht hierbei f\u00fcr einen konstanten Faktor, der sich aus der Gr\u00f6\u00dfe der Z\u00e4hlkammer ergibt)

Daraufhin erfolgte die Verd\u00fcnnung der L\u00f6sung auf die ben\u00f6tigte Zellkonzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen und jedes Well wurde mit 200 µl befüllt, wobei die \u00e4u\u00dfersten Wells frei gelassen wurden. Daraufhin erfolgte die erneute Lagerung der Platten im Inkubatorschrank.

24 Stunden nach dem Ansetzen der Proliferation erfolgte die Beimpfung der Zellen mit den Inhibitoren.

GN25 liegt als oranges Pulver vor, welches lichtgeschützt im Eisschrank gelagert werden muss. Die Lösung des Pulvers erfolgte in DMSO (>99,9%). Unter Kenntnis des Molekulargewichts von 322,33 konnte eine Stock-Lösung mit einer Konzentration von 10mM angelegt werden. Je nach benötigter Konzentration erfolgt nun die Verdünnung mit 2%igem FCS-Medium und das Befüllen der Wells.

PEG 3350 liegt als weißes Pulver vor, das lichtgeschützt und trocken gelagert werden muss. Das Auflösen erfolgte in 2%igem FCS-Medium und es wurden eine 5%ige und 10%ige Lösung hergestellt. Diese Dosierungen wurden analog der Untersuchung von Wali et al. in 2008 gewählt.

Bevor die Zellen mit den Lösungen beimpft wurden, wurden diese mit Hilfe eines Sterilfilters gereinigt.

Letztendlich erfolgte die Beimpfung der Zellen mit den beiden Inhibitoren in aufsteigenden Konzentrationen nach unten gezeigtem Schema und die Well-Plates wurden hiernach weiter im Inkubatorschrank bebrütet.

Die verschiedenen Platten wurden nach 24, 72 und 144 Stunden ausgewertet. Bei den Platten die für 144 Stunden inkubiert wurden, fand nach 72 Stunden ein Mediumwechsel statt. Hierzu erfolgte nach dem Abpipettieren des überstehendes Mediums ohne Beschädigung des Zellrasens eine erneute Beimpfung der Zellen mit den Inhibitoren in gleicher Konzentration.

#### **4.4.3 Auswertung und MTT-Assay**

Nach dem jeweiligen Erreichen der geplanten Inkubationsdauer erfolgte zunächst das Abpipettieren des Mediums aus den Wells. Auch hier wurde erneut penibel darauf geachtet, den Zellrasen nicht zu beschädigen. Danach wurden pro Well 100 µl der MTT-Lösung hinzu gegeben und die Platte erneut für 4 Stunden in den Inkubatorschrank gelegt. Nach 4 Stunden folgte das Abpipettieren der MTT-Lösung und das Hinzugeben von 150 µl Stopp-Lösung. Hierdurch wurde neben dem Abbruch der Reaktion auch die Lösung der Formazankristalle erreicht. Nach weiteren 30 Minuten Wartezeit erfolgte das letzte Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren der Lösung.

Abschließend wurden die Well-Plates in das Photometer eingelegt und bei einer Wellenlänge von 570 und 630 nm ausgelesen.

Der beschriebene Versuchsablauf wurde in exakt gleicher Vorgehensweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten 3 Mal wiederholt und die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen wurden zur Erhöhung der Validität gemittelt.

Mithilfe von Excel erfolgte die Zusammenfassung der Werte in Tabellen und das Erstellen der Grafiken.

#### **4.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung zur Ermittlung der Signifikanz erfolgte mittels Student-T-Test.



## **5 Ergebnisse**

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung und Verifizierung einer wachstumshemmenden Wirkung der Inhibitoren PEG und GN25 auf Zelllinien des Pankreaskarzinoms. Hierfür wurden die Sublinien SUIT2-007 und SUIT2-028 der Zelllinie Suit-2 verwendet, die ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich Tumorwachstum und Metastasierungspotential haben.

Nach Beimpfung der Zellen mit PEG und GN25 in aufsteigenden Konzentrationen erfolgte die Auswertung nach verschiedenen Inkubationszeiträumen mittels MTT-Assay im Photometer. Das hierbei gemessene Signal korreliert direkt mit der Anzahl der vitalen Zellaktivität, worauf sich indirekt Rückschlüsse auf Zellzahl und Zellvitalität ziehen lassen.

### **5.1 GN25 inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

Die Bearbeitung der Zelllinien erfolgte durch Inkubation mit GN25 in well-plates. In der ersten Spalte wurde als Negativkontrolle der Nährlösung 10%iges FCS aufgetragen. In der zweiten Spalte wurde als Negativkontrolle des Lösungsmittels von GN25 DMSO aufgetragen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie zuvor festgelegt nach 24, 72 und 144 Stunden. Dabei wurde bei der Versuchsplanung ein Zeitplan erstellt, zu welchen Zeitpunkten eine Auswertung erfolgen sollte. Die Zeitpunkte von 24, 72 und 144 Stunden wurden in Anlehnung an die gängige Laborpraxis zur Testung von Agenzien an Zellen festgelegt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen.

### 5.1.1 GN25 in SUI2-007

Begonnen wurde zunächst mit der Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich eines möglichen Effekts auf das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Die erste Auswertung der Zelllinie SUI2-007 nach Inkubation mit GN25 erfolgte nach 24 Stunden. Hierbei zeigten alle Zellgruppen, unabhängig von Nährmedium oder beimpfter Dosis, niedrige Wachstumsraten mit relativ gleichmäßiger Verteilung. Darauf begründet zeigten sich innerhalb dieses Zeitraums nur sehr kleine Abstufungen zwischen den einzelnen Zellgruppen.

So ergab sowohl der Vergleich der Negativkontrollen untereinander als auch der Vergleich mit den GN25-beimpften Zellgruppen nur geringfügige, statistisch nicht signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Auch die Ergebnisse des Vergleichs der einzelnen Inkubationsdosen untereinander zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf Zellwachstum bzw. Zellvitalität.

Insgesamt zeigten die Mittelwerte jedoch eine homogene Verteilung mit niedriger Standardabweichung.

Die Messung der Zell-Proliferation nach 72 Stunden Inkubationszeit hingegen zeigte einen deutlichen Einfluss des Inhibitors auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24 Stunden konnten hier signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten unterschiedlicher Zellgruppen festgestellt werden. Während sich die Zellzahlen der zwei Negativkontrollen weiterhin ähnlich verhielten, ließen sich im Vergleich zu den beimpften Zellgruppen deutliche Unterschiede beobachten. So ließ sich ab einer Konzentration von  $4 \mu\text{M}$  über 72 Stunden eine signifikante Hemmung der Proliferation nachweisen ( $p < 0,05$ ).

Mit steigender Dosis zeigte sich eine zunehmende Hemmung des Zellwachstums, was im Dosisbereich von  $8 \mu\text{g}$  und  $10 \mu\text{g}$  hoch signifikant war ( $p < 0,01$ ).

Eine ähnliche Inhibition der Zellproliferation konnte auch anhand der Ergebnisse nach 144 Stunden Inkubation bestätigt werden. Neben dem ähnlichen Wachstumsverhalten der zwei Kontrollgruppen selbst, bestand im Vergleich mit den Therapiegruppen eine deutliche Hemmung des

Zellwachstums bzw. der Zellvitalität der beimpften Zellen. Allerdings konnte im Gegensatz zur 72-Stunden-Inkubation eine statistisch signifikante Hemmung erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ).

### **5.1.2 GN25 in SUIT-028**

Die gemessene Wirkung des Inhibitors GN25 auf die Zelllinie SUIT2-028 waren vergleichbare Ergebnisse mit denen der Zelllinie SUIT2-007.

Auch hier konnte nach einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden nur ein insgesamt geringes Zellwachstum beobachtet werden. Weder innerhalb der Kontrollgruppen noch der beimpften Zellgruppen konnte eine statistisch relevante Wachstumshemmung nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

Nach Inkubation der Zelllinie über 72 Stunden konnte jedoch auch hier eine hoch signifikante Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden, so dass der Vergleich der Negativkontrollen mit den behandelten Zellgruppen einen messbaren Unterschied in der Zellproliferation erbrachte. Signifikant war dieser ab einer Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ).

Die Messungen nach 144 Stunden Inkubationszeit bestätigten diese Ergebnisse und zeigten eine hoch signifikante Inhibition der Zellproliferation ab einer Dosis von 6  $\mu\text{M}$  und aufsteigend ( $p < 0,005$ ).

## **5.2 GN25 inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Dosis**

Die Bearbeitung der Zelllinien erfolgte durch Inkubation mit GN25 in well-plates. In der ersten Spalte wurde als Negativkontrolle der Nährlösung 10%iges FCS aufgetragen. In der zweiten Spalte wurde als Negativkontrolle des Lösungsmittels von GN25 DMSO aufgetragen. Die Inkubation der Zelllinien mit GN25 erfolgte in den Konzentrationen 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ .

Diese Verteilung kann ebenfalls in grafischer Form den unten stehenden Grafiken entnommen werden.

### 5.2.1 GN25 in SUIT-2/007

Nach Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich der Zeitabhängigkeit folgte im Weiteren die Auswertung einer möglichen Dosis-abhängigen Wirkung von GN25 auf die Zelllinie SUIT2-007. Die hierbei gewählten Dosierungen wurden abgeleitet aus einer Untersuchung von Lee et al., die ebenfalls den inhibitorischen Effekt von GN25 auf Pankreaskarzinomzellen untersuchten (Lee et al., 2010).

Zunächst erfolgte der Vergleich der zwei Negativkontrollen FCS und DMSO. Aufgrund der Tatsache, dass FCS zum einen die grundsätzliche Nährlösung für die Karzinomzellen darstellt, DMSO jedoch andererseits die zur Lösung von GN25 benötigte Substanz ist, erfolgte jeder Ansatz mit beiden Lösungen als Kontrolle zur Prophylaxe einer möglichen systematischen Fehlerquelle. Im Vergleich der zwei Negativkontrollen untereinander ergaben sich nur geringe Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Zellvitalität. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied berechnet werden, so dass vergleichbare Nährmedium-Eigenschaften beider Substanzen zu vermuten sind.

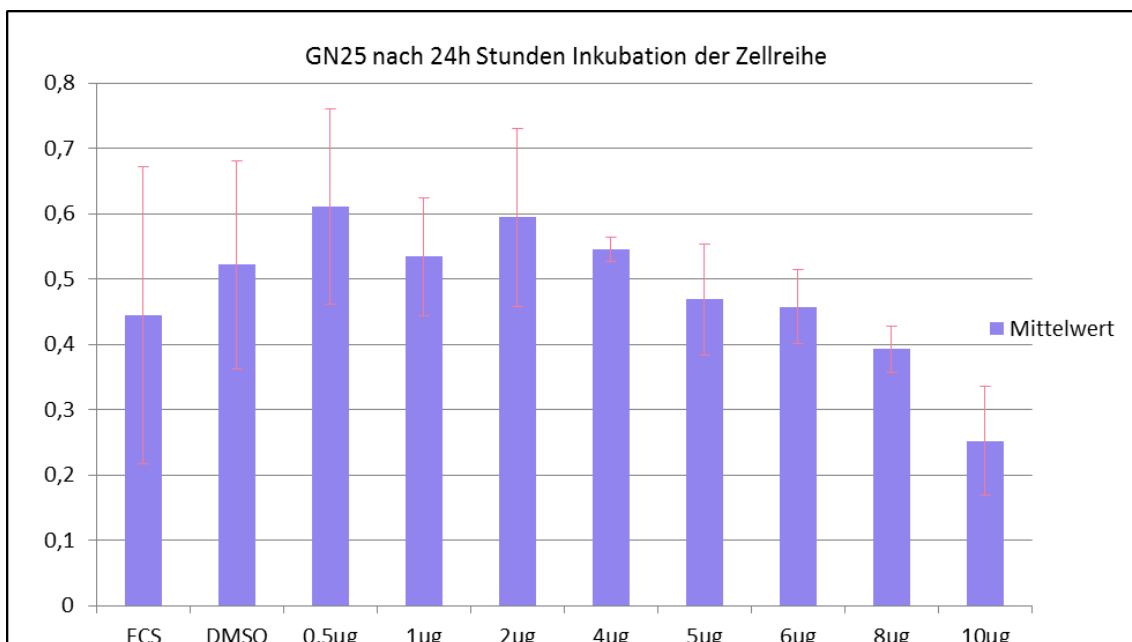
Im Weiteren erfolgte der Vergleich der Ergebnisse im Niedrig-Dosisbereich bei Konzentrationen von 0,5 – 2  $\mu\text{M}$  untereinander. Auch hier zeigten sich kaum Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Zellen. Die Messung der Zellvitalität innerhalb dieser Gruppe ergab annähernd gleiche Ergebnisse für alle Konzentrationen, so dass hier keine statistisch signifikante dosis-abhängige Veränderung des Wachstumsverhalten beobachtet werden konnte ( $p > 0,05$ ).

Auch der Vergleich der mit 0,5 – 2  $\mu\text{M}$  beimpften Zellen mit den Negativkontrollen FCS und DMSO ergab nur geringe Unterschiede hinsichtlich Zellzahl und Vitalität. Zwar zeigten die mit GN25 inkubierten Zellen auch bei niedriger Dosierungen teilweise eine verringerte Wachstumstendenz bzw. eine

verminderte Zellvitalität, diese Beobachtung konnte jedoch nicht mit einer statistischen Signifikanz belegt werden ( $p > 0,05$ ).

Die Auswertung der Zellen nach Inkubation mit höheren Dosen (4 – 10  $\mu\text{M}$ ) hingegen zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums, so dass ab einer Dosis von 4  $\mu\text{M}$  eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden konnte ( $p < 0,05$ ). Zum einen zeigte sich im Vergleich der inkubierten Zellen mit den Negativkontrollen FCS und DMSO eine signifikante Reduktion der Zellvitalität ( $p < 0,05$ ). Zum anderen konnte auch zwischen den verschiedenen Dosierungen ein relevanter und statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). So wiesen die Zellen die mit 4  $\mu\text{M}$  beimpft worden waren eine höhere Zellvitalität auf, als Zellen die mit Dosen von 5  $\mu\text{M}$  oder höher inkubiert worden waren ( $p < 0,05$ ).

Die IC-50 lag bei 24 Stunden bei einer Dosis von 3,5719  $\mu\text{g}$ , bei 72 Stunden bei 6,3266  $\mu\text{g}$  und bei 144 Stunden bei einer Dosis von 7,9944  $\mu\text{g}$ .



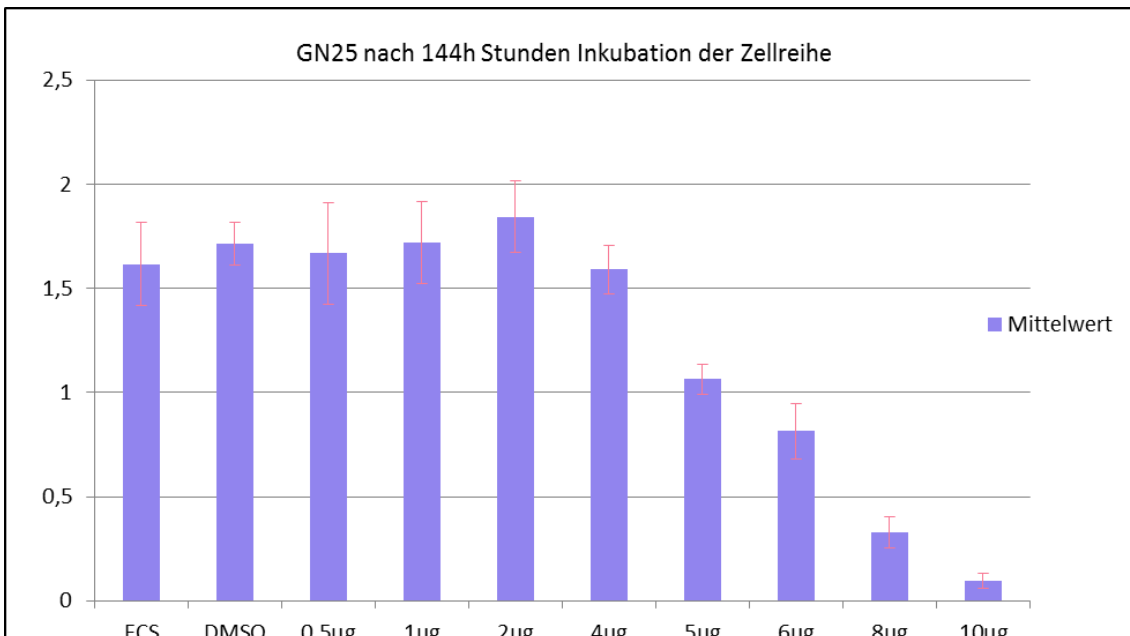
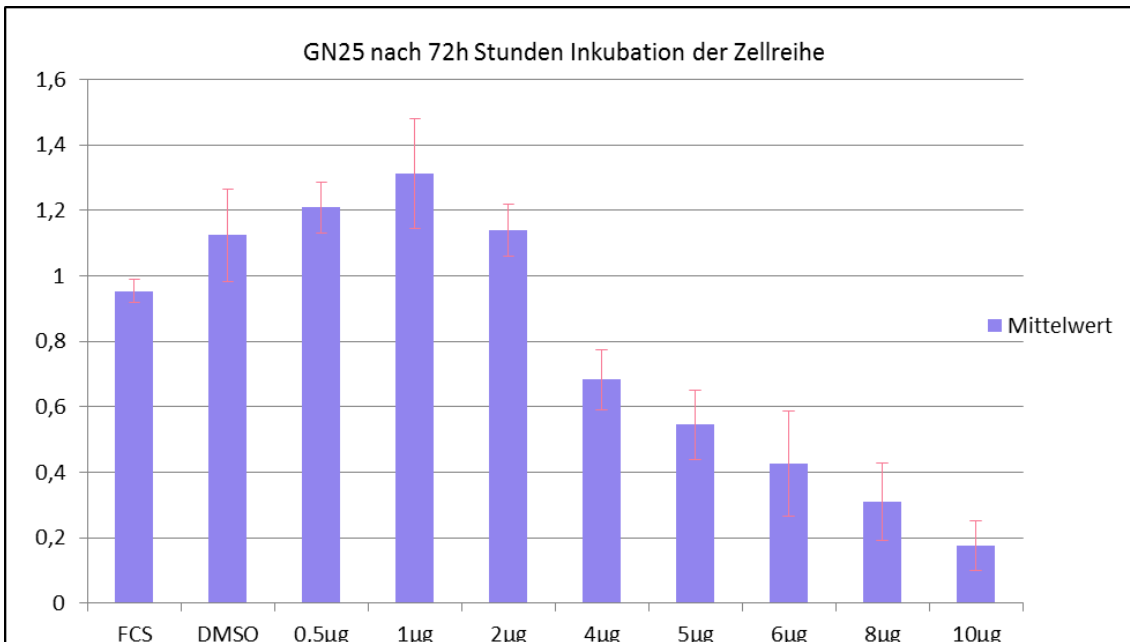


Fig.1: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Inkubation der Zelllinie SUIT2-007 mit GN25. Die X-Achse kennzeichnet die verschiedenen Konzentrationen, die Y-Achse die Werte der optischen Dichte aus der Messung des MTT-Assay (OD 570 und 630 nm).

### 5.2.2 GN25 in SUIT-2/028

Die Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich der Dosisabhängigkeit nach Inkubation der Zelllinie SUIT2-028 mit GN25 zeigten vergleichsweise ähnliche Ergebnisse wie die der Zelllinie SUIT2-007.

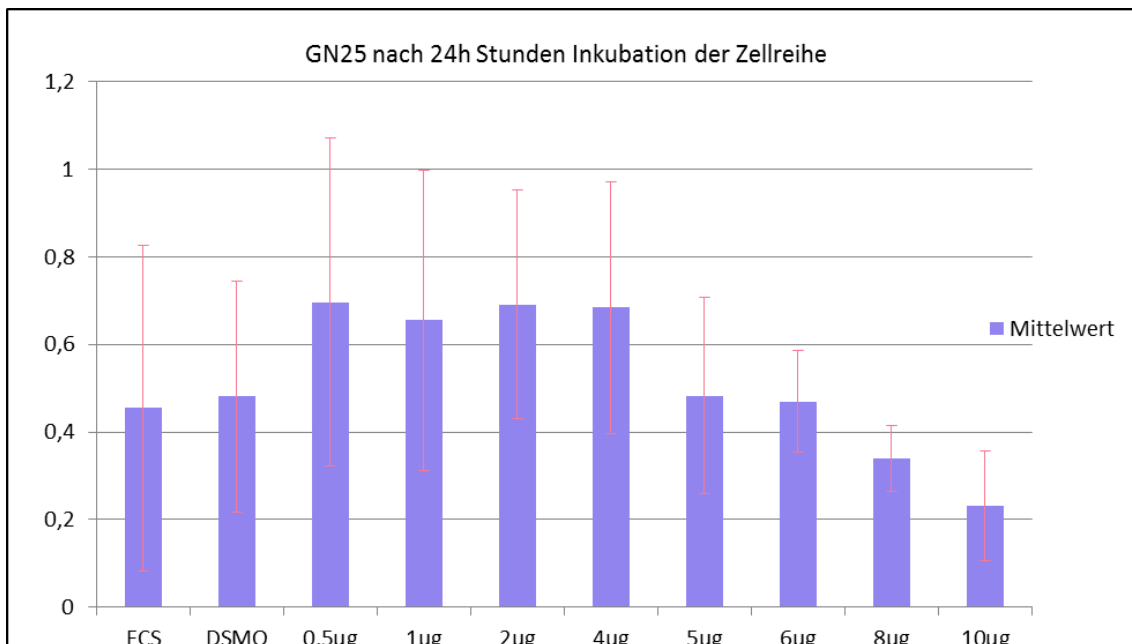
Auch hier bestand zwischen den Negativkontrollen mit FCS und DMSO kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) im Zellwachstum, so dass auch hier von einer Vergleichbarkeit ihrer Eigenschaften als Nährmedium auszugehen ist.

Ähnlich der Ergebnisse der Zellreihe SUIT2-007 bestand auch bei der Zelllinie SUIT2-028 ein nur sehr geringer Unterschied hinsichtlich Zellwachstum und Zellvitalität verglichen mit den Negativkontrollen. Die geringgradigen Unterschiede konnten keine statistische Signifikanz erreichen ( $p > 0,05$ ).

Auch der Vergleich der Zellgruppen untereinander, die mit niedrigen Dosen - in diesem Fall 0,5 – 5  $\mu\text{M}$  - inkubiert wurden, zeigte lediglich geringfügige Veränderungen im Wachstumsverhalten und erbrachte somit kein signifikantes Ergebnis ( $p > 0,05$ ).

Ab einer Inkubationsdosis von 6  $\mu\text{M}$  konnte jedoch auch in der SUIT2-028-Zelllinie eine statistisch signifikante Reduktion der Zellzahl bzw. der Zellvitalität beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls ähnlich den Ergebnisse mit SUIT2-007 korrelierte die Höhe der Dosis reziprok mit der Zellzahl und –vitalität.

Die IC-50 lag bei 24 Stunden bei einer Dosis von 4,7280  $\mu\text{g}$ , bei 72 Stunden bei 6,4738  $\mu\text{g}$  und bei 144 Stunden bei einer Dosis von 7,2551  $\mu\text{g}$ .



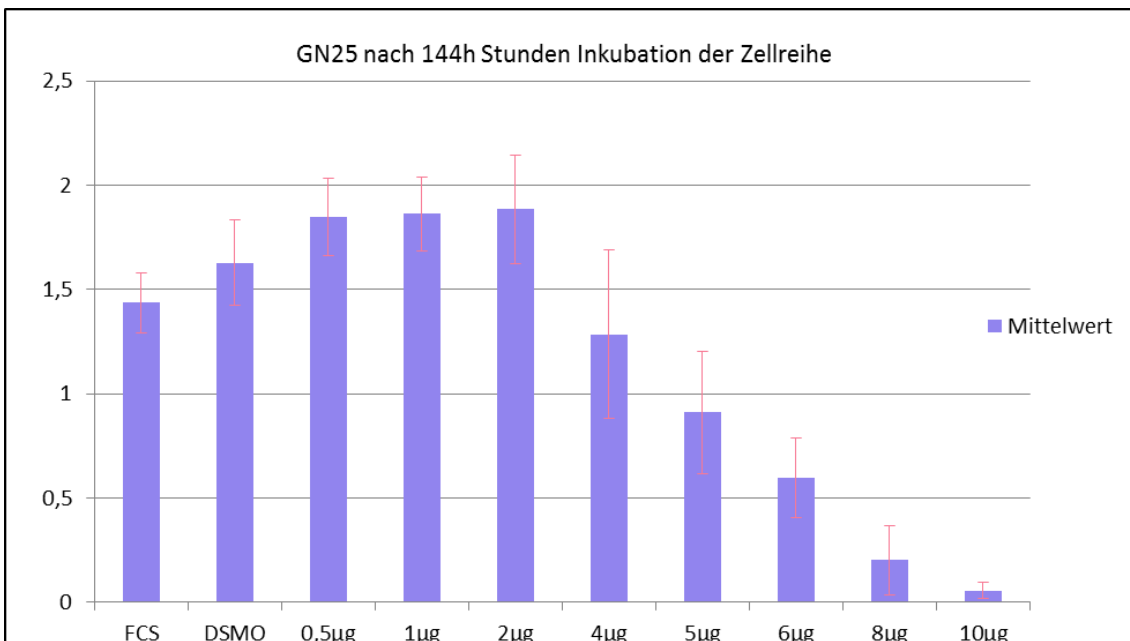
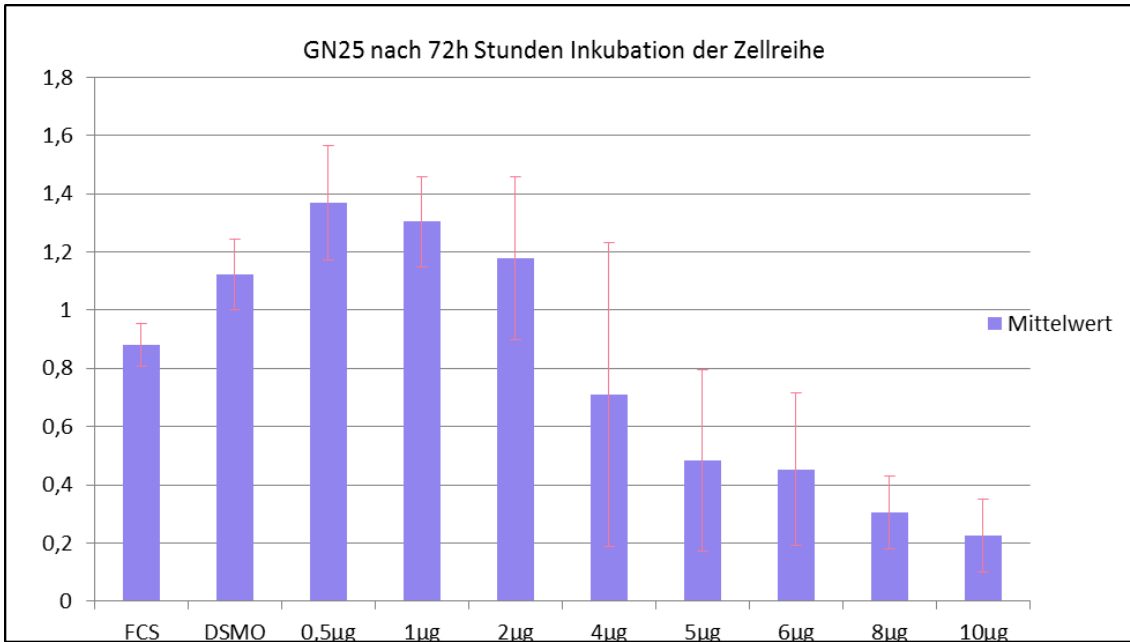


Fig.2: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Inkubation der Zelllinie SUIT2-028 mit GN25. Die X-Achse kennzeichnet die verschiedenen Konzentrationen, die Y-Achse die Werte der optischen Dichte aus der Messung des MTT-Assay (OD 570 und 630 nm).



### **5.3 PEG inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

Die Bearbeitung der Zelllinien erfolgte durch Inkubation mit PEG in well-plates. In der ersten und zweiten Spalte wurde als Negativkontrolle der Nährlösung 10%iges FCS aufgetragen. Da das Lösungsmittel für PEG, anders als bei GN25, ebenfalls FCS ist, musste keine weitere Substanz als Negativkontrolle erfasst werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auch hier wie zuvor festgelegt nach 24, 72 und 144 Stunden.

#### **5.3.1 PEG in SUIT2-007**

Auch die Auswertung der mit PEG beimpften Zelllinie SUIT2-007 erfolgte zunächst mit der Frage einer wachstumshemmenden Wirkung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Die Messergebnisse der Zellproliferation nach einem Zeitraum von 24 Stunden zeigte zunächst keinen Hinweis auf einen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum. Sowohl der Vergleich zwischen den Kontrollgruppen untereinander als auch der Vergleich mit den beimpften Zellgruppen erbrachte keinen signifikanten Unterschied in Hinblick auf Zellanzahl bzw. Zellvitalität ( $p > 0,05$ ).

Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden jedoch konnte eine deutliche Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. Verglichen mit den Negativkontrollen ließ sich eine statistisch signifikante Proliferationshemmung beider PEG-beimpfter Zellgruppen nachweisen ( $p < 0,05$ ).

Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die Auswertung der Zellproliferation nach einer Inkubationszeit von 144 Stunden. Abgesehen von der auch hier insgesamt hoch signifikanten Wachstumshemmung ( $p < 0,003$ ) konnten durch die verlängerte Inkubationszeit umso deutlichere quantitative Unterschiede in der Zellvitalität erreicht werden.

### **5.3.2 PEG in SUIT2-028**

Ähnlich den Ergebnissen der Inkubation mit GN25 zeigte auch die Auswertung der mit PEG beimpften Zellen vergleichbare Effekte in den beiden unterschiedlichen Zelllinien.

Auch in SUIT2-028 konnte nach einem Zeitraum von 24 Stunden keine signifikante Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Bei insgesamt niedrigen Zellzahlen bestand kein Unterschied im Wachstumsverhalten der Kontrollgruppe verglichen mit der Therapiegruppe.

Nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf 72 Stunden zeigte sich – dosisabhängig - eine deutliche Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Die Auswertung nach 144 Stunden zeigte – ähnlich wie in SUIT2-007 – eine umso deutlichere Reduktion der Zellzahl und –vitalität verglichen mit den Ergebnissen nach 72 Stunden. Dies ließ sich mit einer statistisch hohen Signifikanz belegen ( $p < 0,002$ ).

### **5.4 PEG inhibiert das Zellwachstum von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Dosis**

Die Bearbeitung der Zelllinien erfolgte durch Inkubation mit PEG in well-plates. In der ersten und zweiten Spalte wurde als Negativkontrolle der Nährlösung 10%iges FCS aufgetragen. Da das Lösungsmittel für PEG, anders als bei GN25, ebenfalls FCS ist, musste keine weitere Substanz als Negativkontrolle erfasst werden. Um dennoch ein einheitliches Pippetier-Schema beizubehalten erfolgte das Auftragen von FCS in die ersten beiden Spalten der well-plates. Die Inkubation der Zelllinien mit PEG erfolgte in 5%iger sowie in 10%iger Konzentration.

#### 5.4.1 PEG in SUIT2-007

Nach Auswertung der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Inkubationszeit erfolgte analog zu GN25 der Vergleich der Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Dosis.

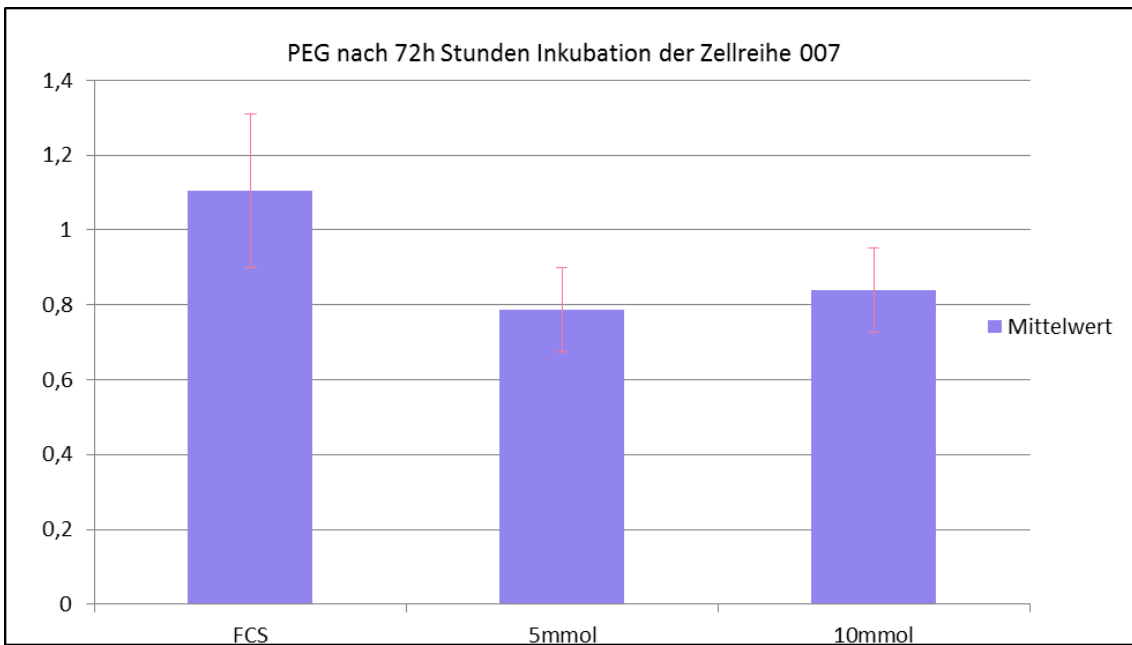
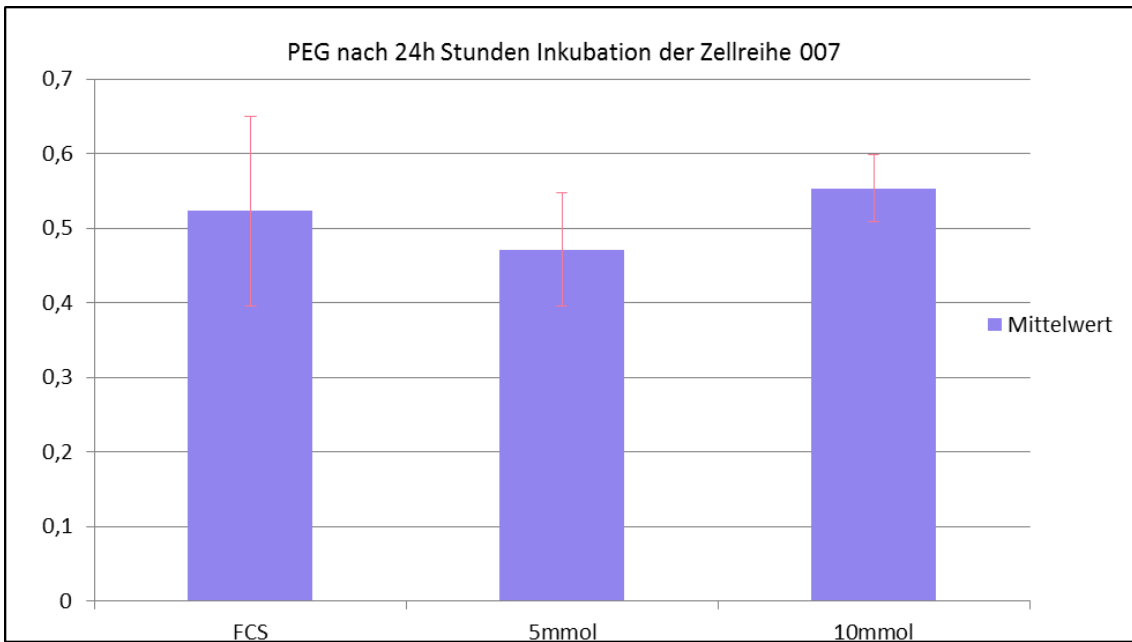
Sowohl die Inkubation mit 5%igem PEG als auch mit 10%igem PEG konnte nach 24 Stunden keine signifikante Wachstumshemmung zeigen ( $p > 0,05$ ). Weder im Vergleich mit der Kontrollgruppe, noch im Vergleich untereinander konnten signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten nachgewiesen werden.

Nach 72 Stunden zeigten sowohl die mit 5%igem PEG beimpften Zellen, als auch die mit 10%igem PEG beimpften Zellen eine nachweisbare Proliferationshemmung. Dabei waren Zellzahlen der mit 5%igem und 10%igem PEG beimpften Zellen im Vergleich ähnlich reduziert und zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch sowohl für die 5%ige als auch für die 10%ige Dosierung eine signifikante Wachstumshemmung nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ).

Ähnliche Werte ließen sich auch nach der Inkubation für 144 Stunden beobachten. Insgesamt war eine deutliche Reduktion der Zellzahlen unter beiden Dosierungen zu sehen. Das Wachstum zeigte sich unter 5%iger-Dosierung weiter gehemmt und im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant vermindert ( $p < 0,005$ ). Auch die mit 10%iger Lösung behandelten Zellen zeigten eine deutliche Verminderung der Zellzahl. Diese war im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Auch im direkten Vergleich der behandelten Zellen untereinander konnte eine dosisabhängige Wachstumshemmung festgestellt werden. Die Zellvitalität war in der Gruppe mit 10%igem PEG um knapp 1/3 geringer als in der Gruppe mit 5%igem PEG, was sich auch statistisch als signifikant bestätigte ( $p < 0,05$ ).

Die IC-50 lag bei 24 Stunden bei einer Dosis von 0,1613mmol, bei 72 Stunden bei 20,4211mmol und bei 144 Stunden bei einer Dosis von 13,0143mmol.



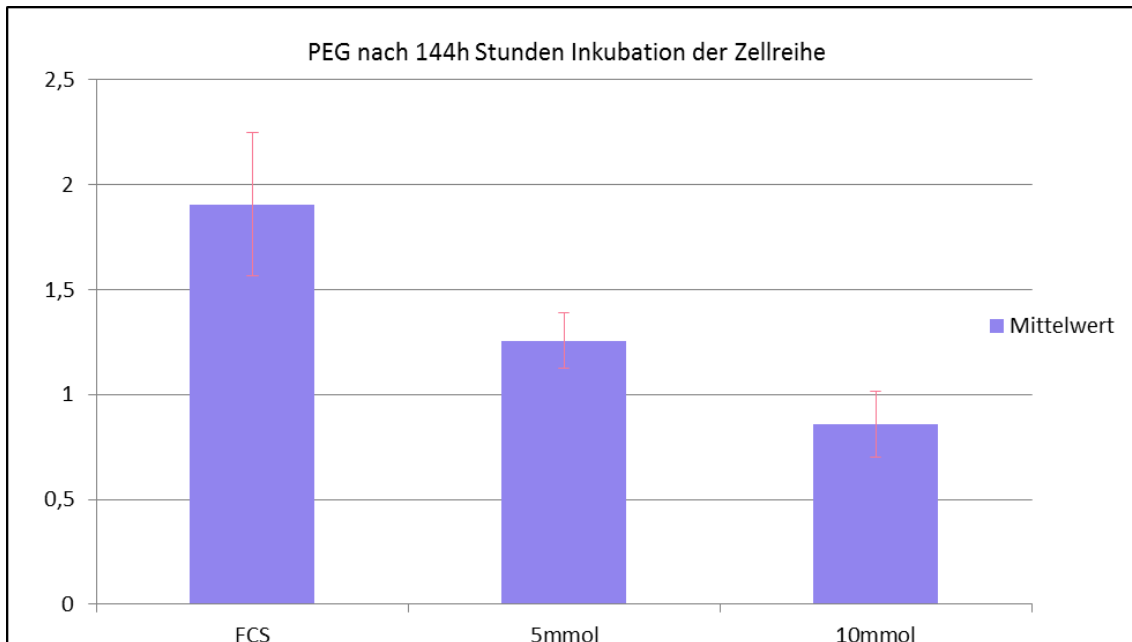


Fig.3: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Inkubation der Zelllinie SUIT2-007 mit PEG. Die X-Achse kennzeichnet die verschiedenen Konzentrationen, die Y-Achse die Werte der optischen Dichte aus der Messung des MTT-Assay (OD 570 und 630 nm).

#### 5.4.2 PEG in SUIT2-028

Auch in den Zellen der Linie SUIT2-028 konnten vergleichbare Ergebnisse gezeigt werden.

Sowohl die 24-stündige Inkubation mit 5%igem PEG als auch mit 10%igem PEG verursachte keine signifikante Wachstumshemmung ( $p > 0,05$ ). Weder im Vergleich mit der Kontrollgruppe, noch im Vergleich untereinander konnten signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten nachgewiesen werden.

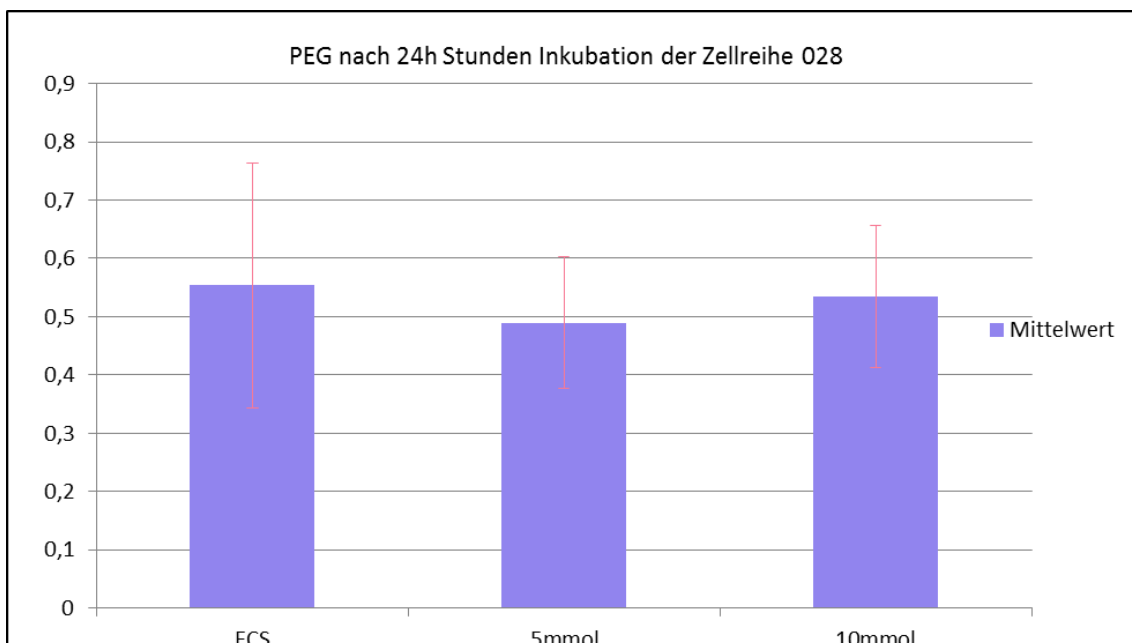
Nach 72 Stunden zeigte sich nach Beimpfung mit 5%igem PEG eine deutliche Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Interessanterweise zeigte sich diese auch im Vergleich zu den mit 10%igem PEG beimpften Zellen, was sich als statistisch signifikant zu belegen war ( $p < 0,05$ ). Die Zellen die mit der 10%igen PEG-Lösung behandelt wurden zeigten jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Wachstumshemmung.

Nach der Inkubationszeit von 144 Stunden zeigte sich, vergleichbar mit den Ergebnissen der SUIT2-007-Zelllinie, ebenfalls eine signifikante Hemmung des

Zellwachstums in beiden behandelten Gruppen. Sowohl die Gruppe mit 5%igem PEG als auch die mit 10%igem PEG zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine hoch signifikante Reduktion der vitalen Zellen ( $p < 0,005$ ).

Auch hier war der Anteil an vitalen Zellen unter 10%igem PEG um ein Drittel geringer als unter 5%igem PEG, was ebenfalls statistisch signifikant war ( $p > 0,05$ ).

Die IC-50 lag bei 24 Stunden bei einer Dosis von 18,7895mmol, bei 72 Stunden bei 11,7146mmol und bei 144 Stunden bei einer Dosis von 12,2591mmol.



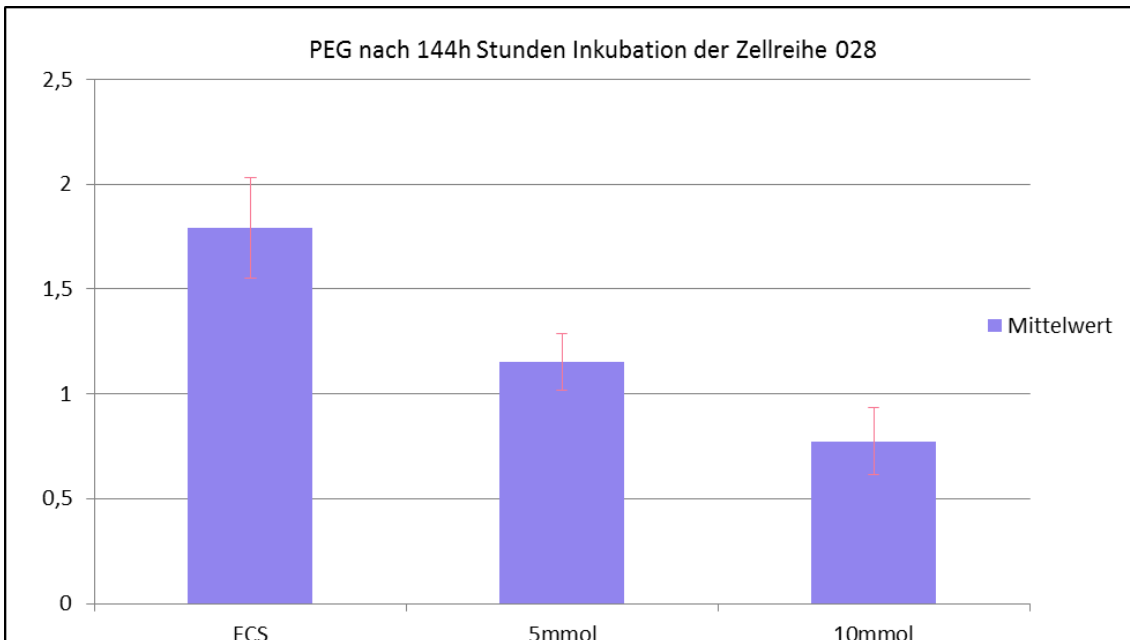
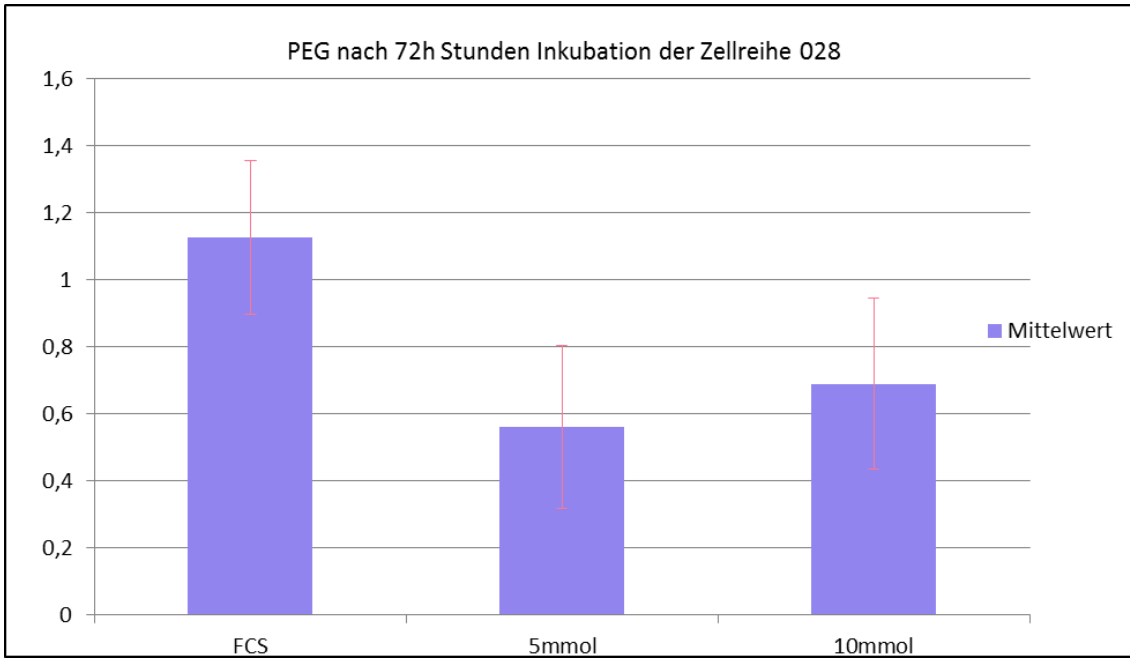


Fig.4: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Inkubation der Zelllinie SUIT2-028 mit PEG. Die X-Achse kennzeichnet die verschiedenen Konzentrationen, die Y-Achse die Werte der optischen Dichte aus der Messung des MTT-Assay (OD 570 und 630 nm).

## **5.5 GN25 besitzt im Vergleich zu PEG ein höheres Potential zur Inhibition von Pankreaskarzinomzellen**

Wie bereits oben beschrieben, konnte eine signifikante Reduktion des Zellwachstums für beide Inhibitoren nachgewiesen werden. Diese ist in beiden Behandlungsgruppen sowohl abhängig von der Inkubationszeit als auch von der Dosis des Inhibitors.

Ein direkter Vergleich der beiden Inhibitoren ist durch die unterschiedlichen Lösungsmittel sowie die unterschiedlichen Verdünnungstechniken erschwert. Dennoch scheint GN25 im Vergleich zu PEG ein höheres inhibitorisches Potential zu haben, was sich durch die sehr geringen Zellzahlen im Vergleich zu PEG zeigt.

Bereits bei Konzentrationen von 5 $\mu$ g GN25 kann eine Zellzahlreduktion festgestellt werden, die mit PEG erst ab 10mmol erreicht werden kann.



## 6 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss der Inhibitoren PEG und GN25 auf das Zellwachstum von Zelllinien des Pankreaskarzinoms zu untersuchen. Hierzu erfolgte die Inkubation von zwei verschiedenen Zelllinien über unterschiedliche Zeiträume und in aufsteigenden Konzentrationen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl PEG als auch GN25 eine signifikante Wachstumshemmung beider Zelllinien verursachen, welche sowohl Zeit- als auch Dosis-abhängig ist. Zudem lässt sich beobachten, dass der Inhibitor GN25 ein höheres Potential als Inhibitor hat und bereits in geringeren Konzentrationen wirksam ist.

Die Prognose des PDAC konnte in den letzten Jahren kaum verbessert werden und die Inzidenzraten sind steigend. Dies resultiert, neben der späten Diagnosestellung, vor allem aus seinem invasiven Wachstum und seiner frühen Metastasierung. Zudem weist das Pankreaskarzinom eine hohe Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika und Strahlentherapie auf, so dass wirksame Therapien bisher kaum vorhanden sind.

Dies macht die Bedeutung intensiver Forschung an neuen Therapieansätzen deutlich.

Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor Snail, als einer der Hauptmediatoren der epithelial-mesenchymalen Transition, eine besondere Rolle. Bis dato ist die Datenlage bezüglich wirksamer Snail-Hemmstoffe jedoch sehr begrenzt.

Wie bereits oben erwähnt, war die Arbeitsgruppe von *Lee et al.* die erste die von einem neuen Inhibitor aus der Gruppe der kleinen chemischen Inhibitoren berichtete. Sie konnten zeigen, dass dieser Inhibitor GN25 die Bindung von Snail an p53 spezifisch verhindert und eine Umkehr des negativ dominanten Effekts bewirkt (*Lee et al.*, 2010).

Dieser Effekt bezeichnet die Maskierung von p53<sup>WT</sup> durch das p53<sup>MT</sup>-Allel in heterozygot mutierten Zellen (*Brooks e Gu*, 2006), (*Weinberg*, 2006).

Die Ergebnisse der Wirkung von GN25 auf das PDAC in dieser Arbeit sind konkordant mit denen von *Lee et al.*

Wie bereits beschrieben konnte auch in den SUIT-2-Zelllinien durch Behandlung der Zellen mit GN25 eine deutliche Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. Die eindeutige Dosis- und Zeit-abhängige Wachstumsreduktion in beiden Zellreihen konnte als statistisch signifikant belegt werden. Die in sich geschlossenen und gleichmäßigen Ergebnisse lassen auf eine hohe Validität und eine saubere Arbeitspraxis schließen. Anhand der mittels T-Test ermittelten p-Werte konnte eine statistische Signifikanz der Ergebnisse belegt werden, die eine objektive Betrachtung und eine Vergleichbarkeit erlauben.

GN25 verhindert spezifisch die Bindung von Snail an p53 in Kras-mutierten Zellen (Lee *et al.*, 2010). Wie bereits oben beschrieben liegt eine Kras-Mutation in so gut wie allen Pankreaskarzinomen vor. Weiterhin konnten sie zeigen, dass durch die Inkubation von Karzinomzellen mit GN25 eine Reaktivierung von p53<sup>WT</sup> stattfindet und damit der negativ-dominante Effekt überwunden werden kann (Lee *et al.*, 2010). Dadurch wird der Maskierung von p53<sup>WT</sup> durch das p53<sup>MT</sup>-Allel in heterozygot mutierten Zellen entgegen gewirkt (Weinberg, 2006). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten und Ergebnisse legen nahe, dass die festgestellte Wachstumshemmung durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors Snail durch GN25 hervorgerufen wird.

Einige andere Ansätze zur Erforschung neuer Inhibitoren von Snail wurden in jüngster Zeit untersucht und konnten vielversprechende Ergebnisse vorweisen. Fu *et al.* untersuchten den Effekt von GANT-61 auf die CSC des Pankreaskarzinoms und konnten eine signifikante Hemmung von Snail in Verbindung mit einer Re-Expression von E-Cadherin nachweisen (Fu *et al.*, 2013).

In einer Untersuchung von Peran *et al.* konnte eine Inhibition von Snail und der EMT durch die Inkubation von Pankreaskarzinom-Zelllinien mit Proenzymen beobachtet werden (Peran *et al.*, 2013).

In einer *in vivo* Studie von Zhao *et al.* konnte neben einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums auch eine Suppression von Snail gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2013).

Die Inkubation der Zelllinien mit PEG zeigte ebenfalls bereits ab einer Inkubationsdauer von 72 Stunden eine signifikante Hemmung des Zellwachstums.

Die Verwendung von Polyethylenglykol beschränkte sich anfangs zunächst auf seine Wirkung als Laxans. Durch seine rein pflanzlichen Bestandteile hat seine Einnahme kaum Nebenwirkungen und findet breite Anwendung.

Neben dieser laxativen Wirkung zeigte sich in einigen Studien mehr oder weniger durch Zufall auch eine chemopräventive Wirkung auf das kolorektale Karzinom (Di Palma *et al.*, 2002), (Corpet e Tache, 2002).

Auch die daraufhin folgenden Studien die sich mit der chemopräventiven Wirkung von PEG beschäftigten waren vor allem auf den Gastrointestinal-Trakt beschränkt, da dort die topische Anwendung erfolgt (Dorval *et al.*, 2006), (Jänne e Mayer, 2000).

Die Mechanismen, die dieser Wirkung zugrunde liegen, waren lange Zeit unklar.

In ihren *in vitro*-Untersuchungen konnten Roy *et al.* erstmals Signalwege identifizieren, durch die PEG seine Wirkung entfaltet. Neben der vermehrten Re-Expression von E-Cadherin konnten sie auch eine signifikante Inhibition von Snail durch die Anwendung von PEG nachweisen (Roy *et al.*, 2006).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchten Wali *et al.* die weiterführenden Wirkmechanismen. Sie konnten zeigen, dass die Behandlung von Kolonkarzinom-Zellen mit PEG zu einer EGFR-vermittelten Inhibition von Snail führt (Wali *et al.*, 2008). Aufgrund seiner Größe ist PEG nicht fähig, durch die Zellwand zu diffundieren und seine Wirkungsweise war daher lange unklar. Durch die Bindung an EGFR kann PEG eine Signalkaskade induzieren und somit indirekt die Inhibition von Snail bewirken (Wali *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen eine deutlich Wachstumshemmung von Pankreaskarzinomzellen durch PEG. Diese sind in Abhängigkeit von Zeit und Dosis zunehmend und in sich konsistent. Die beschriebene Wirkung von PEG auf das PDAC kann unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Roy *et al.* sowie Wali *et al.* auf die Inhibition von Snail zurückgeführt werden.

Zu diskutieren ist die geringere Wachstumshemmung der SUIT2-028-Zelllinie unter 10%igem PEG im Vergleich zu 5%ige PEG nach 72 Stunden. Da diese Differenz jedoch als statistisch nicht signifikant belegt wurde ( $p < 0,05$ ), sind diese Ergebnisse als Schwankungen in der in den well-plates vorherrschenden Zellzahl zu werten.

Trotz seiner weltweiten Verfügbarkeit und so gut wie nicht vorhandenen Nebenwirkungen, liegen derzeit keinerlei Untersuchungen über die Wirkung von PEG auf das Zellwachstum des Pankreaskarzinoms vor.

In jüngerer Zeit konnte eine weitere Eigenschaft von PEG zur Therapie von verschiedenen Karzinomen, u. a. auch des Pankreaskarzinoms, genutzt werden. Hierbei wird PEG als Adjuvans für die das eigentliche Medikament genutzt.

Die Fusion von Chemotherapeutika mit PEG durch Disulfid-Brücken kann die Bioverfügbarkeit verbessern und die Freigabe des eigentlichen Wirkstoffs steuerbar machen (Xu e Amiji, 2012).

*Jia et al.* untersuchten die Wirkung von PEG-geladenem Gemcitabine im Vergleich zu Gemcitabine alleine. Diese zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine optimale Bioverfügbarkeit und Biokinetik ohne eine erhöhte Zytotoxizität auf gesunde Zellen auszuüben (*Jia et al.*, 2010).

Auch die Ergebnisse von Kim et al., bei der die Wirksamkeit von siRNA durch Fusion mit PEG untersucht wurde, zeigten das Potential von PEG als Vehikel für Chemotherapeutika (*Kim et al.*, 2012).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von *Ki et al.* konnte durch eine Verlinkung von PEG mit Matrix-Metalloproteinasen eine EGFR-vermittelte Proliferationshemmung in Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms beobachtet werden (*Ki et al.*, 2013).

Zusammen gefasst geben diese Ergebnisse erste Hinweise auf die breitflächigen möglichen Einsatzgebiete von PEG.

Zur Messung der Wachstums bzw. der Wachstumshemmung erfolgte in dieser Arbeit die Verwendung des MTT-Assays.

Der MTT findet seine Anwendung bereits seit vielen Jahren in der Identifizierung von inhibitorischen Wirkstoffen auf (Karzinom)Zellen. Er entspricht der auch heutzutage noch gängigen Praxis zur Ermittlung von wirksamen Medikamenten und deren wirksamen Dosierungen. Er wird des Weiteren in der individuellen Krebstherapie zur Austestung von Chemotherapeutika an den Karzinomzellen des Patienten verwendet. Hierbei konnten beispielsweise bereits ausgezeichnete Ergebnisse in der Therapie von Schilddrüsenkarzinom-Patienten erzielt werden.

Schwächen des MTT-Assay liegen klar in der Untersucher-Abhängigkeit und der damit verbundenen Notwendigkeit des genauen und sauberen Arbeitens. Des Weiteren ist der MTT zwar in der Lage präzise Messungen der Zellvitalität durchzuführen, die zugrunde liegenden Wirkmechanismen der Wachstumshemmung können anhand dieser Methode jedoch nicht ermittelt werden.

Dennoch ist und bleibt der MTT-Assay eine der wichtigsten gängigen Methoden zur Erhebung der Zellvitalität, die valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert und die auch praktisch im klinischen Alltag Verwendung finden.

Die Ergebnisse der Inkubation der Zelllinien Suit-2 mit GN25 sowie mit PEG zeigen eine signifikante Hemmung des Zellwachstums im Pankreaskarzinom. Beide Inhibitoren liefern viel versprechende neue Ansätze zur Therapie des Pankreaskarzinoms. Dennoch ist die Studienlage diesbezüglich sehr überschaubar und befindet sich noch im Anfangsstadium. In Hinblick auf die stetig steigende Inzidenz und Mortalität des PDAC muss die weiterführende Erforschung Erfolg versprechender Therapieansätze jedoch oberste Priorität haben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung geben Hinweise auf eine signifikante chemotherapeutische Wirkung von PEG und GN25 und sollten Basis für weiterführende Untersuchungen sein. Diesbezüglich könnten Studien am Mausmodell zur Frage ihrer Wirksamkeit in vivo der nächste Schritt sein.

Jedem Ergebnis, das Anlass zur Hoffnung auf eine Verbesserung der Prognose des Pankreaskarzinoms gibt müssen weitere Untersuchungen folgen um eine Verlängerung des Überlebens für Patienten mit PDAC zu erreichen.

## 7 Abkürzungen

AMF (Autocrine motility factor)

ATR (Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related)

CAF (Cancer-associated fibroblasts)

CSC (Cancer stem cells)

CTGF connective tissue growth factor

DM II (Diabetes mellitus Typ II)

EZM (Extrazellulär-Matrix)

FGF (Fibroblast growth factor)

GAP (GTPase activating protein)

GTP (Guanosintriphosphat)

HIF- $\alpha$ 1 (Hypoxia-inducible factor)

IL-1 $\beta$  (Interleukin)

IPMN (Intraductal papillary mucinous neoplasm)

LOH (Loss of heterogeneity)

LOL (Lysyl oxidase-like 2 enzyme)

MAPK (Mitogen-activated protein kinase)

MCN (Muzinös-zystische Neoplasie)

MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)

NF- $\kappa$ B (Nuclear factor)

PAK1 (p21-activated kinase)

PanIN (Pancreatic intraepithelial neoplasm)

PDAC (Pancreatic ductal adenocarcinoma)

PTHrP (Parathormon-related peptide)

SOX2 (Sex-determining region Y(SRY)-Box2)

TGF- $\beta$  (Tissue growth factor)

TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor)

## 8 Referenzen

ABEL, E. V.; SIMEONE, D. M. Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1241-8, Jun 2013. ISSN 0016-5085.

ADSAY, N. V. et al. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an "intestinal" pathway of carcinogenesis in the pancreas. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 7, p. 839-48, Jul 2004. ISSN 0147-5185. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15223952>>.

ALMOGUERA, C. et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**, v. 53, n. 4, p. 549-54, May 20 1988. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

ARUMUGAM, T. et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. **Cancer Res**, v. 69, n. 14, p. 5820-8, Jul 15 2009. ISSN 0008-5472.

BACHELDER, R. E. et al. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Biol**, v. 168, n. 1, p. 29-33, Jan 3 2005. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

BAILEY, J. M. et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 19, p. 5995-6004, Oct 1 2008. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

BARRALLO-GIMENO, A.; NIETO, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. **Development**, v. 132, n. 14, p. 3151-61, Jul 2005. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991.

BATLLE, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 84-9, Feb 2000. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392.

BERRIDGE, M. V. **The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that use Tetrazolium Salts**. TAN, A. S., MCCOY, K. D., WANG, R.: Biochemica 1996.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. a003129, Dec 2009.

BISSELL, M. J. et al. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 537-46, Dec 2002. ISSN 0301-4681 (Print) 0301-4681.

BOLOS, V. et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 3, p. 499-511, Feb 1 2003. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.



BONOVAS, S.; FILIOUSSI, K.; SITARAS, N. M. Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 10, p. 2646-51, Oct 2008. ISSN 0002-9270.

BROOKS, C. L.; GU, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. **Mol Cell**, v. 21, n. 3, p. 307-15, Feb 3 2006. ISSN 1097-2765 (Print)  
1097-2765.

BURK, U. et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. **EMBO Rep**, v. 9, n. 6, p. 582-9, Jun 2008. ISSN 1469-221x.

CADWELL, C.; ZAMBETTI, G. P. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 15-30, Oct 17 2001. ISSN 0378-1119 (Print)  
0378-1119.

CAIRNS, J. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, n. 5505, p. 197-200, May 15 1975. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836.

CANO, A. et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nat Cell Biol**, v. 2, n. 2, p. 76-83, Feb 2000. ISSN 1465-7392 (Print)  
1465-7392.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res**, v. 47, n. 4, p. 936-42, Feb 15 1987. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472.

CARVER, E. A. et al. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 23, p. 8184-8, Dec 2001. ISSN 0270-7306 (Print)  
0270-7306.

CHENG, C. W. et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. **Oncogene**, v. 20, n. 29, p. 3814-23, Jun 28 2001. ISSN 0950-9232 (Print)  
0950-9232.

CHU, G. C. et al. Stromal biology of pancreatic cancer. **J Cell Biochem**, v. 101, n. 4, p. 887-907, Jul 1 2007. ISSN 0730-2312 (Print)  
0730-2312.

COLLINS, M. A. et al. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 639-53, Feb 1 2012. ISSN 0021-9738.

CORPET, D. E.; TACHE, S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. **Nutr Cancer**, v. 43, n. 1, p. 1-21, 2002. ISSN 0163-5581 (Print)

0163-5581.

CRNOGORAC-JURCEVIC, T. et al. Molecular analysis of precursor lesions in familial pancreatic cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54830, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372777> >.

CURADO, M. P. E. A. **Cancer Incidence in Five Continents**. IARC Scientific Publications. 9 2007.

DE CRAENE, B. et al. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6237-44, Jul 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

DE MONTE, L. et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. **J Exp Med**, v. 208, n. 3, p. 469-78, Mar 14 2011. ISSN 0022-1007.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, v. 29, n. 2, p. 117-29, Oct 2001. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. Intracellular signalling: the mad way to do it. **Curr Biol**, v. 6, n. 10, p. 1226-9, Oct 1 1996. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822.

DI PALMA, J. A.; SMITH, J. R.; CLEVELAND, M. Overnight efficacy of polyethylene glycol laxative. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 7, p. 1776-9, Jul 2002. ISSN 0002-9270 (Print) 0002-9270.

DORVAL, E. et al. Polyethylene glycol and prevalence of colorectal adenomas. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 30, n. 10, p. 1196-9, Oct 2006. ISSN 0399-8320 (Print) 0399-8320.

DUDA, D. G. et al. Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. **Oncogene**, v. 22, n. 44, p. 6857-64, Oct 9 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

DUVAL, M. **Technique de l'emploi du collodion humide pour la pratique des coupes microscopiques**. Journal of Anatomy and Physiology Paris. 15: 185-188 p. 1879.

EL-SERAG, H. B. et al. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A population-based study of U.S. veterans. **Hepatology**, v. 49, n. 1, p. 116-23, Jan 2009. ISSN 0270-9139.

ELLENRIEDER, V. et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. **Cancer Res**, v. 61, n. 10, p. 4222-8, May 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

ERKAN, M. et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 10, p. 1155-61, Oct 2008. ISSN 1542-3565.

FEIG, C. et al. The pancreas cancer microenvironment. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 16, p. 4266-76, Aug 15 2012. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

FITZGERALD, D. C. et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 116, n. 1-2, p. 59-68, Mar 15 2007. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427.

FLEMING, J. B. et al. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy. **Mol Cancer Res**, v. 3, n. 7, p. 413-23, Jul 2005. ISSN 1541-7786 (Print) 1541-7786.

FLIER, S. N. et al. Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 20202-12, Jun 25 2010. ISSN 0021-9258.

FLOOR, S. et al. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. **Oncogene**, v. 30, n. 46, p. 4609-21, Nov 17 2011. ISSN 0950-9232.

FU, J. et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R. **Cancer Lett**, v. 330, n. 1, p. 22-32, Mar 1 2013. ISSN 0304-3835.

GARCIA-SILVA, S.; FRIAS-ALDEGUER, J.; HEESCHEN, C. Stem cells & pancreatic cancer. **Pancreatology**, v. 13, n. 2, p. 110-3, Mar-Apr 2013. ISSN 1424-3903.

GEARY, J. et al. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). **Fam Cancer**, v. 7, n. 2, p. 163-72, 2008. ISSN 1389-9600 (Print) 1389-9600.

GIARDIELLO, F. M. et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1447-53, Dec 2000. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085.

\_\_\_\_\_. Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. **Gut**, v. 34, n. 10, p. 1394-6, Oct 1993. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680-4, Oct 30 2006. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

- GINDE, A. A.; LIU, M. C.; CAMARGO, C. A. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 6, p. 626-32, Mar 2009. ISSN 1538-3679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307527> >.
- GIOVANNUCCI, E. et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 7, p. 451-9, Apr 5 2006. ISSN 0027-8874.
- GRANT, W. B.; MOHR, S. B. Ecological studies of ultraviolet B, vitamin D and cancer since 2000. **Ann Epidemiol**, v. 19, n. 7, p. 446-54, Jul 2009. ISSN 1047-2797.
- GRAU, Y.; CARTERET, C.; SIMPSON, P. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in DROSOPHILA MELANOGASTER. **Genetics**, v. 108, n. 2, p. 347-60, Oct 1984. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 19 2010. ISSN 0092-8674.
- GUAITA, S. et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 42, p. 39209-16, Oct 18 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.
- GUERRA, C. et al. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. **Cancer Cell**, v. 19, n. 6, p. 728-39, Jun 14 2011. ISSN 1535-6108.
- \_\_\_\_\_. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. **Cancer Cell**, v. 11, n. 3, p. 291-302, Mar 2007. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108.
- GUMBINER, B.; STEVENSON, B.; GRIMALDI, A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. **J Cell Biol**, v. 107, n. 4, p. 1575-87, Oct 1988. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.
- GUPTA, P. B.; CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells: mirage or reality? **Nat Med**, v. 15, n. 9, p. 1010-2, Sep 2009. ISSN 1078-8956.
- GUPTA, P. B. et al. The evolving portrait of cancer metastasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 70, p. 291-7, 2005. ISSN 0091-7451 (Print) 0091-7451.
- HAHN, S. A. et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 350-3, Jan 19 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674.

HAO, K. et al. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. **Oncol Rep**, v. 29, n. 3, p. 1124-32, Mar 2013. ISSN 1021-335x.

HARRIS, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 38-47, Jan 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

HART, A. R.; KENNEDY, H.; HARVEY, I. Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 3, p. 275-82, Mar 2008. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18328435> >.

HASSAN, M. M. et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 12, p. 2696-707, Dec 2007. ISSN 0002-9270. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764494> >.

\_\_\_\_\_. Association between hepatitis B virus and pancreatic cancer. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 28, p. 4557-62, Oct 1 2008. ISSN 0732-183x.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anat (Basel)**, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995. ISSN 0001-5180 (Print) 0001-5180.

\_\_\_\_\_. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Dev Dyn**, v. 233, n. 3, p. 706-20, Jul 2005. ISSN 1058-8388 (Print) 1058-8388.

HELDIN, C. H.; LANDSTROM, M.; MOUSTAKAS, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. **Curr Opin Cell Biol**, v. 21, n. 2, p. 166-76, Apr 2009. ISSN 0955-0674.

HERMANN, P. C. et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 3, p. 313-23, Sep 13 2007.

HEROLD, G. **Innere Medizin**: 489 - 490 p. 2010.

HERPIN, A.; LELONG, C.; FAVREL, P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. **Dev Comp Immunol**, v. 28, n. 5, p. 461-85, May 3 2004. ISSN 0145-305X (Print) 0145-305x.

HERREROS-VILLANUEVA, M. et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic. **Oncogenesis**, v. 2, p. e61, 2013.

HEUBERGER, J.; BIRCHMEIER, W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 2, p. a002915, Feb 2010.

HEZEL, A. F. et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Genes Dev**, v. 20, n. 10, p. 1218-49, May 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702400> >.

HIDALGO, M. Pancreatic cancer. **N Engl J Med**, v. 362, n. 17, p. 1605-17, Apr 29 2010. ISSN 0028-4793.

HINGORANI, S. R. et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. **Cancer Cell**, v. 4, n. 6, p. 437-50, Dec 2003. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108.

\_\_\_\_\_. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 469-83, May 2005. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108.

HORNER M.J., R. L. A. G., KRAPCHO M., NEYMAN N., AMINOU R., HOWLADER N., ALTEKRUSE S.F., FEUER E.J., HUANG L., MARIOTTO A., MILLER B.A., LEWIS D.R., EISNER M.P., STINCHCOMB D.G., EDWARDS B.K. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006**. National Cancer Institute. Bethesda, MD 2009.

HOTZ, B. et al. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 16, p. 4769-76, Aug 15 2007. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

HOWES, N. et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 3, p. 252-61, Mar 2004. ISSN 1542-3565 (Print) 1542-3565.

HRUBAN, R. H. et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. **Am J Surg Pathol**, v. 25, n. 5, p. 579-86, May 2001. ISSN 0147-5185 (Print) 0147-5185.

\_\_\_\_\_. Treatment of familial pancreatic cancer and its precursors. **Curr Treat Options Gastroenterol**, v. 8, n. 5, p. 365-75, Oct 2005. ISSN 1092-8472. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162302> >.

HRUBAN, R. H.; WILENTZ, R. E.; KERN, S. E. Genetic progression in the pancreatic ducts. **Am J Pathol**, v. 156, n. 6, p. 1821-5, Jun 2000. ISSN 0002-9440. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854204> >.

HUBER, M. A.; KRAUT, N.; BEUG, H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 548-58, Oct 2005. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674.

HUSTINX, S. R. et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. **Mod Pathol**, v. 18, n. 7, p. 959-63, Jul 2005. ISSN 0893-3952 (Print) 0893-3952.

- HWANG, R. F. et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. **Cancer Res**, v. 68, n. 3, p. 918-26, Feb 1 2008. ISSN 0008-5472.
- HWANG, W. L. et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 279-91, 291.e1-5, Jul 2011. ISSN 0016-5085.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 11, p. 1806-13, Apr 10 2009. ISSN 0732-183x.
- \_\_\_\_\_. Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 16, p. 4257-65, Aug 15 2012. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.
- IJICHI, H. et al. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 4106-17, Oct 2011. ISSN 0021-9738.
- IKENOUCHI, J. et al. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 10, p. 1959-67, May 15 2003. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.
- IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 6, p. 415-24, Jun 2010. ISSN 1474-175x.
- INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes Dev**, v. 15, n. 23, p. 3059-87, Dec 1 2001. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369.
- IODICE, S. et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. **Langenbecks Arch Surg**, v. 393, n. 4, p. 535-45, Jul 2008. ISSN 1435-2443.
- ITOH, M. et al. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. **J Cell Biol**, v. 138, n. 1, p. 181-92, Jul 14 1997. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.
- IWAMURA, T. et al. P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). **Cancer Res**, v. 57, n. 6, p. 1206-12, Mar 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067294>>.
- IWAMURA, T.; KATSUKI, T.; IDE, K. Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. **Jpn J Cancer Res**, v. 78, n. 1, p. 54-62, Jan 1987. ISSN 0910-5050 (Print) 0910-5050.

IZUMIYA, M. et al. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 9, p. 3847-53, Sep 2012. ISSN 0250-7005.

JACOBETZ, M. A. et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. **Gut**, v. 62, n. 1, p. 112-20, Jan 2013. ISSN 0017-5749.

JANDA, E. et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. **J Cell Biol**, v. 156, n. 2, p. 299-313, Jan 21 2002. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 277-300, Sep-Oct 2010. ISSN 0007-9235.

JIA, L. et al. Preparation, physicochemical characterization and cytotoxicity in vitro of gemcitabine-loaded PEG-PDLLA nanovesicles. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 8, p. 1008-13, Feb 28 2010. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327.

JIAO, L. et al. Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. **Am J Epidemiol**, v. 169, n. 9, p. 1043-51, May 1 2009. ISSN 0002-9262.

JORDAN, C. T. Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 203-5, Mar 6 2009.

JULIEN, S. et al. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. **Oncogene**, v. 26, n. 53, p. 7445-56, Nov 22 2007. ISSN 0950-9232.

JÄNNE, P. A.; MAYER, R. J. Chemoprevention of colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 342, n. 26, p. 1960-8, Jun 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874065> >.

KADABA, R. et al. Imbalance of desmoplastic stromal cell numbers drives aggressive cancer processes. **J Pathol**, v. 230, n. 1, p. 107-17, May 2013. ISSN 0022-3417.

KALLURI, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1417-9, Jun 2009. ISSN 0021-9738.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, Jun 2009. ISSN 0021-9738.

KATO, Y.; KATO, M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 7, p. 873-86, Sep 2009. ISSN 1566-5240.

KAWADA, N. et al. Microinvasion of high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia. **Case Rep Gastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 30-6, Jan 2013. ISSN 1662-0631.



- KENT, O. A. et al. A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 21, p. 2013-24, Nov 2009. ISSN 1538-4047.
- KHASAWNEH, J. et al. Inflammation and mitochondrial fatty acid beta-oxidation link obesity to early tumor promotion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 9, p. 3354-9, Mar 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208810> >.
- KI, C. S.; SHIH, H.; LIN, C. C. Effect of 3D matrix compositions on the efficacy of EGFR inhibition in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 3017-26, Sep 2013. ISSN 1526-4602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889305> >.
- KIM, H. J. et al. PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. **J Drug Target**, v. 20, n. 1, p. 33-42, Jan 2012. ISSN 1026-7158.
- KIM, K.; LU, Z.; HAY, E. D. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. **Cell Biol Int**, v. 26, n. 5, p. 463-76, 2002. ISSN 1065-6995 (Print) 1065-6995.
- KISFALVI, K. et al. Metformin inhibits the growth of human pancreatic cancer xenografts. **Pancreas**, v. 42, n. 5, p. 781-5, Jul 2013. ISSN 0885-3177.
- KLEIN, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 302-12, Apr 2009. ISSN 1474-175x.
- KOKKINOS, M. I. et al. Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. **Placenta**, v. 31, n. 9, p. 747-55, Sep 2010. ISSN 0143-4004.
- KRANTZ, S. B. et al. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression. **J Surg Res**, v. 173, n. 1, p. 105-12, Mar 2012. ISSN 0022-4804.
- KRISHNAMURTHY, J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. **J Clin Invest**, v. 114, n. 9, p. 1299-307, Nov 2004. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.
- LABONNE, C.; BRONNER-FRASER, M. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. **Dev Biol**, v. 221, n. 1, p. 195-205, May 1 2000. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606.
- LAI, E. C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. **Development**, v. 131, n. 5, p. 965-73, Mar 2004. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991.
- LAN, L. et al. Upregulation of myosin Va by Snail is involved in cancer cell migration and metastasis. **Int J Cancer**, v. 126, n. 1, p. 53-64, Jan 1 2010. ISSN 0020-7136.
- LANDI, S. Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature. **Mutat Res**, v. 681, n. 2-3, p. 299-307, Mar-Jun 2009. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107.

LANZA-JACOBY, S. et al. Calorie restriction delays the progression of lesions to pancreatic cancer in the LSL-KrasG12D; Pdx-1/Cre mouse model of pancreatic cancer. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 238, n. 7, p. 787-97, Jul 1 2013. ISSN 1535-3699.

LARSSON, S. C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Methionine and vitamin B6 intake and risk of pancreatic cancer: a prospective study of Swedish women and men. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 113-8, Jan 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241865> >.

LARSSON, S. C. et al. Folate intake and pancreatic cancer incidence: a prospective study of Swedish women and men. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 6, p. 407-13, Mar 15 2006. ISSN 0027-8874.

LARSSON, S. C.; ORSINI, N.; WOLK, A. Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. **Int J Cancer**, v. 120, n. 9, p. 1993-8, May 1 2007. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136.

LEE, C. J.; DOSCH, J.; SIMEONE, D. M. Pancreatic cancer stem cells. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 17, p. 2806-12, Jun 10 2008. ISSN 0732-183x.

LEE, S. H. et al. Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. **Neoplasia**, v. 11, n. 1, p. 22-31, 6p following 31, Jan 2009. ISSN 1476-5586.

\_\_\_\_\_. Antitumor effect of novel small chemical inhibitors of Snail-p53 binding in K-Ras-mutated cancer cells. **Oncogene**, v. 29, n. 32, p. 4576-87, Aug 12 2010. ISSN 0950-9232.

LESINA, M. et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 456-69, Apr 12 2011. ISSN 1535-6108.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-31, Feb 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259> >.

LI, D. et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. **Jama**, v. 301, n. 24, p. 2553-62, Jun 24 2009. ISSN 0098-7484.

\_\_\_\_\_. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1049-57, Mar 27 2004. ISSN 0140-6736.

\_\_\_\_\_. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 482-8, Aug 2009. ISSN 0016-5085.

LI, N.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 429-31, Apr 12 2011. ISSN 1535-6108.

LI, X. et al. Targeting the cancer-stroma interaction: a potential approach for pancreatic cancer treatment. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 17, p. 2404-15, 2012. ISSN 1381-6128.

- LI, Y. **Pancreatic cancer stem cells: emerging target for designing novel therapy**. KONG, D., AHMAD, A., BAO, B., AND SARKAR F.H.: *Cancer Letter*. 10;338 (1): 94-100 p. 2013.
- LI, Y. et al. 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**, v. 69, n. 16, p. 6704-12, Aug 15 2009. ISSN 0008-5472.
- LIN, W. R. et al. Bone marrow-derived cells contribute to cerulein-induced pancreatic fibrosis in the mouse. **Int J Exp Pathol**, v. 93, n. 2, p. 130-8, Apr 2012. ISSN 0959-9673.
- LINDKVIST, B. et al. A prospective study of Helicobacter pylori in relation to the risk for pancreatic cancer. **BMC Cancer**, v. 8, p. 321, 2008. ISSN 1471-2407.
- LIU, F. SMAD4/DPC4 and pancreatic cancer survival. Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 4115-4121, 2001. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 12, p. 3853-6, Dec 2001. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751474> >.
- LIU, L. et al. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. **Nat Genet**, v. 21, n. 1, p. 128-32, Jan 1999. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916806> >.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 781-810, 2004. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706.
- LOPEZ-NOVOA, J. M.; NIETO, M. A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. **EMBO Mol Med**, v. 1, n. 6-7, p. 303-14, Sep 2009. ISSN 1757-4676.
- LU, X.; KANG, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 24, p. 5928-35, Dec 15 2010. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.
- MA, Y. et al. Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer. **Cancer Res**, v. 73, n. 13, p. 3927-37, Jul 1 2013. ISSN 0008-5472.
- MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, Jul 2009. ISSN 1534-5807.
- MAIER, H. J. et al. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Lett**, v. 295, n. 2, p. 214-28, Sep 28 2010. ISSN 0304-3835.
- MAIER, H. J.; WIRTH, T.; BEUG, H. **Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma**. 2058-2083: *Cancers*. 2: 2058-83 p. 2010.
- MAISONNEUVE, P.; MARSHALL, B. C.; LOWENFELS, A. B. Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. **Gut**, v. 56, n. 9, p. 1327-8, Sep 2007. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698876> >.

MAITRA, A. et al. Precursors to invasive pancreatic cancer. **Adv Anat Pathol**, v. 12, n. 2, p. 81-91, Mar 2005. ISSN 1072-4109 (Print) 1072-4109.

MAITRA, A.; HRUBAN, R. H. Pancreatic cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 157-88, 2008. ISSN 1553-4006 (Print) 1553-4006.

MAJMUNDAR, A. J.; WONG, W. J.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 294-309, Oct 22 2010. ISSN 1097-2765.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 459-65, Jun 2003. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

MALVEZZI, M. et al. European cancer mortality predictions for the year 2013. **Ann Oncol**, v. 24, n. 3, p. 792-800, Mar 2013. ISSN 0923-7534.

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-15, May 16 2008. ISSN 0092-8674.

MANZANARES, M.; LOCASCIO, A.; NIETO, M. A. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. **Trends Genet**, v. 17, n. 4, p. 178-81, Apr 2001. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525.

MASUGI, Y. et al. Solitary cell infiltration is a novel indicator of poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. **Hum Pathol**, v. 41, n. 8, p. 1061-8, Aug 2010. ISSN 0046-8177.

MCCLEARY-WHEELER, A. L.; MCWILLIAMS, R.; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. Aberrant signaling pathways in pancreatic cancer: a two compartment view. **Mol Carcinog**, v. 51, n. 1, p. 25-39, Jan 2012. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162229> >.

MIYAKI, M. et al. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. **Oncogene**, v. 18, n. 20, p. 3098-103, May 20 1999. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759.

MURPHY, K. M. et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. **Cancer Res**, v. 62, n. 13, p. 3789-93, Jul 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097290> >.

NAKAKURA, E. K. et al. Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4010-5, Mar 27 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

NAKAYAMA, H.; SCOTT, I. C.; CROSS, J. C. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. **Dev Biol**, v. 199, n. 1, p. 150-63, Jul 1 1998. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606.

NEESSE, A. et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 861-8, Jun 2011. ISSN 0017-5749.

NIETO, M. A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 3, p. 155-66, Mar 2002. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

OHKUBO, T.; OZAWA, M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 9, p. 1675-85, Apr 1 2004. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.

OLIVE, K. P. et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1457-61, Jun 12 2009. ISSN 0036-8075.

ONDER, T. T. et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Res**, v. 68, n. 10, p. 3645-54, May 15 2008. ISSN 0008-5472.

PATEL, A. V. et al. Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 2, p. 459-66, Feb 2005. ISSN 1055-9965 (Print) 1055-9965.

PAZNEKAS, W. A. et al. Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (SNAI1) and a related processed pseudogene (SNAI1P). **Genomics**, v. 62, n. 1, p. 42-9, Nov 15 1999. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543.

PEINADO, H. et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. **Embo j**, v. 24, n. 19, p. 3446-58, Oct 5 2005. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415-28, Jun 2007. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

PEINADO, H.; QUINTANILLA, M.; CANO, A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. **J Biol Chem**, v. 278, n. 23, p. 21113-23, Jun 6 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

- PEIRO, S. et al. Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 7, p. 2077-84, 2006. ISSN 0305-1048.
- PENG, B. et al. Suppression of tumorigenesis and induction of p15(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 11, p. 3628-38, Nov 2002. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.
- PERAN, M. et al. In vitro treatment of carcinoma cell lines with pancreatic (pro)enzymes. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 36, n. 4, p. 289-301, Jul 2013.
- PEREZ-MORENO, M. A. et al. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 27424-31, Jul 20 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.
- PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 1, p. 49-62, Jan 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.
- PERL, A. K. et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature**, v. 392, n. 6672, p. 190-3, Mar 12 1998. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.
- PETERSEN, G. M. et al. Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 4, p. 704-10, Apr 2006. ISSN 1055-9965 (Print) 1055-9965.
- POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265-73, Apr 2009. ISSN 1474-175x.
- POREMBKA, M. R. et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. **Cancer Immunol Immunother**, v. 61, n. 9, p. 1373-85, Sep 2012. ISSN 0340-7004.
- POTENTA, S.; ZEISBERG, E.; KALLURI, R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. **Br J Cancer**, v. 99, n. 9, p. 1375-9, Nov 4 2008. ISSN 0007-0920.
- PRASAD, N. B. et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 5, p. 1619-26, Mar 1 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.
- PROVENZANO, P. P. et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 418-29, Mar 20 2012. ISSN 1535-6108.
- QUINT, K. et al. Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. **Int J Oncol**, v. 41, n. 6, p. 2093-102, Dec 2012. ISSN 1019-6439.

RAIMONDI, S.; MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 12, p. 699-708, Dec 2009. ISSN 1759-5045.

RAMASWAMY, S. et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nat Genet**, v. 33, n. 1, p. 49-54, Jan 2003. ISSN 1061-4036 (Print) 1061-4036.

RAO, T. P.; KUHL, M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. **Circ Res**, v. 106, n. 12, p. 1798-806, Jun 25 2010. ISSN 0009-7330.

RASHEED, Z. A. et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 5, p. 340-51, Mar 3 2010. ISSN 0027-8874.

RHIM, A. D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 349-61, Jan 20 2012. ISSN 0092-8674.

RHIM, H. et al. Localization of a neural crest transcription factor, Slug, to mouse chromosome 16 and human chromosome 8. **Mamm Genome**, v. 8, n. 11, p. 872-3, 1997. ISSN 0938-8990 (Print) 0938-8990.

RKI. **Krebs in Deutschland**. GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER E.V., Z. F. K. 6 2007/2008.

ROBERT-KOCH-INSTITUT.

ROTHWELL, P. M. et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 31-41, Jan 1 2011. ISSN 0140-6736.

ROY, H. K. et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by polyethylene glycol: suppression of epithelial proliferation via modulation of SNAIL/beta-catenin signaling. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 8, p. 2060-9, Aug 2006. ISSN 1535-7163 (Print) 1535-7163.

ROZENBLUM, E. et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. **Cancer Res**, v. 57, n. 9, p. 1731-4, May 1 1997. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

SAKAI, D. et al. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. **Development**, v. 133, n. 7, p. 1323-33, Apr 2006. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991.

SARKAR, F. H. et al. Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. **Minerva Chir**, v. 64, n. 5, p. 489-500, Oct 2009. ISSN 0026-4733 (Print) 0026-4733.

SAVAGNER, P. et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. **J Cell Physiol**, v. 202, n. 3, p. 858-66, Mar 2005. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541.

SCARLETT, C. J. et al. Recruitment and activation of pancreatic stellate cells from the bone marrow in pancreatic cancer: a model of tumor-host interaction. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26088, 2011. ISSN 1932-6203.

SEIDEL, B. et al. E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. **Oncogene**, v. 23, n. 32, p. 5532-42, Jul 15 2004. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

SEKELSKY, J. J. et al. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 139, n. 3, p. 1347-58, Mar 1995. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731.

SHEN, R. et al. The biological features of PanIN initiated from oncogenic Kras mutation in genetically engineered mouse models. **Cancer Lett**, v. 339, n. 1, p. 135-43, Oct 1 2013. ISSN 0304-3835.

SHERR, C. J. The INK4a/ARF network in tumour suppression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 10, p. 731-7, Oct 2001. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

SHI, C.; HRUBAN, R. H.; KLEIN, A. P. Familial pancreatic cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 3, p. 365-74, Mar 2009. ISSN 1543-2165. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19260742> >.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, Jun 13 2003. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

SHIELDS, M. A. et al. Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 12, p. 10495-504, Mar 25 2011. ISSN 0021-9258.

SIEGEL, P. M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807-21, Nov 2003. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

SINGH, A. et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 489-500, Jun 2 2009. ISSN 1535-6108.

SINGH, A.; SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741-51, Aug 26 2010. ISSN 0950-9232.



SINGH, P.; WIG, J. D.; SRINIVASAN, R. The Smad family and its role in pancreatic cancer. **Indian J Cancer**, v. 48, n. 3, p. 351-60, Jul-Sep 2011. ISSN 0019-509x.

SJOLUND, J. et al. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 17, p. 2620-9, Nov 2005. ISSN 0959-8049 (Print) 0959-8049.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. et al. Helicobacter pylori seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 12, p. 937-41, Jun 2001. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11416115> >.

SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol Biol**, v. 716, p. 157-68, 2011. ISSN 1064-3745.

TAN, M. C. et al. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. **J Immunol**, v. 182, n. 3, p. 1746-55, Feb 1 2009. ISSN 0022-1767.

TANIGUCHI, S.; IWAMURA, T.; KATSUKI, T. Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) and sublines. **Clin Exp Metastasis**, v. 10, n. 4, p. 259-66, Jul 1992. ISSN 0262-0898 (Print) 0262-0898.

TARIN, D.; THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 5996-6000; discussion 6000-1, Jul 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442-54, Jun 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov 25 2009. ISSN 0092-8674.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 131-42, Feb 2006. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

UCHIKADO, Y. et al. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 3, p. 1174-80, Feb 1 2005. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

VALDES, F. et al. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. **Mol Cancer Res**, v. 1, n. 1, p. 68-78, Nov 2002. ISSN 1541-7786 (Print) 1541-7786.

VAN CUTSEM, E. et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1430-8, Apr 2004. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084616> >.

VON BURSTIN, J. et al. E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. **Gastroenterology**, v. 137, n. 1, p. 361-71, 371.e1-5, Jul 2009. ISSN 0016-5085.

VONLAUFEN, A. et al. Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. **Cancer Res**, v. 68, n. 19, p. 7707-10, Oct 1 2008. ISSN 0008-5472.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-31, May 1 2009. ISSN 0092-8674.

WALI, R. K. et al. Polyethylene glycol-mediated colorectal cancer chemoprevention: roles of epidermal growth factor receptor and Snail. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n. 9, p. 3103-11, Sep 2008. ISSN 1535-7163 (Print) 1535-7163.

WANG, S. P. et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 694-704, Jun 2009. ISSN 1465-7392.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. Garland Science: Whitehead Institute for Biomedical Research. 1st Edition: 311 p. 2006.

WELLNER, U. et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 12, p. 1487-95, Dec 2009. ISSN 1465-7392.

WILENTZ, R. E. et al. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. **Cancer Res**, v. 58, n. 20, p. 4740-4, Oct 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788631> >.

WIPFF, P. J.; HINZ, B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. **Eur J Cell Biol**, v. 87, n. 8-9, p. 601-15, Sep 2008. ISSN 0171-9335 (Print) 0171-9335.

WU, Y. et al. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. **Cancer Cell**, v. 15, n. 5, p. 416-28, May 5 2009. ISSN 1535-6108.

XU, J.; AMIJI, M. Therapeutic gene delivery and transfection in human pancreatic cancer cells using epidermal growth factor receptor-targeted gelatin nanoparticles. **J Vis Exp**, n. 59, p. e3612, 2012. ISSN 1940-087x.

YANG, M. H. et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 10, p. 982-92, Oct 2010. ISSN 1465-7392.

YANG, M. H.; WU, K. J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. **Cell Cycle**, v. 7, n. 14, p. 2090-6, Jul 15 2008. ISSN 1551-4005.

YANG, Z. et al. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3179-84, Apr 15 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

YIN, T. et al. Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance. **J Surg Res**, v. 141, n. 2, p. 196-203, Aug 2007. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804.

ZAMBONI, G. et al. Precancerous lesions of the pancreas. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 27, n. 2, p. 299-322, Apr 2013. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23809247> >.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.; YARBROUGH, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 725-34, Mar 20 1998. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

ZHAO, M. et al. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. **Cancer Lett**, v. 337, n. 2, p. 210-7, Sep 1 2013. ISSN 0304-3835.

ZHENG, L. et al. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1230-40, Jun 2013. ISSN 0016-5085.

ZHOU, B. P. et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 931-40, Oct 2004. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392.

ZHOU, B. P.; HUNG, M.-C. Wnt, Hedgehog, and Snail: Sister Pathways That Control by GSK-3beta and beta-Trcp in the Regulation of Metastasis. **Cell Cycle**, v. 4, n. 6, p. 772-776, 06/01 2005. Disponível em: < <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/1744/> >.

## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Prof. Dr. Gerhard Aumüller

Prof. Dr. Peter Barth

Prof. Dr. Detlef Bartsch

Prof. Dr. Erika Baum

Prof. Dr. Thomas Behr

Prof. Dr. Roswitha Berger

Prof. Dr. Siegfried Bien

PD Dr. rer. nat. Malte Buchholz

Prof. Dr. Frank Czubayko

Prof. Dr. Jürgen Daut

Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic

Prof. Dr. Volker Fendrich

Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann

Prof. Dr. Christian Görg

Prof. Dr. Michael Hertl

Prof. Dr. Rainer Hofmann

Prof. Dr. Joachim Hoyer

Prof. Dr. Volker Klingmüller

Prof. Dr. Klaus Jochen Klose

Prof. Dr. Jan Koolman

Prof. Dr. Peter Langer

Prof. Dr. Roland Lill

Prof. Dr. Michael Lohoff

Prof. Dr. Rolf Felix Maier

Prof. Dr. Bernhard Maisch

Prof. Dr. Roland Moll

Prof. Dr. Rainer Moosdorf

Prof. Dr. Ulrich Müller

Prof. Dr. Wolfgang Hermann Oertel

Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher

Prof. Dr. Harald Renz  
Prof. Dr. Gerd Richter  
Prof. Dr. Frank Rose  
Prof. Dr. Matthias Rothmund  
Prof. Dr. Steffen Ruchholtz  
Prof. Dr. Helmut Schäfer  
Prof. Dr. Markus Schofer  
Prof. Dr. Andreas Sesterhenn  
Prof. Dr. Walter Sekundo  
Prof. Dr. Afshin Teymoortash  
Prof. Dr. Claus Vogelmeier  
PD Dr. Jens Waldmann  
Prof. Dr. Uwe Wagner  
Prof. Dr. Eberhard Weihe  
Prof. Dr. Jochen Werner  
Prof. Dr. Hinnerk Wulff  
PD Dr. Ralph Peter Zettl

## **9.2 Danksagung**

An meine Familie und Freunde und alle die an mich geglaubt haben.