

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

Etablierung und Charakterisierung eines neuen zellbasierten Modellsystems
zur Analyse der Signaltransduktion von onkogenem Kras im Pankreas

Sandra Diersch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. B. Küster
2. Priv.-Doz. Dr. G. Schneider

Die Dissertation wurde am 16.12.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14.04.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Das Pankreas	1
1.1.1. Anatomie und Physiologie	1
1.1.2. Embryonale Entwicklung	2
1.2. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	3
1.2.1. Statistik, Prognosen und Therapiemöglichkeiten	3
1.2.2. Progressionsmodell und Biologie des Pankreaskarzinoms	4
1.2.3. Mausmodelle der Pankreaskarzinogenese	6
1.3. Das Tamoxifen induzierbare Cre ^{ERT2} -System zur Kontrolle der Genaktivität	7
1.4. Die Signaltransduktion von onkogenem Ras	8
1.4.1. Die Regulation des Ras-Proteins	8
1.4.2. Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg	8
1.5. Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie	10
1.5.1. Struktur und Funktion	10
1.5.2. Das Fos-Mitglied <i>Fos-related antigen 1</i> , <i>Fra1</i>	11
1.6. Der Zellzyklus	12
1.7. Der CDK-Inhibitor p27 ^{Kip1}	13
1.7.1. Funktion und Regulation	13
1.7.2. Die Rolle von p27 ^{Kip1} als prognostischer Marker in soliden Tumoren	15
1.8. Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material	17
2.1. Technische Geräte und Hilfsmittel	17
2.2. Verbrauchsmaterialien	19
2.3. Chemikalien und allgemeine Reagenzien	21
2.4. Enzyme	22
2.5. Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)	23
2.6. Plasmide und Bakterienstämme	24
2.7. Oligonukleotide	24
2.8. Antikörper	27
2.9. Puffer und Lösungen	28
2.10. Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur	30
2.11. Reagenzien und Lösungen für die Histochemie	34
3. Methoden	36
3.1. Zellkultur	36
3.1.1. Isolierung primärer duktales Pankreaszellen aus der Maus	36

3.1.2.	Passagieren und Einfrieren primärer duktaler Pankreaszellen.....	36
3.1.3.	Behandlung der dukталen Pankreaszellen mit 4-Hydroxytamoxifen.....	37
3.1.4.	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Pankreaskarzinomzellen.....	37
3.1.5.	siRNA-Transfektion muriner Pankreaskarzinomzellen.....	38
3.1.6.	Behandlung der Zellen mit MEK-Inhibitor.....	39
3.1.7.	MTT-Test.....	39
3.1.8.	Caspase-Assay.....	40
3.1.9.	Annexin V-Färbung.....	40
3.1.10.	Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität.....	40
3.1.11.	Präparation von Ganzzellextrakten.....	40
3.1.12.	Präparation von nukleären und zytosolischen Zellextrakten.....	41
3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.1.	Transformation von Bakterien.....	42
3.2.2.	Präparation von Plasmid-DNA.....	42
3.2.3.	Isolierung genomischer DNA.....	42
3.2.4.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	43
3.2.5.	Agarosegelelektrophorese.....	44
3.2.6.	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	44
3.2.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
3.2.8.	<i>Western Blot</i>	46
3.2.9.	Ras-Aktivierungs-Assay.....	47
3.2.10.	RNA-Isolierung.....	47
3.2.11.	cDNA-Synthese.....	48
3.2.12.	Quantitative Echtzeit-PCR.....	48
3.2.13.	Transkriptomanalysen mittels Microarray.....	50
3.3.	<i>In vivo</i> Analysen.....	51
3.3.1.	Tierhaltung.....	51
3.3.2.	Mauslinien und Zuchtstrategien.....	51
3.3.3.	Genotypisierung der Mäuse.....	53
3.3.4.	Sektion der Mäuse.....	54
3.3.5.	Orthotope Implantation von Pankreaszellen.....	54
3.3.6.	Histologische Studien.....	54
3.3.6.1.	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	54
3.3.6.2.	Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung.....	55
3.3.6.3.	Alzianblau-Färbung.....	55
3.3.6.4.	Immunhistochemie.....	55
3.3.6.4.1.	Humaner Gewebe-Array.....	56
3.3.6.5.	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	56
3.3.6.6.	TO-PRO-3-/Phalloidin-Färbung.....	57
3.4.	Statistische Auswertung.....	57
3.4.1.	Generelle statistische Auswertung.....	57
3.4.2.	Analyse der Microarray-Daten.....	57

4. Ergebnisse	59
4.1. Etablierung eines primären zellulären Modellsystems.....	59
4.1.1. Isolierung und Charakterisierung primärer duktaler Zellen des murinen Pankreas.....	59
4.1.2. Rekombinationseffizienz in primären dukталen Pankreaszellen.....	60
4.1.3. Die Expression von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} führt in primären dukталen Zellen zur Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs.....	61
4.1.4. Synchrone Aktivierung von <i>Kras</i> ^{G12D} und Inaktivierung von <i>Cdkn2a</i> führt zur malignen Transformation von primären dukталen Pankreaszellen	62
4.1.5. Synchrone Aktivierung von <i>Kras</i> ^{G12D} und Expression des mutierten Tumorsuppressors <i>Trp53</i> ^{R172H} resultiert in der malignen Transformation primärer duktaler Pankreaszellen.....	64
4.1.6. Die Expression von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} führt in primären dukталen Pankreaszellen zu einer erhöhten Zellproliferation.....	65
4.2. <i>In vivo</i> Analyse des Tumorsuppressors p27 ^{Kip1}	66
4.2.1. Die Funktion von p27 ^{Kip1} in der Tumorgenese <i>Kras</i> ^{G12D} induzierter muriner Pankreaskarzinome	66
4.2.2. p27 ^{Kip1} ist ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor in <i>Kras</i> ^{G12D} induzierten murinen Pankreaskarzinomen	67
4.2.3. Murine Pankreaskarzinomzellen weisen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von p27 ^{Kip1} auf.....	69
4.2.4. Die verminderte Expression von p27 ^{Kip1} hat keinen Einfluss auf die Viabilität und die Proliferation von murinen Pankreaskarzinomzellen.....	70
4.2.5. Die Reduktion der p27 ^{Kip1} -Expression in <i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen fördert Gendosis abhängig die Entstehung von Gallengangskarzinomen	73
4.2.6. Die verminderte Expression von p27 ^{Kip1} akzeleriert die Entstehung <i>PIK3CA</i> ^{H1047R} induzierter muriner Gallengangskarzinome	75
4.3. Signaltransduktion von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} im primären Zellsystem.....	77
4.3.1. Funktionale Analyse der Signaltransduktion von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} in primären dukталen Zellen des murinen Pankreas	77
4.3.2. Die Aktivierung von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} induziert in primären dukталen Pankreaszellen die Expression von Fra1	78
4.4. Analyse des AP-1-Mitglieds Fra1 in der Karzinogenese des Pankreas	79
4.4.1. Die Aktivierung von onkogenem <i>Kras</i> ^{G12D} im murinen Pankreas resultiert in einer erhöhten Fra1-Expression	79
4.5. Funktionale Analyse von Fra1 in der Tumoraufrechterhaltung	82
4.5.1. Fra1 wird im dukталen Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert	82
4.5.2. Fra1-Expressionsraten in verschiedenen dukталen Zelllinien des Pankreas	82
4.5.3. Die siRNA vermittelte Depletion von <i>Fra1</i> resultiert in einer verminderten Viabilität muriner Pankreaskarzinomzellen.....	84
4.5.4. Die Verminderung von Fra1 induziert in murinen Pankreaskarzinomzellen keine Apoptose.....	86

4.5.5. <i>Fra1</i> depletierte murine Pankreaskarzinomzellen zeigen eine Aktivierung pro-inflammatorischer genetischer Programme.....	87
4.5.6. Analyse der Expression von Cytokinen in <i>Kras</i> ^{G12D} induzierten primären duktalem Pankreaszellen.....	89
4.6. <i>In vivo</i> Analyse der Deletion von <i>Fra1</i> in der <i>Kras</i> ^{G12D} induzierten Karzinogenese des Pankreas.....	90
5. Diskussion.....	93
5.1. Etablierung eines Tamoxifen induzierbaren primären Zellsystems des Pankreas zur Studie der Signaltransduktion von onkogenem <i>Kras</i>	93
5.2. Die duktalem Pankreaszelle – eine potentielle Ursprungszelle des PDAC?.....	95
5.3. Die Relevanz des Tumorsuppressors p27 ^{Kip1} in der Karzinogenese <i>Kras</i> ^{G12D} induzierter muriner Pankreaskarzinome.....	96
5.4. p27 ^{Kip1} – ein essentieller Tumorsuppressor im Epithel des Gallengangs.....	99
5.5. Das AP-1-Mitglied <i>Fra1</i> als potentielle therapeutische Zielstruktur im PDAC.....	100
5.6. Effekte der <i>Fra1</i> -Depletion in murinen PDAC-Zellen.....	101
5.7. Hinweise auf eine Stroma assoziierte Funktion von <i>Fra1</i> in der Tumorgenese des murinen PDAC.....	103
5.8. Ausblick.....	105
6. Zusammenfassung.....	107
7. Summary.....	109
8. Literaturverzeichnis.....	111
9. Eigene Veröffentlichungen.....	127
10. Danksagung.....	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Anatomie des Pankreas.....	1
Abbildung 1-2: Progressionsmodell des PDAC.....	5
Abbildung 1-3: Das Tamoxifen induzierbare Cre ^{ERT2} -System zur Steuerung der Genaktivität.....	7
Abbildung 1-4: Die Signaltransduktion von aktiviertem Ras.....	9
Abbildung 1-5: Regulation des <i>Fra1</i> -Gens.....	11
Abbildung 1-6: Modell der Regulation von p27 ^{Kip1}	14
Abbildung 4-1: Morphologie und Expressionsmuster primärer muriner duktaler Pankreaszellen (PDCs).....	59
Abbildung 4-2: Rekombinationseffizienz in murinen PDCs.....	60
Abbildung 4-3: Aktivierung von onkogenem Kras ^{G12D} in PDCs.....	61
Abbildung 4-4: Die Inaktivierung von <i>Cdkn2a</i> führt zur malignen Transformation <i>Kras</i> ^{G12D} induzierter PDCs.....	62
Abbildung 4-5: Induzierte PDCs aus <i>R26-Cre</i> ^{ERT2/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>Cdkn2a</i> ^{lox/lox} -Mäusen bilden metastasierende PDACs in NSG-Mäusen aus.....	63
Abbildung 4-6: Die Koexpression von mutiertem <i>Trp53</i> ^{R172H} mit <i>Kras</i> ^{G12D} führt zur malignen Transformation primärer PDCs.....	64
Abbildung 4-7: Die Aktivierung von onkogenem Kras ^{G12D} führt in PDCs zu einer gesteigerten Proliferation.....	65
Abbildung 4-8: Einfluss von p27 ^{Kip1} in frühen Stadien der Tumorgenese des Pankreas in <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen.....	67
Abbildung 4-9: p27 ^{Kip1} ist ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor im <i>Kras</i> ^{G12D} - induzierten PDAC.....	68
Abbildung 4-10: Eine verminderte Expression von p27 ^{Kip1} resultiert in einer erhöhten Metastasierungsrate im murinen <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -PDAC.....	69
Abbildung 4-11: Subzelluläre Lokalisation von p27 ^{Kip1} in murinen PDAC-Zellen.....	70
Abbildung 4-12: Proliferation und Viabilität muriner PDAC-Zellen sind unabhängig von der p27 ^{Kip1} -Expression.....	71
Abbildung 4-13: Verminderte Cyclin D1-Expression in p27 ^{Kip1} defizienten murinen Pankreastumorzellen.....	72
Abbildung 4-14: Funktionale Rolle des Tumorsuppressors p27 ^{Kip1} bei der Entstehung von Gallengangskarzinomen im <i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mausmodell.....	73
Abbildung 4-15: Eine verminderte Expression des Tumorsuppressors p27 ^{Kip1} akzeleriert die Entstehung von Gallengangskarzinomen im <i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} - Mausmodell.....	74

Abbildung 4-16: Modulatorische Effekte von p27 ^{Kip1} auf die PI3K-AKT-Signaltransduktion...	76
Abbildung 4-17: Die Aktivierung von onkogenem Kras ^{G12D} führt in primären PDCs zur Induktion von AP-1-Zielgenen	77
Abbildung 4-18: Induktion des AP-1-Mitglieds Fra1 in primären PDCs nach Aktivierung von Kras ^{G12D}	78
Abbildung 4-19: Fra1-Expression im Pankreasgewebe von <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen.....	80
Abbildung 4-20: α-Sma-Expression in Fra1-positiven Arealen des Pankreasgewebes von <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen	81
Abbildung 4-21: Proliferationsrate in Fra1-positiven Arealen des Pankreasgewebes von <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mäusen	81
Abbildung 4-22: Fra1-Expression im PDAC.....	82
Abbildung 4-23: Fra1-Expression in murinen PDCs, PanIN- und PDAC-Zellen	83
Abbildung 4-24: <i>Fra1</i> -depletierte murine PDAC-Zellen weisen eine verminderte Zellviabilität auf	85
Abbildung 4-25: Die Depletion von <i>Fra1</i> induziert keine Apoptose in murinen PDAC-Zellen.....	86
Abbildung 4-26: Aktivierung des inflammatorischen Transkriptoms in <i>Fra1</i> -depletierten murinen PDAC-Zellen	88
Abbildung 4-27: Induktion von Genen des NFκB-Signalwegs in <i>Fra1</i> -depletierten murinen PDAC-Zellen	89
Abbildung 4-28: Cytokin-Expression in primären PDCs nach Aktivierung von Kras ^{G12D}	89
Abbildung 4-29: Pankreasspezifische Inaktivierung von <i>Fra1 in vivo</i>	91
Abbildung 4-30: Funktionale Analyse der Deletion von <i>Fra1</i> in der frühen Karzinogenese des Pankreas im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} -Mausmodell	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Technische Geräte und Hilfsmittel	17
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2-3: Chemikalien und allgemeine Reagenzien	21
Tabelle 2-4: Enzyme.....	22
Tabelle 2-5: Gebrauchsfertige Reagenziensätze	23
Tabelle 2-6: Plasmide.....	24
Tabelle 2-7: Bakterienstämme.....	24
Tabelle 2-8: Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für die Genotypisierung.....	24
Tabelle 2-9: Sequenzen der murinen Oligonukleotide (Primer) für die Echtzeit-PCR.....	25
Tabelle 2-10: Sequenzen der Oligonukleotide für den <i>Gel Shift Assay</i> (EMSA).....	26
Tabelle 2-11: murine siRNA-Sequenzen	26
Tabelle 2-12: primäre Antikörper	27
Tabelle 2-13: sekundäre Antikörper.....	28
Tabelle 2-14: Puffer für DNA-Analysen.....	28
Tabelle 2-15: Puffer und Lösungen für den <i>Gel Shift Assay</i> (EMSA)	29
Tabelle 2-16: Puffer und Lösungen für <i>Western Blot</i> -Analysen.....	29
Tabelle 2-17: Puffer für die Präparation nukleärer/zytosolischer Zellextrakte.....	30
Tabelle 2-18: Lösungen für die Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase-Färbung.....	30
Tabelle 2-19: Puffer für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien	30
Tabelle 2-20: Primäre duktale murine Pankreaszelllinien	30
Tabelle 2-21: Primäre Zelllinien aus murinen Pankreastumoren.....	31
Tabelle 2-22: Reagenzien für die Zellkultur	32
Tabelle 2-23: Medien für die Zellkultur.....	33
Tabelle 2-24: Lösungen für die Isolierung primärer duktaler Pankreaszellen	34
Tabelle 2-25: Reagenzien für histochemische Analysen.....	34
Tabelle 2-26: Lösungen für histochemische Analysen.....	35
Tabelle 3-1: Ansatz für siRNA-Transfektionen.....	38
Tabelle 3-2: Reaktionsansatz und Bedingungen für Standard-PCRs.....	43
Tabelle 3-3: Bedingungen und Bandengrößen der Genotypisierungs-PCRs	43
Tabelle 3-4: Ansatz für die Bindungsreaktion (EMSA)	45
Tabelle 3-5: Ansatz für die Gelpräparation (EMSA)	45
Tabelle 3-6: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele	46
Tabelle 3-7: Reaktionsansatz und Programm der Reversen Transkription	48
Tabelle 3-8: Reaktionsansatz und Programm der quantitativen Echtzeit-PCR.....	49
Tabelle 3-9: Verdünnungen der primären Antikörper für die Immunhistochemie.....	56

Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
α -Sma	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADM	Azinär-duktales Metaplasie
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ARF	Alternative reading frame
BillIN	Biliäre intraepitheliale Neoplasie
bp	Basenpaare
BPE	<i>Bovine pituitary extract</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	<i>(C-C motif) ligand</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	komplementäre DNA
c-Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
CK	Cytokeratin
CKI	CDK-Inhibitor
cm	Zentimeter
c-Myc	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
COX-2	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
CXCL	<i>(C-X-C motif) ligand</i>
D	Aspartat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHC	<i>Ductus hepatocholedochus</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPC4	<i>SMAD family member 4 (SMAD4)</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

EGFR	<i>EGF receptor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
ER	Östrogenrezeptor
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii, (lateinische Bedeutung für "und andere")</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanat</i>
Fra1	<i>Fos-related antigen 1</i>
G	Glycin
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanosine nucleotide exchange factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCC	Leberzellkarzinom (<i>Hepatocellular carcinoma</i>)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HER-2/Neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IL6	Interleukin 6
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JNK	<i>JUN amino-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KPC	<i>Kip1 ubiquitinating promoting complex</i>
Kras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LSL	LoxP-Stop-LoxP
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mut	mutiert

n	Anzahl
NES	<i>Normalized enrichment score</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
Ngn3	<i>Neurogenin 3</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSG	<i>NOD-scid-Il2Rg^{null}</i>
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas (<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
PDCs	duktales Pankreaszellen (<i>Pancreatic ductal cells</i>)
Pdx1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pmol	picomol
PPT	Primärer Pankreastumor (<i>Primary pancreatic tumor</i>)
PSCs	Pankreatische Stellatzellen (<i>Pancreatic stellate cells</i>)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Ptf1a	<i>Pancreas specific transcription factor 1a</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R26	Rosa26
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Rb	Retinoblastom
RBD	<i>Ras binding domain</i>
RCE	<i>Retinoblastoma control element</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RSK	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box protein</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SGK	<i>Serum/glucocorticoid regulated kinase</i>
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>

siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Skp2	<i>S-phase kinase associated protein 2</i>
Sox9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
SRC	<i>v-Src avian sarcoma viral oncogene homolog</i>
SRE	<i>Serum response element</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N',N'-Tetramethyldiamin</i>
TGE	Tris-Glycin-EDTA
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat</i>
TRE	<i>TPA responsive element</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp53	<i>Transformation related protein 53</i>
U	<i>Unit</i>
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1. Das Pankreas

1.1.1. Anatomie und Physiologie

Das Pankreas nimmt aufgrund der Steuerung wichtiger physiologischer Prozesse eine zentrale Rolle im Gastrointestinaltrakt ein. Die beiden funktionalen Einheiten des Pankreas bestehen aus einem endokrinen Anteil, der durch Freisetzung von Hormonen in den Blutkreislauf die Glucose Homeostase und weitere metabolische Prozesse reguliert, und einem exokrinen Anteil, in dem die Vorstufen der Verdauungsenzyme (Zymogene) produziert werden. Letztere werden über den Ausführungsgang des Pankreas weitergeleitet, der gemeinsam mit dem Hauptgallengang (*Ductus choledochus*) in das Duodenum mündet (Abb. 1-1A). Das exokrine Pankreas umfasst ca. 80% der Gesamtmasse des Organs und setzt sich aus einem verzweigten Netzwerk von azinären, zentroazinären und dukталen Zellen zusammen (Abb. 1-1B; Hezel *et al.*, 2006).

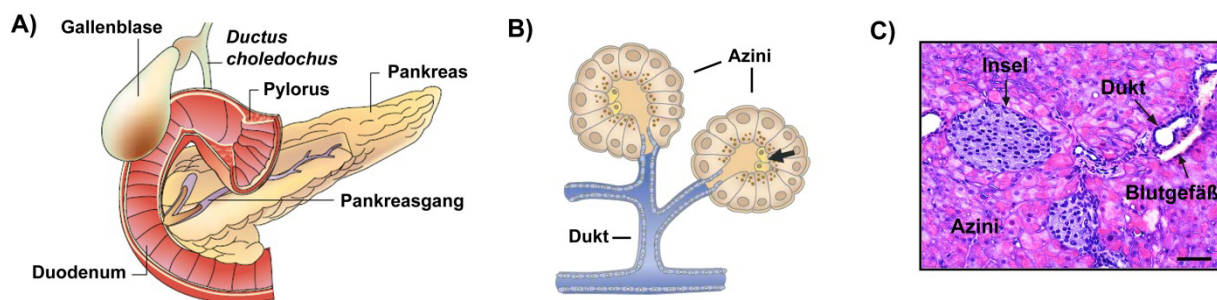


Abb. 1-1: Anatomie des Pankreas. **A)** Graphische Darstellung der Anatomie des Pankreas mit seiner Verbindung zum Duodenum und dem Gallengang (modifiziert nach Bardeesy & DePinho, 2002). **B)** Repräsentation einer funktionalen Einheit azinärer Zellen im Verhältnis zu dukталen Strukturen des Pankreas. Zentroazinäre Zellen sind durch einen Pfeil markiert (modifiziert nach Hezel *et al.*, 2006). **C)** Hämatoxylin und Eosin gefärbter Gewebeschnitt des Pankreas einer Wildtyp-Maus zur Demonstration der exokrinen und endokrinen Anteile (Maßstabsbalken entspricht 50 μm).

Die Synthese und Freisetzung der Zymogene erfolgt in den azinären Zellen, die am Ende dukталer Strukturen in geclusterten Einheiten organisiert sind. Das tubuläre Gangsystem des Pankreas ist von einem Epithel dukталer Zellen ausgekleidet, die ein bicarbonat- und mucin-haltiges Sekret produzieren und der Weiterleitung der Zymogene in das Duodenum dienen. Das endokrine Pankreas besteht aus den sogenannten Langerhans-Inseln (Abb. 1-1C), die sich aus den α -, β -, δ -, ϵ - und den das Pankreatische Polypeptid (PP)-sezernierenden Zellen zusammensetzen. Diese Zellarten produzieren die Pankreashormone Insulin, Glucagon, Somatostatin und PP. Die Freisetzung der Hormone wird durch die Interaktion endokriner und vaskulärer Zellen sowie durch neuronale Signale gesteuert (Slack, 1995).

1.1.2. Embryonale Entwicklung

Die Entwicklung aller Zellarten des Pankreas geht aus einer gemeinsamen multipotenten Zellpopulation des Endoderms des Vorderdarms hervor, welche ebenfalls als Vorläuferzellen der Leber und des Gallengangs dienen (Edlund, 2002; Wandzioch & Zaret, 2009). Die Organogenese des murinen Pankreas ist erstmals zwischen Tag 8.5 (E8.5) und E9.5 des Embryonalstadiums nachweisbar (Slack, 1995). Nach Verdickung des dorsalen Vorderdarm-Endoderms und dessen Ausstülpung in das umgebende Mesenchym kommt es zwischen E9.5 und E12.5 zu einer aktiven Proliferation der Progenitorzellen des Pankreas und zur Ausbildung der pankreatischen Anlage (Pan & Wright, 2011). Während dieser Entwicklungsphase entstehen die ersten differenzierten endokrinen Zellen des Pankreas (Pictet *et al.*, 1972). Durch Rotation des Darmrohrs kommt es im nächsten Schritt (~E13) zur Fusion der dorsalen und ventralen Pankreasknospen (Edlund, 2002). Die zweite Entwicklungsphase des Pankreas (ab E12.5) ist von einem progressiven Wachstum und Umbau epithelialer Strukturen geprägt, wobei es zur Ausbildung sogenannter „tip“- und „trunk“-Domänen kommt (Pan & Wright, 2011). Dieser Prozess entscheidet über das Differenzierungspotential der hierbei definierten azinären- (tip) und bipotent endokrin/duktalen (trunk) Progenitorzellen (Zhou *et al.*, 2007). In einer Differenzierungsphase (ab E13.5) entstehen alle Zelltypen des exo- und endokrinen Pankreas, wobei sich azinäre und duktale Zellen ab E15 histologisch unterscheiden lassen (Pictet *et al.*, 1972; Gittes, 2009). Der Entwicklungsprozess des Pankreas unterliegt der Regulation durch bestimmte Signalwege und einem definierten Expressionsmuster verschiedener Transkriptionsfaktoren. Eine zentrale Rolle bei der Induktion der Pankreasentwicklung durch Interaktion mit benachbarten ekto- und mesodermalen Geweben spielen Mitglieder des *Hedgehog*-, *Notch*- und *Wnt*-Signalwegs, sowie andere Signalmoleküle, wie *Transforming growth factor (TGF)- β* , *Fibroblast growth factor (FGF)* und *Retinoic acid (RA)* (Kim & Hebrok, 2001). Die multipotenten Progenitorzellen des Pankreasepithels, die als Vorläuferzellen aller Pankreaszelltypen definiert sind, zeichnen sich durch ein einheitliches, zum Teil zeitlich überlappendes (E8.5 bis E11.5) Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren *Pdx1*, *Ptf1a*, *Sox9*, *Hes1*, *Hnf1 β* und *Nkx6* aus (Pan & Wright; 2011). Als Schlüsselfaktor unter diesen Transkriptionsfaktoren konnte anhand genetischer Studien *Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1)* identifiziert werden, dessen Expression bereits in der frühen Entwicklungsphase des Pankreas (ab E8.5) nachweisbar ist. Die essentielle Funktionalität von *Pdx1* für die Entwicklung des Pankreas wurde anhand von *Pdx1* defizienten Mäusen demonstriert, die kein Pankreas entwickeln (Jonsson *et al.*, 1994). Im adulten Pankreasgewebe ist die *Pdx1*-Expression dagegen hauptsächlich auf β -Zellen des endokrinen Teils beschränkt (Offield *et al.*, 1996). Ein weiterer wichtiger Regulator der Pankreasorganogenese ist der Transkriptionsfaktor *Ptf1a/p48*, der zum Zeitpunkt E9.5 des Embryonalstadiums exprimiert wird und in späteren Entwicklungsstadien die Differenzierung und Funktion von Azinuszellen steuert (Krapp *et al.*, 1998). Die Differenzierung endokriner Zelllinien wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor *Ngn3* initiiert (Schwitzgebel *et al.*, 2000).

1.2. Das duktale Adenokarzinom des Pankreas

1.2.1. Statistik, Prognosen und Therapiemöglichkeiten

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit ca. 90% der häufigste maligne Tumor dieses Organs, der aus transformierten Zellen des exokrinen Pankreas hervorgeht. Zu den potentiellen Risikofaktoren, die in verschiedenen Studien mit der Entwicklung von Pankreaskarzinomen assoziiert werden konnten, zählen Tabakkonsum, erhöhtes Alter, chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und familiäre Disposition (Hidalgo, 2010).

Trotz des eher geringen Anteils mit ca. 3% an der Gesamtrate aller Krebserkrankungen, gehört das Pankreaskarzinom zu den aggressivsten Krebsformen. Dies spiegelt sich anhand der Krebsstatistik der USA für das Jahr 2012 wieder, in der neben 43.920 Neuerkrankungen für das Pankreaskarzinom auch 37.390 Todesfälle registriert wurden, was die schlechte Prognose dieser Erkrankung verdeutlicht (Siegel *et al.*, 2012). In der Rangfolge aller krebsassoziierten Todesfälle beider Geschlechter steht das PDAC sowohl in den USA als auch in Europa an vierter Stelle (Siegel *et al.*, 2012; Malvezzi *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den eher rückläufigen Mortalitätsraten für andere Krebsarten weisen Prognosen des Zentrums für Krebsregisterdaten am Robert Koch-Institut in Deutschland zudem auf einen leichten Anstieg der Mortalitätsraten des Pankreaskarzinoms hin (Haberland *et al.*, 2012). Die schlechte Prognose für das PDAC beruht auf unspezifischen bzw. fehlenden Symptomen und Diagnosemöglichkeiten in frühen Stadien, frühzeitiger Absiedlung von Tumorzellen in Blutgefäße, Nervenzellen und andere Organe sowie auf einer hohen Chemotherapieresistenz dieser Krebsart, was in einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 6% resultiert (Sant *et al.*, 2009; Siegel *et al.*, 2012). Die einzige potentielle Heilungsoption stellt die operative Entfernung des Tumors dar, die jedoch nur für ca. 15-20% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose in Frage kommt und zu einer Erhöhung der 5-Jahres-Überlebenszeit auf 20-25% führt (Oettle *et al.*, 2007). In der Chemotherapie des PDAC hat sich das Cytidin-Analogon Gemcitabin als Standardtherapie etabliert, dessen zytostatische Wirkung jedoch begrenzt ist (Burris *et al.*, 1997). Die Kombination mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib resultierte nur in einer moderaten Verbesserung der Überlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittenem PDAC (Moore *et al.*, 2007). Eine neuere Studie zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil von Patienten mit metastasiertem PDAC, die mit FOLFIRINOX (5-Fluoruracil, Leukovorin, Irinotecan, Oxaliplatin) behandelt wurden. Diese Patienten erreichten eine mittlere Überlebenszeit von 11,1 Monaten im Vergleich zu 6,8 Monaten der Gemcitabin behandelten Gruppe. Gegenüber Gemcitabin ist die Therapie mit FOLFIRINOX jedoch von einer höheren Toxizität und stärkeren Nebenwirkungen begleitet (Conroy *et al.*, 2011). Diese bisher nur unzureichenden Therapiemöglichkeiten verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

1.2.2. Progressionsmodell und Biologie des Pankreaskarzinoms

Die Identifizierung prämaligener Vorläuferläsionen und deren morphologische Charakterisierung ist Voraussetzung für die Entwicklung effektiver Diagnostikverfahren zur Früherkennung von Krebserkrankungen. Für das PDAC wurden bisher drei Arten von Vorläuferläsionen identifiziert, unter denen die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) die wichtigste Rolle spielen (Hruban *et al.*, 2007). Auch die eher selten auftretenden intraduktal papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) und muzinös-zystischen Neoplasien (MCN) sind mit Tumoren des Pankreas assoziiert.

Für die Entstehung invasiver PDACs aus PanIN-Läsionen wurde ein Progressionsmodell entwickelt, in dem die Klassifizierung dieser Vorläuferläsionen anhand ihres Dysplasiegrades in PanIN-1A, -1B, -2 und -3 erfolgte (Hruban *et al.*, 2000, 2001). Im Vergleich zu normalen duktalem Strukturen mit kubischem Epithel, bestehen PanIN-1-Läsionen aus zylinderförmigen epithelialen Zellen mit basal angeordneten Nuklei, die sich durch eine erhöhte Mucinproduktion auszeichnen (Abb. 1-2). Anhand ihrer Morphologie werden PanIN-1-Läsionen weiterhin in PanIN-1A (flache Struktur) und PanIN-1B (papilläre Struktur) unterteilt. PanIN-2-Läsionen zeigen zunehmende strukturelle und nukleäre Veränderungen, wie den Verlust der nukleären Polarität, eine Vergrößerung der Nuklei und eine Hyperchromasie. PanIN-Läsionen der Stufe 3 weisen eine komplexe Morphologie auf, die durch Ausbildung papillärer Strukturen, Nekrosen und Absiedlung epithelialer Zellgruppen in das Lumen geprägt ist. In den Zellen von PanIN-3-Läsionen sind zudem bereits Eigenschaften von Karzinomen erkennbar, wie diffus angeordnete polymorphe Nuklei, ausgeprägte Nukleoli und z.T. atypische Mitosen (Hruban *et al.*, 2008). Die auch als *Carcinoma in situ* bezeichneten PanIN-3-Läsionen können in den Pankreata von ca. 40% aller Patienten mit invasivem PDAC identifiziert werden, was ihre Rolle als Vorläufer für diese Krebsart nahe legt (Hruban *et al.*, 2008).

Die mit der Entstehung von Krebs einhergehende Akkumulation genetischer Veränderungen spiegelt sich auch im Progressionsmodell des PDAC wieder. Eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese des Pankreas spielt das Onkogen *KRAS*, dessen aktivierende Punktmutationen in mehr als 90% aller PDACs nachweisbar sind (Caldas & Kern, 1995; Jones *et al.*, 2008). Neben Telomerverkürzungen und einer verstärkten *HER-2/Neu*-Expression zählen *KRAS*-Mutationen zu den frühesten genetischen Veränderungen in der Entwicklung pankreatischer Neoplasien. In ca. 40% der PanIN-1- sowie in 87% der PanIN-2- und -3-Läsionen können bereits Mutationen des *KRAS*-Gens detektiert werden (Lohr *et al.*, 2005).

Im weiteren Verlauf der PanIN-Progression kommt es zur Inaktivierung wichtiger Tumorsuppressorgene, wie *CDKN2A*, *TP53*, *DPC4/SMAD4* und *BRCA2*. Das *CDKN2A*-Gen kodiert für den Zellzyklusregulator p16^{INK4A}, der die Aktivität der Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 inhibiert und somit den G₁/S-Phasen-Übergang des Zellzyklus verhindert. Der Verlust der p16^{INK4A}-Funktion resultiert aus der homozygoten Deletion bzw. Mutation des *CDKN2A*-Gens, sowie durch Hypermethylierung der Promotorregion und kann bereits in 55% der PanIN-2-Läsionen nachgewiesen werden (Feldmann *et al.*, 2007). Die Inaktivierung des *TP53*-Gens akkumuliert in hochgradigen PanIN-3-Läsionen und basiert meist auf der Kombination eines mutierten Allels und dem Verlust des zweiten Wildtyp-Allels (Redston *et*

al., 1994). Über die Inaktivierung dieses Tumorsuppressors werden z.B. wichtige die Proliferation inhibierende oder den Zelltod fördernde genetische Netzwerke ausgeschaltet. Die veränderte Funktion des p53-Proteins erlaubt diesen Zellen, trotz DNA-Schäden, apoptotischen Signalen zu entgehen, was zur genetischen Instabilität des PDAC beiträgt (Hingorani *et al.*, 2005).

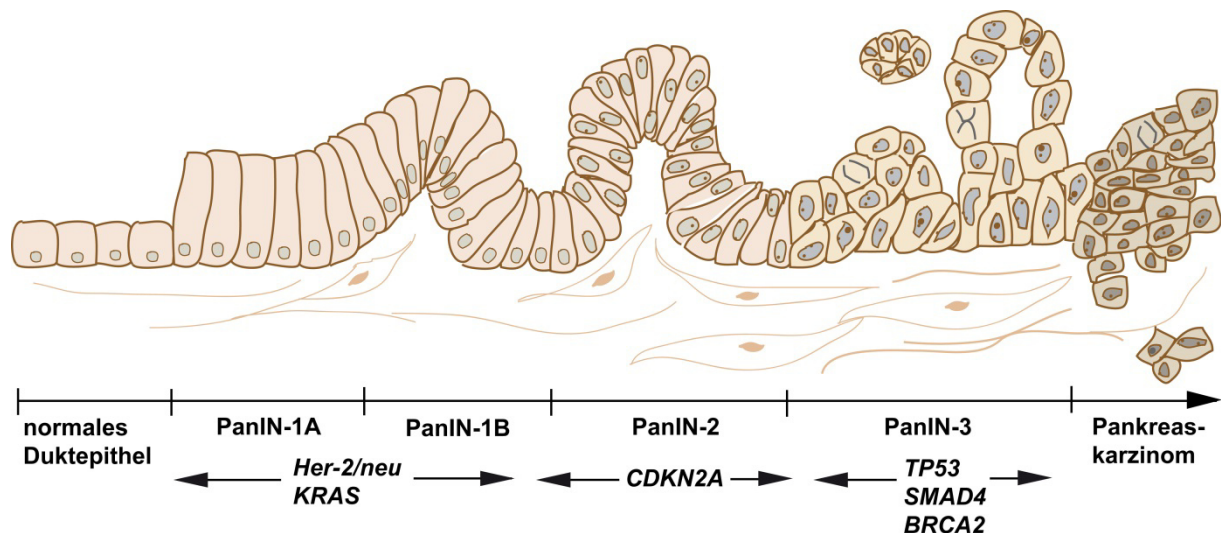


Abb. 1-2: Progressionsmodell des PDAC. Graphische Darstellung der Progression von normalem duktalem Epithel des Pankreas zum invasiven Pankreaskarzinom über prä-maligne Vorläuferläsionen (pankreatische intraepitheliale Neoplasien, PanINs). Die zunehmende Dysplasie des Pankreas geht einher mit bestimmten genetischen Mutationen, wie der aktivierenden Punktmutation im *KRAS*-Gen sowie der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie *CDKN2A* und *TP53* (Modell nach Hruban *et al.*, 2000).

Zu den späten genetischen Veränderungen in der Karzinogenese des Pankreas zählt auch die Inaktivierung des *DPC4*-Gens, die in 50% aller PDACs stattfindet. *DPC4* kodiert für den Transkriptionsfaktor SMAD4, einem zentralen Regulator der TGF β -Signalkaskade, dessen Verlust zu unkontrolliertem Zellwachstum führt (Feldmann *et al.*, 2007). Unter den Genen, deren Keimbahnmutationen mit einer Disposition zur Ausbildung eines PDACs assoziiert sind, nimmt *BRCA2* eine bedeutende Stellung ein. Eine Inaktivierung von *BRCA2* ist in ca. 10% aller PDACs nachweisbar und führt über eine verminderte DNA-Reparaturfähigkeit zur Akkumulation chromosomaler Veränderungen (Goggins *et al.*, 1996). Auch Keimbahnmutationen im *ATM*-Gen, das für eine in DNA-Reparaturprozesse involvierte Serin-Proteinkinase kodiert, sind mit einer Prädisposition zur Entwicklung von PDACs assoziiert (Roberts *et al.*, 2012).

Neben den klassischen Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zeigen pankreatische Neoplasien eine verstärkte Aktivierung der embryonalen Hedgehog- und Notch-Signalwege (Feldmann *et al.*, 2007) und exprimieren erhöhte Raten zahlreicher modulatorischer Faktoren, wie COX-2 und MMP-7 (Crawford *et al.*, 2002; Maitra *et al.*, 2002). Mit einer durchschnittlichen Rate von 26 genetischen Veränderungen pro Tumor, die in 13 relevante Signalwege eingeordnet werden können, weisen Pankreaskarzinome jedoch eine extrem hohe Heterogenität auf (Jones *et al.*, 2008; Biankin *et al.*, 2012).

Ein charakteristisches Merkmal des PDAC ist auch die verstärkte desmoplastische Reaktion, die bereits in den Stadien der PanIN-Entstehung erkennbar ist und zur Ausbildung eines

dichten Stromas führt. Der daraus resultierende geringere Anteil des neoplastischen Epithels erschwert außerdem die Detektion tumorspezifischer Mutationen und erfordert neue Ansätze zur Identifizierung relevanter Zielstrukturen (Cowley *et al.*, 2013).

1.2.3. Mausmodelle der Pankreaskarzinogenese

Genetisch definierte Mausmodelle, die die Progression und Histopathologie des humanen PDAC widerspiegeln, ermöglichen die Studien grundlegender Mechanismen und Therapie-strategien dieser Erkrankung. Das erste Mausmodell, in dem sowohl alle prämaligen dukta- len Läsionen als auch invasive PDACs nachweisbar waren, wurde im Jahr 2003 generiert (Hingorani *et al.*, 2003). In dieser Mauslinie wurde eine aktivierende Mutation in das zweite Exon des endogenen *Kras*-Genlokus eingeführt (*Kras*^{G12D}), die im Kodon 12 zum Austausch der Aminosäure Glycin gegen Aspartat führt. Die Expression des mutierten *Kras*^{G12D}-Allels wird in diesem Mausmodell durch ein vorgeschaltetes Transkriptions- Terminationselement (*LoxP-Stop-LoxP*, *LSL-Kras*^{G12D}) verhindert, so dass erst nach einer Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des Stop-Elements die Aktivierung des onkogenen *Kras*^{G12D} erfolgt. Die pankreasspezifische *Kras*^{G12D}-Expression wird durch Kreuzung von *LSL-Kras*^{G12D}-Mäusen in Mauslinien ermöglicht, die die Cre-Rekombinase unter dem *Pdx1*- oder *Ptf1a/p48*-Promotor exprimieren, die in den gemeinsamen Vorläuferzellen aller Pankreas- zelltypen aktiv sind. In beiden Mausmodellen führt die Cre-Rekombinase induzierte *Kras*^{G12D}- Aktivierung bereits in den ersten Wochen zur Ausbildung von PanIN-Läsionen, die im Verlauf der Tumorgenese alle drei Stadien der humanen Vorläuferläsionen reflektieren. Ab einem Alter von ca. 8 Monaten treten invasive und metastasierende PDACs auf (Hingorani *et al.*, 2003). Mit einer medianen Überlebenszeit der Mäuse von ca. 15 Monaten reflektiert dieses Mausmodell die schrittweise Entwicklung von Tumoren und ermöglicht die Analyse wichtiger molekularer Mechanismen der Pankreaskarzinogenese.

Eine Akzeleration der *Kras*^{G12D} induzierten Karzinogenese des Pankreas lässt sich durch konditionale Expression weiterer Onkogene oder durch Deletion von Tumorsuppressorgenen erreichen. So entwickeln *Pdx-1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse mit konditionaler Deletion beider *Cdkn2a*-Allele bereits im Alter von 7 bis 11 Wochen invasive PDACs (Aguirre *et al.*, 2003). Eine ähnliche Progression der Pankreaskarzinogenese resultiert aus der Kombination des mutierten *Kras*^{G12D}-Allels mit einer konditionalen Deletion des *Trp53*-Allels (Bardeesy *et al.*, 2006) oder der Expression eines *Trp53*-Allels mit einer *missense*-Mutation im Kodon 172 (*Trp53*^{R172H}), die der Mutation *TP53*^{R175H} in Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom entspricht (Olive *et al.*, 2004). *Pdx-1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *LSL-Trp*^{R172H/+}-Mäuse zeigen eine deutliche Akzeleration in der Entwicklung *Kras*^{G12D} induzierter invasiver metastasierender PDACs, was in einer verkürzten medianen Überlebenszeit von ca. 5 Monaten in diesem Modell resultiert (Hingorani *et al.*, 2005).

Diese Mausmodelle verdeutlichen somit die initiiierende Funktion von aktiviertem *Kras* in der frühen Tumorgenese, während die Modulation verschiedener Tumorsuppressoren, wie p53 und *Cdkn2a*, zur Progression des Pankreaskarzinoms beitragen.

1.3. Das Tamoxifen induzierbare Cre^{ERT2}-System zur Kontrolle der Genaktivität

Das Cre/loxP-System spielt eine zentrale Rolle in der Generation von konditionalen Mausmutanten und der funktionalen Analyse von Genen und Proteinen. Diese Technik basiert auf der katalytischen Aktivität der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1, die zur Deletion von DNA-Segmenten führt, die zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen liegen (Sauer & Henderson, 1988). Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgt häufig unter der Kontrolle gewebe- oder zellspezifischer Promotoren, so dass meist eine organspezifische jedoch keine induzierbare Expression des Enzyms möglich ist. Eine Verbesserung des Systems wurde durch die Konstruktion induzierbarer Cre-Rekombinasen erreicht, die als Fusionsproteine neben der Cre-Rekombinase eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) des nukleären Östrogenrezeptors α (ER α) oder des Progesteronrezeptors (PR) enthalten (Feil *et al.*, 1996; Kellendonk *et al.*, 1999). Nach Interaktion mit dem entsprechenden Liganden translozieren diese Fusionsproteine in den Nukleus. Das heute weit verbreitete Cre-ERTM-System enthält eine modifizierte LBD des Östrogenrezeptors, die eine Bindung des endogenen β -Östradiols verhindert und stattdessen eine Affinität gegenüber den synthetischen Liganden Tamoxifen (TM) und 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aufweist (Feil *et al.*, 1996). Mit der Einführung weiterer Modifikationen in die LBD des Östrogenrezeptors konnte die Sensitivität der hierbei generierten Triple Mutante (G400V/M543A/L544A) für die synthetischen Liganden weiter erhöht werden. Das optimierte Cre^{ERT2}-System kann *in vitro* bereits durch 4-OHT-Konzentrationen im nanomolaren Bereich aktiviert werden (Feil *et al.*, 1997). Dies ermöglicht eine effektive Induktion der Cre-Rekombinase und eine gezielte Aktivierung als auch Inaktivierung von Genen (Abb. 1-3).

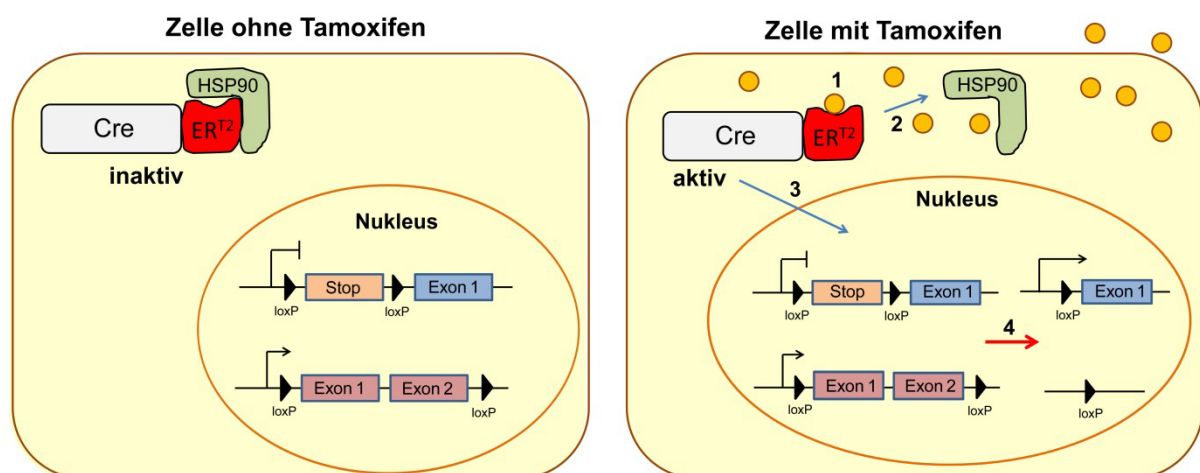


Abb. 1-3: Das Tamoxifen induzierbare Cre^{ERT2}-System zur Steuerung der Genaktivität. In Abwesenheit spezifischer Liganden liegt das Cre^{ERT2}-Fusionsprotein gebunden an das Hitzeschockprotein HSP90 im Zytoplasma der Zelle vor (links). Die Zugabe von Tamoxifen (rechts) führt zur Bindung an die ERT²-Domäne des Fusionsproteins (1), was in der Dissoziation des HSP90 resultiert (2). Dies erlaubt die Translokation des Cre^{ERT2}-Proteins in den Nukleus (3), wo es die Rekombination von loxP-Sequenzen flankierten Genabschnitten katalysiert (4) (modifiziert nach Leone *et al.*, 2003).

1.4. Die Signaltransduktion von onkogenem Ras

1.4.1. Die Regulation des Ras-Proteins

Ras-Proteine sind GTPasen, die als regulatorische Schaltermoleküle zentraler Signalwege an der Steuerung wichtiger Prozesse wie Proliferation, Überleben und Differenzierung der Zelle beteiligt sind. Die Aktivierung von Ras erfolgt durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Mitogenen an Rezeptoren der Zelloberfläche, zu denen der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der *insulin like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) und der *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) zählen. Die Stimulierung der Rezeptoren resultiert in einer Autophosphorylierung spezifischer intrazellulärer Tyrosin-Reste am C-Terminus, die zur Bindung von Adaptermolekülen, wie dem *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) und weiterer Signal übertragender Proteine führt. Diese rekrutieren wiederum Guanin Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), wie z.B. *son of sevenless homolog protein* (SOS) zur Zytoplasmamembran, die mit dem Membran gebundenen Ras-Protein interagieren und dessen Übergang von der inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen in die aktive Guanosintriphosphat (GTP)-gebundene Konformation katalysieren. Die Aktivierung von Ras ermöglicht dessen Interaktion mit zahlreichen Effektoren, wie der Serin/Threonin-Kinase Raf, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und dem *Ral guanine nucleotid-dissociation stimulator* (RalGDS) (Abb. 1-4). Die negative Regulierung des Ras-Proteins erfolgt durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras stimulieren und die Hydrolyse zu Ras-GDP katalysieren (Schubbert *et al.*, 2007).

Aktivierende *RAS*-Mutationen treten in ca. 30% aller humanen Krebserkrankungen auf mit einer Prävalenz der spezifischen *RAS*-Gene *KRAS*, *NRAS* und *HRAS* für bestimmte Krebsarten. Die meisten Tumorzellen weisen hierbei *missense*-Mutationen des *RAS*-Gens in den Kodons 12, 13 und 61 auf. Diese Veränderungen beeinträchtigen die intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins und verhindern die GAP vermittelte GTP-Hydrolyse, was in einer konstitutiven GTP-gebundenen Form von Ras resultiert, die unabhängig von extrazellulären Stimuli aktiv ist (Scheffzek *et al.*, 1997; Steelman *et al.*, 2004).

1.4.2. Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg

Aktiviertes Ras reguliert ein komplexes Netzwerk von Signalwegen, unter denen die in vielen humanen Tumoren deregulierte Raf-MEK-ERK-Kaskade am besten charakterisiert ist (Abb. 1-4). Diese *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade vermittelt die Transduktion extrazellulärer Signale in den Nukleus und steuert somit die Expression zahlreicher Gene, die in Prozesse wie Zellzyklus-Progression, Proliferation, Überleben der Zelle, Zelladhäsion und Migration sowie Metabolismus und Transkription involviert sind (Roskoski, 2012).

Ras-GTP rekrutiert die Mitglieder der Raf-Kinase-Familie (A-Raf, B-Raf und Raf-1) zur Zellmembran und vermittelt deren Aktivierung durch molekulare Vorgänge, wie Dimerisierung verschiedener Raf-Proteine und Dissoziation von Raf-Kinase inhibitorischen Proteinen.

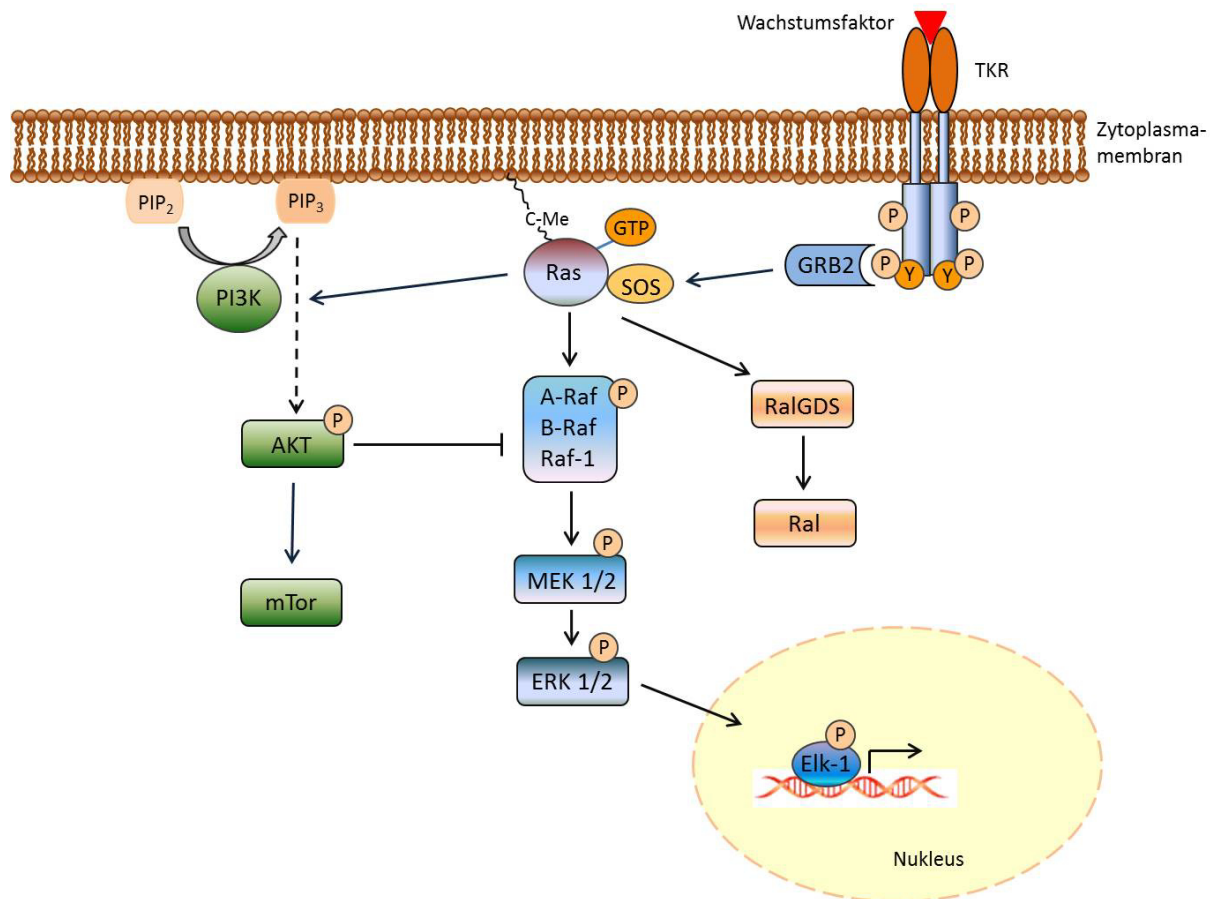


Abb. 1-4: Die Signaltransduktion von aktiviertem Ras. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR) resultiert in der Aktivierung von Ras und dessen Effektoren, unter denen der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg eine zentrale Rolle spielt.

Die Raf-Kinasen katalysieren wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase kinases* MEK1 und MEK2. Die Kinasen MEK1/2 zeichnen sich durch eine duale Spezifität aus und phosphorylieren die *extracellular signal regulated kinases 1/2* (ERK1/2) an spezifischen Threonin- und Tyrosin-Resten, was zu deren Aktivierung führt. Entgegen der eingeschränkten Substratspezifität der Kinasen Raf und MEK1/2, sind für die Serine-/Threonin-Kinasen ERK1 und ERK2 mehr als 175 zytoplasmatische und nukleäre Substrate bekannt (Yoon & Seger, 2006). Die Gruppe der ERK1/2-Substrate umfasst neben anderen Kinasen auch Phosphatasen, Rezeptoren, Cytokine, Zellzyklus regulierende Proteine, Transkriptionsfaktoren und Proteine, die in die Translation der mRNA involviert sind (McCubrey *et al.*, 2012). Die Aktivität von ERK1/2 im Zytoplasma und im Zellkern unterliegt einer komplexen Regulation. Die Bindung von *p38MAPK-alpha splice isoform Max-interacting protein* (Mxi2) an ERK1/2 fördert dessen Translokation in den Nucleus. Mxi2 verhindert zudem die Interaktion von ERK1/2 mit den nukleären Phosphatasen *MAPK phosphatase-1* (MKP1) und *dual specificity phosphatase 5* (DUSP5), was die Phosphorylierung von ERK1/2 aufrechterhält und die Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren ermöglicht (Roskoski, 2012). Eine zentrale Rolle in der MAPK-Kaskade spielen hierbei Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc, AP-1 und Elk-1, die an

Promotorsequenzen von Genen binden, die für Wachstumsfaktoren und Cytokine kodieren, die das Zellwachstum fördern und Apoptose unterdrücken (McCubrey *et al.*, 2012).

Ursachen für die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade sind neben der Expression von onkogenem *Ras* und *B-Raf*, Mutationen in Wachstumsfaktorrezeptoren und Genen anderer Signalwege, wie z.B. PI3K, PTEN und AKT, die an der Regulation von Raf-Kinasen beteiligt sind (McCubrey *et al.*, 2007).

1.5. Die Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie

1.5.1. Struktur und Funktion

Der *activator protein-1* (AP-1)-Transkriptionsfaktor ist ein Dimer, das sich aus Mitgliedern der Jun-, Fos-, *activating transcription factor* (ATF)- und *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (MAF)-Proteinfamilien zusammensetzt (Eferl & Wagner, 2003). AP-1-Proteine dimerisieren durch ein Leucin-Zipper-Motiv und enthalten eine basische DNA-Bindungsdomäne (Hess *et al.*, 2004). Während die Fos-Proteine (c-Fos, FosB, *Fos-related antigen 1* (Fra1) und Fra2) nur mit Mitgliedern der Jun-Familie (c-Jun, JunB und JunD) heterodimerisieren können, bilden die Jun-Proteine sowohl homo- als auch heterodimäre Komplexe mit Fos-Proteinen aus. AP-1-Dimere binden hauptsächlich an *12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate* (TPA) *responsive element* (TRE)- oder AP-1-Erkennungssequenzen (5'-TGAG/CTCA-3') in den Promotor- und Enhancerbereichen zahlreicher Gene, die an Prozessen wie Proliferation, Überleben, Apoptose, zelluläre Motilität und Invasivität beteiligt sind (Eferl & Wagner, 2003). Die Regulation der AP-1-Aktivität erfolgt auf der Ebene der Transkription, sowie durch post-translationale Modifikationen, unterschiedliche Dimerkompositionen und Interaktionen mit anderen Proteinen. Die Aktivierung von AP-1 wird durch zahlreiche extrazelluläre Stimuli und deren Signalkaskaden gesteuert, unter denen die MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und *JUN amino-terminal kinase* (JNK) eine zentrale Rolle einnehmen.

Neben den spezifischen Funktionen der einzelnen AP-1-Komponenten in der embryonalen Entwicklung und der Organogenese, sind AP-1-Transkriptionsfaktoren auch in Prozesse der Tumorgenese involviert. So konnte für die ursprünglich als virale Onkoproteine identifizierten AP-1-Mitglieder c-Fos und c-Jun eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Osteosarkomen sowie in der Tumorgenese von Haut und Leber nachgewiesen werden (Jochum *et al.*, 2001; Eferl *et al.*, 2003). Die mit starken Transaktivierungsdomänen ausgestatteten AP-1-Faktoren c-Fos, c-Jun und FosB besitzen zudem das Potenzial für eine effiziente Transformation von Zellen (Jochum *et al.*, 2001). Jedoch führt auch die Überexpression der schwachen Aktivatoren Fra1 und Fra2 zur Entwicklung von epithelialen Tumoren *in vivo*, was auf eine Dimerisierung mit AP-1-Proteinen zurückzuführen ist, die stärkere Transaktivierungsdomänen besitzen (Jochum *et al.*, 2000).

In humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, Mammakarzinomen und Melanomen konnte zudem eine Korrelation von c-Jun und Fra1 mit einem invasiven Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierungsrate gezeigt werden (Ding *et al.*, 2013).

1.5.2. Das Fos-Mitglied *Fos-related antigen 1, Fra1*

Das Fra1-Protein wurde ursprünglich aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft mit c-Fos identifiziert, besitzt jedoch im Vergleich zu c-Fos keine Transaktivierungsdomäne (Cohen *et al.*, 1989). Anhand von Expressionsstudien in Mäusen konnte für *Fra1* eine Expression im extraembryonalen Gewebe sowie im Gehirn, der Haut und in den Hoden adulter Mäuse nachgewiesen werden (Schreiber *et al.*, 2000).

Eine onkogene Funktion von Fra1 konnte initial in transformierten murinen Fibroblasten und in Kras-transformierten Schilddrüsenzellen nachgewiesen werden (Mechta *et al.*, 1997; Vallone *et al.*, 1997). Fra1 ist zudem in zahlreichen humanen epithelialen Tumoren aktiviert und eine verstärkte Fra1-Akkumulation korreliert mit der Expression von Genen, die in wichtige Prozesse der Tumorprogression wie Proliferation, Invasivität, Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), Metastasierung und Angiogenese involviert sind (Belguise *et al.*, 2005; Young & Colburn, 2006; Tam *et al.*, 2013). Diese Prozesse werden über Fra1-Zielgene wie *Cyclin A*, *Cyclin D1*, *p14/p19^{ARF}*, *MMP1*, *MMP9*, *uPA* und *VEGF* gesteuert (Eferl & Wagner, 2003; Belguise *et al.*, 2005).

Die Regulation von Fra1 erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene. Die *Fra1*-Genexpression wird hauptsächlich durch mitogene und onkogene Stimulation über den Ras/MAPK-Signalweg induziert. Die durch diese Signalkaskade aktivierten Transkriptionsfaktoren binden an TRE-, *serum response element* (SRE)- und ATF-Erkennungssequenzen in den Promotorsequenzen des *Fra1*-Gens (Abb. 1-5).

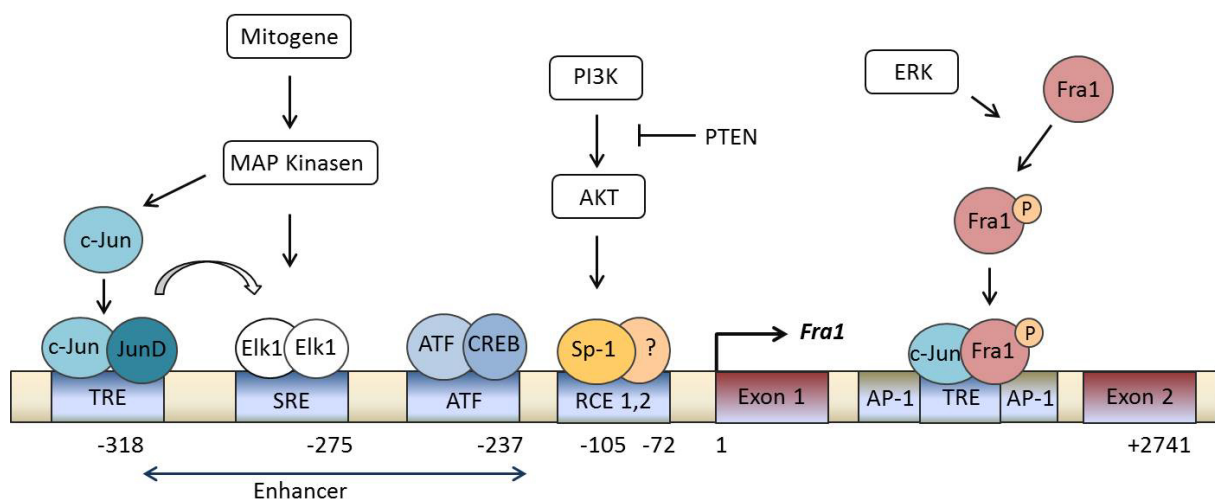


Abb. 1-5: Regulation des *Fra1*-Gens. Aktivierung der *Fra1*-Genexpression durch den MAPK- und den PI3K/AKT-Signalweg sowie durch die Bindung von Fra1 an seinen eigenen Promotor. Signale der MAPK-Kaskade induzieren die Bindung zahlreicher Transkriptionsfaktoren an TRE-, SRE- und ATF-Sequenzen im *Fra1*-Promotorbereich. Die PI3K/AKT vermittelte Regulation der *Fra1*-Expression erfolgt über RCE-Sequenzen. Die Phosphorylierung von Fra1 durch ERK führt nach der Dimerisierung mit c-Jun zur Bindung an TRE-Sequenzen im ersten Intron des *Fra1*-Genlokus (modifiziert nach Young & Colburn, 2006).

Das *Fra1*-Gen ist zudem autoreguliert. Die Stabilisierung des translatierten Fra1-Proteins erfolgt durch ERK vermittelte Phosphorylierung (Casalino *et al.*, 2003). Das über ERK stabilisierte Fra1 kann die eigene Transkription durch Bindung an TRE-Erkennungssequenzen im ersten Intron des *Fra1*-Gens positiv regulieren (Bergers *et al.*, 1995).

Die Promotorregion des *Fra1*-Gens enthält weiterhin ein *retinoblastoma control element* (RCE1), das als regulatorisches Element für die PI3K/AKT vermittelte Induktion der *Fra1*-Transkription identifiziert werden konnte (Tsuchiya *et al.*, 1993; Tiwari *et al.*, 2003).

1.6. Der Zellzyklus

Das Zellwachstum und die Teilung eukaryotischer Zellen erfolgt in definierten Phasen (Zellzyklus), in denen die Replikation der DNA während der S-Phase (Synthese) und die gleichmäßige Verteilung der identischen chromosomalen Kopien auf die Tochterzellen während der M-Phase (Mitose und Cytokinese) sichergestellt wird. Beide Phasen sind durch sogenannte *Gap*-Phasen getrennt, die das Wachstum der Zellen (G_1 -Phase) und die Kontrolle der Integrität der genomischen DNA (G_2 -Phase) erlauben. Während der G_1 -Phase entscheiden Mitogene und andere Wachstumsfaktoren bis zum Erreichen des Restriktionspunktes über das weitere Zellschicksal, das in einer erneuten Zellteilung, in einer terminalen Differenzierung oder in einer transienten Ruhephase (G_0 -Phase) resultieren kann.

Die zentralen Übergänge des Zellzyklus werden durch die phasenspezifische Aktivität verschiedener Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) reguliert. Die Aktivität dieser Serin/Threonin-Kinasen wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert. Diese beinhalten neben Phosphorylierung und Dephosphorylierung vor allem die Assoziation mit regulatorischen Cyclin-Untereinheiten sowie die Interaktion mit CDK-Inhibitoren (CKIs) (Morgan, 1995; Sherr & Roberts, 1999).

Die frühe G_1 -Phase ist durch die MAPK-Signalkaskade induzierte Aktivität von D-Cyclinen und den CDKs 4 und 6 geprägt, welche die Progression zum Übertritt des G_1 -Restriktionspunktes vermitteln. In der späten G_1 -Phase kommt es zu einer Verminderung der Cyclin-D-CDK4/6-Aktivität, wohingegen die Cyclin-E-CDK2-Aktivität zunimmt. Eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus nimmt das Retinoblastom (RB)-Protein ein, das in seiner hypophosphorylierten Form den Transkriptionsfaktor E2F inhibiert. Als Zielprotein beider Cyclin/CDK-Komplexe wird RB im Verlauf der G_1 -Phase-Progression nach Phosphorylierung inaktiviert, was in der Freisetzung von E2F resultiert. E2F initiiert die Transkription von Genen, die für die G_1 /S-Phasentransition benötigt werden (Trimarchi & Lees, 2002). In der frühen S-Phase akkumulieren Cyclin A/CDK2-Komplexe, während es zum Ubiquitin vermittelten proteolytischen Abbau von Cyclin E und zur Inhibierung der E2F-Aktivität kommt (Sherr, 1996). Die Cyclin A/CDK2-Komplexe vermitteln die S-Phase-Progression zu G_2 , die mit der Assoziation von Cyclin A mit CDK1 einhergeht. Am Eintritt zur M-Phase findet die Substitution von Cyclin A gegen Cyclin B statt, was in der Phosphorylierung von Proteinen resultiert, die in Prozesse wie Chromosomenkondensation, Segregation und Cytokinese involviert sind (Sherr, 1996).

Während Cyclin/CDK-Komplexe die Progression des Zellzyklus positiv beeinflussen, führt die Bindung von CKIs zu einer Inaktivierung der Kinasekomplexe, die mit einer negativen Regulation der einzelnen Phasenübergänge des Zellzyklus einhergeht. CKIs werden anhand ihrer Sequenzhomologien und ihrer Spezifität in die zwei Familien der INK4- und Kip/Cip-Proteine eingeteilt (Sherr & Roberts, 1999). Die Mitglieder der INK4-Familie ($p15^{\text{INK4B}}$, $p16^{\text{INK4A}}$, $p18^{\text{INK4C}}$ und $p19^{\text{INK4D}}$) inhibieren spezifisch die CDK4- und CDK6-Aktivität, während

die Mitglieder der Kip/Cip-Familie (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) ein breiteres Spektrum der Cyclin/CDK-Komplexe inhibieren (Denicourt & Dowdy, 2004).

Die Deregulation von Zellzyklus kontrollierenden Mechanismen spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der malignen Transformation. Initiale Ereignisse hierfür sind neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die eine unterdrückende Wirkung auf die Proliferation ausüben, die Aktivierung von Proto-Onkogenen, die wachstumsfördernde Signale vermitteln (Hanahan & Weinberg, 2000).

1.7. Der CDK-Inhibitor p27^{Kip1}

1.7.1. Funktion und Regulation

Der vom *CDKN1B*-Gen kodierte CDK-Inhibitor p27^{Kip1} ist ein wichtiger Regulator der G₁/S-Phasentransition (Sherr & Roberts, 1999). p27^{Kip1} dient hierbei als zentrale Plattform für die Prozessierung und Integration zahlreicher mitogener und antiproliferativer Signale, die über die Progression des Zellzyklus entscheiden. So konnte in zahlreichen Studien der p27^{Kip1} vermittelte Zellzyklusarrest durch anti-mitogene Faktoren und physiologische Inhibitoren der Zellproliferation wie TGFβ, cAMP, IL6, Rapamycin und zelluläre Konfluenz demonstriert werden (Hengst *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994; Sherr & Roberts, 1995, 1999; Kortylewski *et al.*, 1999).

Die G₀- und die frühe G₁-Phase zeichnen sich durch eine maximale Translation und Stabilität des p27^{Kip1}-Proteins aus, das in diesen Zellstadien an Cyclin E/CDK2-Komplexe bindet und deren Aktivität inhibiert. Die CDK2-Inaktivierung basiert hierbei auf der Konformationsänderung und Blockade der ATP-Bindestelle in der katalytischen Spalte der Kinase nach Bindung der unmodifizierten Form von p27^{Kip1} (Russo *et al.*, 1996). In der Regulation von Cyclin D/CDK4- und Cyclin D/CDK6-Komplexen besitzt p27^{Kip1} eine duale Rolle. So übt p27^{Kip1} unter ungünstigen Bedingungen, wie z.B. UV-Bestrahlung und Kontaktinhibierung, eine inaktivierende Funktion auf D-Typ-Cyclin/CDK-Komplexe aus, während p27^{Kip1} in der frühen bis mittleren G₁-Phase die Formation und den nukleären Import von Cyclin D1/CDK-Komplexen fördert (Chu *et al.*, 2008; James *et al.*, 2008).

Im Verlauf der weiteren Zellzyklus-Progression von der G₁- zur S-Phase kommt es über transkriptionale Regulation, translationale Kontrolle und Ubiquitin vermittelten proteasomalen Abbau zu einer Abnahme der p27^{Kip1}-Expression. Hierbei führt die Aktivierung der Cyclin E/CDK2 abhängigen Phosphorylierung von p27^{Kip1} am Threoninrest T187 zu einer zunehmenden Instabilität von p27^{Kip1}. Die Phosphorylierung von p27^{Kip1} an T187 resultiert in der Rekrutierung des *S-phase kinase-associated protein 2* (Skp2) enthaltenden E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes (*Skp1-Cullin-F-box protein*, SCF^{Skp2}) (Abb. 1-6). Das F-Box-Protein Skp2 ist die Substraterkennungs-Untereinheit des SCF^{Skp2}-Komplexes, der als Hauptregulator der Ubiquitinierung der drei CKIs der Kip/Cip-Familie (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) charakterisiert wurde (Lu & Hunter, 2010).

p27^{Kip1} kann an zahlreichen Aminosäureresten durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden. Hierüber wird die Stabilität, die inhibitorische Aktivität und die zelluläre Lokalisation von p27^{Kip1} reguliert (Chu *et al.*, 2008).

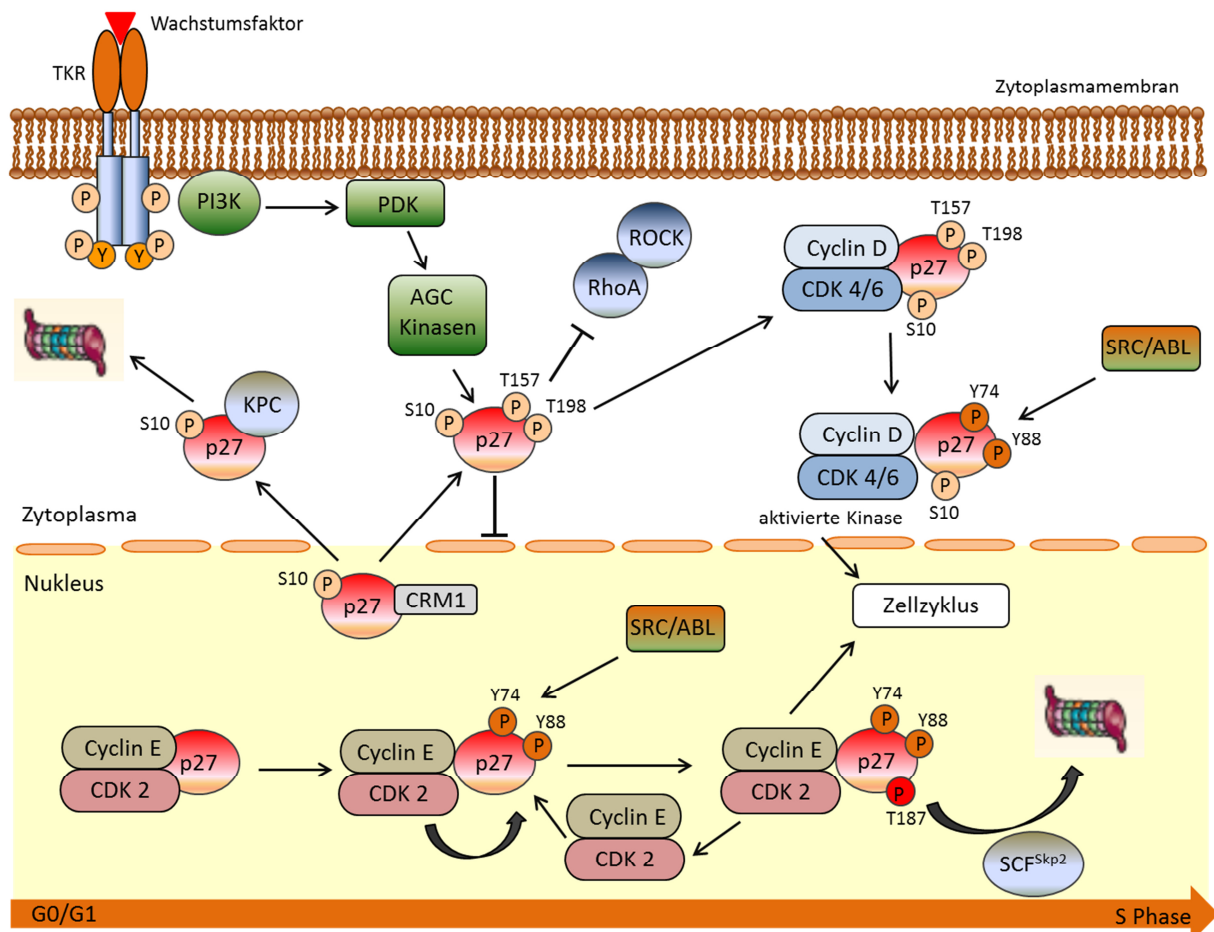


Abb. 1-6: Modell der Regulation von p27^{Kip1}. In der frühen G₁-Phase führt die verstärkte Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Serin 10 (S10) zu dessen CRM1 vermittelten nukleären Export und dem von KPC gesteuerten proteolytischen Abbau im Zytoplasma. Die Phosphorylierung von p27^{Kip1} durch SRC und ABL trägt zur Aktivierung von Cyclin E/CDK2-Komplexen bei, was in einer weiteren Phosphorylierung von p27^{Kip1} an T187 resultiert, die als Erkennungsmotiv für den E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex SCF^{Skp2} dient. In der frühen bis mittleren G₁-Phase phosphorylieren aktivierte PI3K/AGC-Kinasen (*cAMP dependent protein kinase / protein kinase G / protein kinase C*-Kinase-Familien) p27^{Kip1} an den Threoninresten T157 und T198, was dessen Komplexbildung mit Cyclin D/CDK4/6 verstärkt. Die AGC-Kinasen vermittelte Phosphorylierung von p27^{Kip1} an T157 und T198 fördert zudem die Bindung von p27^{Kip1} an RhoA, was zur Inhibition der RhoA-ROCK-Signalkaskade führt (modifiziert nach Chu *et al.*, 2008).

Die Phosphorylierung an den Tyrosinresten Y74 und Y88 durch die Tyrosinkinase ABL, SRC, LYN und JAK2 schwächt die Interaktion zwischen p27^{Kip1} und Cyclin E/CDK2, was eine schnellere Phosphorylierung an T187 erlaubt, die für die Erkennung und den proteasomalen Abbau durch Skp2 benötigt wird (Jakel *et al.*, 2012; Starostina & Kipreos, 2012).

Die Aktivierung des ERK-Signalwegs induziert die Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Serin 10 (S10), was in einer erhöhten Bindung von p27^{Kip1} an das Exportin CRM1 resultiert und somit dessen nukleären Export verstärkt (Connor *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung von p27^{Kip1} an S10 hat zudem einen Zellzyklus abhängigen Effekt auf die Proteinstabilität. In der frühen G₁-Phase bindet phospho-S10-p27^{Kip1} an den zytosolischen *Kip1 ubiquitinating promoting complex* (KPC) und wird polyubiquitiniert (Kamura *et al.*, 2004), während die S10-Phosphorylierung von p27^{Kip1} in ruhenden Zellen (G₀) zu einer erhöhten Stabilität des Proteins führt (Ishida *et al.*, 2000). In Tumoren ist der nukleäre Import von p27^{Kip1} durch die Phosphorylierung an T157 und T198 häufig dereguliert. T157 und T198 werden durch

Kinasen wie AKT/PKB, p90RSK und Pim phosphoryliert (Jakel *et al.*, 2012). Die Mislokalisierung von p27^{Kip1} im Zytoplasma führt zum Verlust seiner inhibitorischen Funktion auf die CDK-Aktivität im Nukleus, was in einer erhöhten Proliferationsrate resultiert.

Im Zytoplasma ist p27^{Kip1} als Modulator des RhoA-Signalwegs an der Regulation des Aktin-zytoskeletts beteiligt (Besson *et al.*, 2004a). Die Bindung von p27^{Kip1} an die GTPase RhoA verhindert dessen GEF vermittelte Aktivierung, was einen fördernden Effekt auf die Zellmigration bewirkt (Besson *et al.*, 2004b; Narumiya *et al.*, 2009).

1.7.2. Die Rolle von p27^{Kip1} als prognostischer Marker in soliden Tumoren

p27^{Kip1} zählt zu den am häufigsten deregulierten Tumorsuppressor-Proteinen in humanen Tumoren (Slingerland & Pagano, 2000; Philipp-Staheli *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2008). Im Vergleich zu p53 und p16^{Ink4a} ist p27^{Kip1} jedoch kein klassischer Tumorsuppressor, da der *CDKN1B*-Genlocus in Tumoren selten mutiert oder deletiert ist (Slingerland & Pagano, 2000). Unter den Mechanismen, die in Tumorzellen zur Inaktivierung von p27^{Kip1} führen, spielen ein erhöhter proteolytischer Abbau und der Ausschluss aus dem Nukleus eine dominierende Rolle (Besson *et al.*, 2008). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass reduzierte Expressionsraten von p27^{Kip1} in humanen Tumoren mit einem verminderten Überleben der Patienten korrelieren (Chu *et al.*, 2008). Niedrige nukleäre p27^{Kip1}-Proteinmengen sind zudem ein Marker für die erhöhte Aggressivität der Tumorerkrankungen und für deren schlechtes Ansprechen auf Therapien (Nickeleit *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008). In verschiedenen Tumoren konnte außerdem eine inverse Korrelation der Expressionsraten von p27^{Kip1} und Skp2 nachgewiesen werden, das die Proteinstabilität von p27^{Kip1} kontrolliert (Loda *et al.*, 1997; Nakayama & Nakayama, 2006). In Untersuchungen der klinischen Relevanz von zytoplasmatisch lokalisiertem p27^{Kip1} ließ sich eine Assoziation dieser Delokalisation mit einem hohen Tumorgrad und einer gesteigerten Metastasierungsrate feststellen (Liang *et al.*, 2002; Besson *et al.*, 2004a; Chu *et al.*, 2008).

Da die Expressionsraten von p27^{Kip1} und dessen zelluläre Funktion durch gut charakterisierte posttranslationale Mechanismen kontrolliert werden, bieten sich hierbei interessante Therapiemöglichkeiten an. Erste Medikamente, die aufgrund der Eigenschaft entwickelt wurden, die p27^{Kip1}-Proteinexpression zu erhöhen, befinden sich in der Entwicklung (Nickeleit *et al.*, 2008).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Für das Pankreaskarzinom wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Mausmodelle etabliert, welche die molekularen Grundlagen der humanen Erkrankung rekapitulieren. Aufgrund von Limitierungen dieser *in vivo* Modellsysteme ergibt sich die Notwendigkeit, Surrogatmodelle zu entwickeln, die einen prädiktiven Wert für die *in vivo* Situation aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein primäres zelluläres Modellsystem etabliert werden, das die einfache genetische Manipulation pankreatischer Zellen *ex vivo* erlaubt. Hierfür wurden duktale Zellen aus dem Pankreas von *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen isoliert und charakterisiert, in denen sich die Expression von onkogenem *Kras^{G12D}* durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induzieren lässt. Die Relevanz dieses primären Zellsystems für die Pankreaskarzinogenese sollte durch orthotope Transplantationsversuche nachgewiesen werden.

Die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* führte im primären Zellsystem zu einer gesteigerten Proliferation, die mit einer reduzierten *p27^{Kip1}*-Expression korrelierte. Über die genetische Relevanz des Tumorsuppressors *p27^{Kip1}* in der Karzinogenese des Pankreas ist jedoch nur wenig bekannt. Ein Teil dieser Arbeit umfasste somit funktionale *in vivo* Studien zu *p27^{Kip1}* in der *Kras^{G12D}*-abhängigen Karzinogenese des Pankreas.

Das primäre zelluläre Modellsystem sollte weiterhin verwendet werden, um unvoreingenommen neue Signalwege in der *Kras^{G12D}*-initiierten pankreatischen Karzinogenese zu finden und die Wertigkeit dieser Signaltransduktion sollte in verschiedenen murinen und humanen Modellen validiert werden.

2. Material

2.1. Technische Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2-1: Technische Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern (D)
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe B.V., EH Breda (NL)
AxioCam MRc und HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Blot-Apparatur Mini-Trans Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Brutschrank Heraeus B6	Heraeus Instruments GmbH, Hanau (D)
Brutschrank HERAcell 240	Heraeus Instruments GmbH, Osterode (D)
CO ₂ -Inkubator Heraeus BB15	Thermo Scientific, Langenselbold (D)
CO ₂ -Inkubator Heraeus BB6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau (D)
Dewar-Transportgefäß, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe (D)
Echtzeit-PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA (USA)
Einbettssystem EG 1150H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
FACS Calibur	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Folienschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern (D)
Geldokumentationssystem UVsolo TS	Biometra GmbH, Göttingen (D)
Gelelektrophoresekammer Compact L/XL	Biometra GmbH, Göttingen (D)
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300 S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Glaswaren Schott Duran	Schott UK Ltd, Stafford (UK)
Homogenisator Silent Crusher M	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach (D)
Konfokales Lasermikroskop TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg (D)
Lumineszenzgerät FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg (D)
Magnet-Ring-Ständer, 96-Well	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA (USA)
Magnetrührer MR3002	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach (D)
Magnetrührer Variomag Micro	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Manuelle Färbestation	Thermo Scientific, Walldorf (D)

Bezeichnung	Hersteller
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld (D)
Mikroskop Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Mikroskop DME	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Mikroskop Stemi SV11	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Mikrotom HM355S	Thermo Scientific, Walldorf (D)
Mikrotom-Kryostat HM 560	Thermo Scientific, Walldorf (D)
Mikrowelle	Siemens AG, München (D)
Multipette®Xstream	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Neubauer-Zählkammer Improved	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg (D)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Bioscience Corporate, Lincoln, NE (USA)
PCR-Maschinen TPersonal/TGradient	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen (D)
pH-Meter pH 720	WTW GmbH, Weilheim (D)
Photometer GeneQuant pro	Biochrom, Cambridge (UK)
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Pipettierhilfe Stripettor™plus	Corning, New York (USA)
Power Supply EPS 601	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D)
Präparierbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen (D)
Präzisionswaage Kern EG	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern (D)
Schere #14508-15	FST GmbH, Heidelberg (D)
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Thermoshake	Gerhardt GmbH, Königswinter (D)
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg (D)

Bezeichnung	Hersteller
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach (D)
Vakuumpumpe N86KN18	KHF Neuberger, Freiburg (D)
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich (CH)
Wasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel (D)
Wasserbad Microm SB80	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Western Blot-System Mighty Small II	Hoefer Inc., Holliston, MA (USA)
Wippschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach (D)
Zentrifuge Avanti J25	Beckmann Coulter Inc., Brea, CA (USA)
Zentrifuge ROTINA 46R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)

2.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Augengel Vidisic	Dr. Gerhard Mann GmbH, Berlin (D)
Blotting-Papier 3MM Chr	Whatman plc, Kent (UK)
CryoPure Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig (D)
Einmalspritzen Omnifix®-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Filterspitzen 10, 100, 1000 µl	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe (D)
Gewebeeinbettkassetten	AMP, Stensved (DK)
Höllenstein-Ätzstift Argentrix	Ryma-Pharm GmbH, Körle (D)
Injektionskanülen Sterican® Gr. 18 + 20	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
<i>MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA (USA)
<i>MicroAmp® Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA (USA)
Mikrotom-Klingen S35	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka (Japan)

Bezeichnung	Hersteller
Nahtmaterial Ethilon 5-0	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt (D)
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig (D)
Pasteurpipetten, Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (D)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Probenröhrchen ø 14 mm, PE	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (D)
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Rundbodenröhrchen Polystyrol 5 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ (USA)
<i>Safe-lock</i> Reaktionsgefäße Biopur	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Schlauchfolie polystar®	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg (D)
Serologische Pipetten	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen (D)
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka (Japan)
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 + 0,45 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Transfer-Membran Immobilon-FL 0,45 µm	Millipore Corporate, Billerica, MA (USA)
Vakuum-Filtrationseinheit „rapid“ Filtermax 500 ml	TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen (CH)
<i>Wound Clips</i> 11 mm	Medicon eG, Tuttlingen (D)
<u>Zellkulturverbrauchsmaterialien:</u>	
Flaschen, Schalen, Röhrchen	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen (D)
<i>well</i> -Platten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ (USA)
Zellschaber	TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen (CH)

2.3. Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Alle nicht separat aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm (D), Merck KGaA, Darmstadt (D), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D), Serva GmbH, Heidelberg (D) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D) im Reinheitsgrad p.a. bezogen.

Tabelle 2-3: Chemikalien und allgemeine Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	peqLab, Erlangen (D)
1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
<i>Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	Serva GmbH, Heidelberg (D)
<i>Bradford reagent, 5x</i>	Serva GmbH, Heidelberg (D)
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
<i>N, N</i> -Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
<i>Gel Loading Dye, blue (6x)</i>	New England Biolabs, Frankfurt (D)
<i>GeneRuler DNA Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (D)
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Isofluran <i>Forene</i>	Abbott GmbH, Wiesbaden (D)
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Bezeichnung	Hersteller
Metacam	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein (D)
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt (D)
<i>Mg²⁺ Lysis/Wash Buffer, 5x</i>	Millipore Corporate, Billerica, MA (USA)
Novalgine	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt (D)
<i>Orange G</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
<i>PageRulerTM, Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (D)
Paraformaldehyd 37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Phosphatase-Inhibitor-Mix I	Serva GmbH, Heidelberg (D)
Protease Inhibitor Cocktail <i>cOmplete EDTA-free</i>	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (D)
<i>Raf-RBD beads</i>	Cytoskeleton, Denver, CO (USA)
RLT-Puffer	Quiagen GmbH, Hilden (D)
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Saponin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
TE-Puffer (1x) pH 8.0	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

2.4. Enzyme

Tabelle 2-4: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden (D)
Proteinase K	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (D)

Bezeichnung	Hersteller
<i>REDTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs GmbH, Frankfurt (D)
<i>SuperScript® II Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
<i>SYBR® Green PCR Master Mix</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

2.5. Gebrauchsfertige Reagenziensätze (Kits)

Tabelle 2-5: Gebrauchsfertige Reagenziensätze

Bezeichnung	Hersteller
Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA (USA)
Affymetrix GeneChip® Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA (USA)
Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA (USA)
Ambion® WT Expression Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim (D)
FITC Annexin V apoptosis detection Kit I	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Plasmidpräparations-Kit NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren (D)
RNeasy Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden (D)
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA (USA)
TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
QIAshredder	Quiagen GmbH, Hilden (D)

2.6. Plasmide und Bakterienstämme

Tabelle 2-6: Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
pCRII®-TOPO Vector	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
pCRII-TOPO- <i>m_cyclophilin</i>	Modifiziert mit murinen cDNA-Sequenzen zur Erstellung von Standardreihen für die Echtzeit-PCR im eigenen Labor.
pCRII-TOPO- <i>m_fra1</i>	
pCRII-TOPO- <i>m_p16</i>	
pCRII-TOPO- <i>m_p19</i>	
pCRII-TOPO- <i>m_p27</i>	

Tabelle 2-7: Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
One Shot® TOP10 Chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

2.7. Oligonukleotide

Die Synthese aller verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg (D) im Reinheitsgrad HPSF (Genotypisierung, Echtzeit-PCR), HPLC (EMSA) oder desalted (siRNAs).

Tabelle 2-8: Sequenzen der Oligonukleotide (Primer) für die Genotypisierung

Name der PCR	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
<i>Pdx1-Cre</i>	Cre-neu-UP	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG
	Cre-neu-LP	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC
<i>Ptf1a^{Cre}</i>	p48-Cre-GT-LP-URP	CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA
	p48-Cre-GT-wt-UP	CCACGGATCACTCACAAAGCGT
	p48-Cre-GT-mut-UP-neu	GCCACCAGCCAGCTATCAA
<i>Rosa26-Cre^{ERT2}</i>	ERT2-sc-UP3	GAATGTGCCTGGCTAGAGATC
	ERT2-sc-LP1	GCAGATTCATCATGCGGA

Name der PCR	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
LSL-Kras^{G12D}	Kras-WT-UP1	CACCAGCTTCGGCTTCCTATT
	Kras-URP-LP1	AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA
	Kras ^{G12D} -mut-UP	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
LSL-Trp53^{R172H}	Trp53 ^{R172H} -WT-UP2	AGCCTTAGACATAACACACGAACT
	Trp53 ^{R172H} -URP-LP	CTTGGAGACATAGCCACACTG
	Trp53 ^{R172H} -mut-UP4	GCCACCATGGCTTGAGTAA
Cdkn2a^{lox}	Ink4a-UP	CCAAGTGTGCAAACCCAGGCTCC
	Ink4a-LP	TTGTTGGCCCAGGATGCCGACATC
fra1^{lox}	Fra1-P1	GAAATGGCTCCGTGGGTAAAGGTA
	Fra1-P2	GACAGGGTTCATCTTCATAGTTCT
	Fra1-P3	TGTACCGGACGCTTGTCATCTCAT
p27^{ko}	mck5	GAGCAGACGCCCAAGAAGC
	mgk3	TGGAACCCTGTGCCATCTCTAT
	Neo-1	CCTTCTATGGCCTTCTTGACG
Rosa26^{mT/mG}	CAG-sc-LP	GTA CTTGGCATATGATACACTTGATGTAC
	R26-Tva-GT-UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	R26-Tva-GT-WT-LP	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
LSL-R26^{TVA-lacZ}/ LSL-PIK3CA^{H1047R}	R26-Tva-GT-UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
	R26-Tva-GT-SA-mut-LP	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
	R26-Tva-GT-WT-LP	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

Tabelle 2-9: Sequenzen der murinen Oligonukleotide (Primer) für die Echtzeit-PCR

Name des Gens	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
cypA	mCyclophilin-fwd	ATGGTCAACCCCACCGTGT
	mCyclophilin-rev	TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTTGTC
Ccl20	mCCL20-fwd	GCTTTGGCATGGGTACTGCT
	mCCL20-rev	CTTTGGATCAGCGCACACAG
CXCL1 (KC)	KC-fwd	TGTGCGAAAAGAAGTGCAG
	KC-rev	ACACAAAATGTCCAAGGGAAG
CXCL2 (Mip2)	Mip2-fwd	AGTGAAGTGCCTGTCAATGC
	Mip2-rev	AGGCAAACCTTTTGACCGCC
CXCL5	mCXCL5-fwd	GCCCTACGGTGAAGTCATA
	mCXCL5-rev	TGCATTCCGCTTAGCTTTCT
fra1	mFra1-E1-fwd	CGCAAGCTCAGGCACAGA
	mFra1-E2-rev	AATGAGGCTGCACCATCCA
fra1 (E2-E4)	mFra1-E2-fwd	CGGCCAGGAGTCATACGAG
	mFra1-E4-rev	CTTCCAGCACCAGCTCAAG

Name des Gens	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
<i>Il6</i>	IL6-fwd	TCGGAGGCTTAATTACACATGTTCT
	IL6-rev	GCATCATCGTTGTTTCATACAATCA
<i>Il2rg</i>	mIL2RG-fwd	ACAGAGATCGAAGCTGGACG
	mIL2RG-rev	GAACCCGAAATGTGTACCGT
<i>Il13ra2</i>	mIL13RA2-fwd	AGCGAATGGAGTGAAGAGGA
	mIL13RA2-rev	GCTCAATGTGGGTTTCAGTT
<i>p16^{INK4A}</i>	p16-TM-for	CCCAACGCCCCGAACT
	p16-TM-rev	GTGAACGTTGCCCATCATCA
<i>p19^{ARF}</i>	p19-TM-for	TCGCAGGTTCTTGGTCACTGT
	p19-TM-rev	GAAGTTACCAAGAAAACCTCTCT
<i>p27^{Kip1}</i>	mp27-for	GTGGACCAAATGCCTGACTC
	mp27-rev	TCTGTTCTGTTGGCCCTTTT
<i>Tnfa</i>	TNF-α-fwd	ATGAGAAGTTCCCAAATGGCC
	TNF-α-rev	TCCACTTGGTGGTTCGCTACG

Tabelle 2-10: Sequenzen der Oligonukleotide für den *Gel Shift Assay* (EMSA)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Modifikation
AP1-s	CGCTTGATGACTCAGCCGGAA	5'-DY682
AP1-as	TTCCGGCTGAGTCATCAAGCG	5'-DY682

Tabelle 2-11: murine siRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
SDI (Kontrolle)	CAGUCGCGUUUGCGACUGGdTdT
mFra1_I	CCGACAAAUUGGAGGAUGAdTdT
mFra1_II	GCAAAAUCCCAGAAGGAGAdTdT

Die Lösung der siRNA-Oligonukleotide erfolgte in 1x siMAX Universalpuffer (6 mM HEPES, 20 mM KCl, 0,2 mM MgCl₂; pH 7,3) auf eine Konzentration von 40 µM.

2.8. Antikörper

Tabelle 2-12: primäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
BrdU, MCA2060	AbD Serotec, Düsseldorf (D)
Cyclin A (H-432), sc-751	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
Cyclin D1 (HD11), sc-246	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
Cyclin D1 (SP4), RM9104-S	Lab Vision, Fremont, CA (USA)
Cytokeratin 19, TROMA 3	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA (USA)
Fra1 (C-12), sc-28310	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
Fra1 (N-17), sc-183	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
Fra1 (R-20), sc-605	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
HDAC1 (05-614)	Millipore Corporate, Billerica, MA (USA)
Ki67 (SP6)	DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg (D)
p21 (C-19), sc-397	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
p27 (C-19), sc-528	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
PCNA (PC10), sc-56	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA (USA)
p44/42 MAPK (ERK1/2), #4696	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, (USA)
p53 (CM5), Novocastra™	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
pan-AKT (C67E7), #4691	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Phospho-AKT (Ser473), #9271	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Phospho-AKT (Thr308), #9275	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204), #4370	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
pan-Ras clone 10, (#05-516)	Millipore Corporate, Billerica, MA (USA)
α-Sma, ab5694	Abcam, Inc., Cambridge (UK)

Bezeichnung	Hersteller
α -Tubulin, T6199	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (D)
β -Actin, A5316	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München (D)

Tabelle 2-13: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-mouse IgG (H+L) DyLight® 680 Conjugate, #5470	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Anti-mouse IgG (H+L) DyLight® 800 Conjugate, #5257	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Anti-rabbit IgG (H+L) DyLight® 680 Conjugate, #5366	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Anti-rabbit IgG (H+L) DyLight® 800 Conjugate, #5151	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA (USA)
Biotinylated anti-mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA (USA)
Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA (USA)
Biotinylated anti-rat IgG (H+L)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA (USA)

2.9. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 2-14: Puffer für DNA-Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Gitschier's Puffer (10x)	670 mM Tris pH 8,8 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 67 mM MgCl_2
DNA-Lysepuffer	10% (v/v) 10x Gitschier's Puffer 0,5% (v/v) Triton X-100 1% β -Mercaptoethanol 400 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K
50x TAE-Puffer, pH 8,5	2 M Tris 100 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure

Tabelle 2-15: Puffer und Lösungen für den *Gel Shift Assay* (EMSA)

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bindungspuffer (10x)	100 mM Tris, pH 7,5 500 mM NaCl 10 mM DTT
Natives Polyacrylamidgel	5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 50 mM Tris, pH 7,5 0,38 M Glycin 2 mM EDTA
10x TGE-Puffer, pH 8,3	0,25 M Tris Base 1,9 M Glycin 10 mM EDTA

Tabelle 2-16: Puffer und Lösungen für *Western Blot*-Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung
IP-Puffer, pH 7,9	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Nonidet P40 10% (v/v) Glycerol
5x-Laemmli-puffer, pH 6,8	10% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 228 mM Tris-HCl 0,75 mM Bromphenolblau 5% (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl
Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl
Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,9 M Glycin 1% (w/v) SDS
Transferpuffer, Wet Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
<i>Blocking</i> -Puffer	5% (w/v) Magermilchpulver 0,1% (v/v) Tween-20 gelöst in PBS
Waschpuffer	0,1% (v/v) Tween-20 in PBS

Tabelle 2-17: Puffer für die Präparation nukleärer/zytosolischer Zellextrakte

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer A	10 mM HEPES, pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mix
Puffer C	20 mM HEPES, pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 1x Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Mix

Tabelle 2-18: Lösungen für die Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase-Färbung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fixierlösung	2% (v/v) Paraformaldehyd in PBS pH 7,4
X-Gal-Färbelösung	40 mM Zitronensäure / Na ₂ HPO ₄ , pH 6,0 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mg/ml X-Gal

Tabelle 2-19: Puffer für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x KCM-Puffer	500 mM KCl 150 mM CaCl ₂ 250 mM MgCl ₂

2.10. Zelllinien und Reagenzien für die Zellkultur

Tabelle 2-20: Primäre duktale murine Pankreaszelllinien

Bezeichnung	Genotyp
PDC-D245	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{trva-lacZ/+}</i>
PDC-D264	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i> , <i>LSL-R26^{trva-lacZ/+}</i>

Bezeichnung	Genotyp
PDC-D482	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i>
PDC-SD51	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>R26^{mT/mG}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i>
PDC-SD59	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PDC-SD78	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PDC-SD81	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PDC-SD132	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>Cdkn2a^{lox/lox}</i>
PDC-SD139	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i>
PDC-SD164	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/R172H}</i>
PDC-SDF54	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i>
PDC-SDF58	<i>R26-Cre^{ERT2/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i>
PanIN-D218	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>R26^{mT/mG}</i>
PanIN-D239	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/tva-lacZ}</i>
PanIN-D382	<i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PanIN-D758	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>R26^{mT/mG}</i>
PanIN-SDF182	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>Fra1^{lox/lox}</i>

PDC=*Pancreatic Ductal Cells*; PanIN=*Pankreatische intraepitheliale Neoplasien*

Tabelle 2-21: Primäre Zelllinien aus murinen Pankreastumoren

Bezeichnung	Genotyp
PPT-434	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i> , <i>LSL-PCNA^{IRES-fLucZ/+}</i>
PPT-6037	<i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PPT-6554	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>Trp53^{lox/lox}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PPT-7662	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PPT-8024	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/tva-lacZ}</i>
PPT-8025	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/tva-lacZ}</i>
PPT-AA373	<i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i> , <i>LSL-R26^{tva-lacZ/+}</i>
PPT-BK50	<i>Pdx1-Cre</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>LSL-Trp53^{R172H/+}</i>
PPT-D146	<i>Ptf1a^{Cre/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> , <i>p27^{+/-}</i>

Bezeichnung	Genotyp
PPT-D261	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>p27</i> ^{+/-} , <i>LSL-R26</i> ^{tva-lacZ/+}
PPT-D341	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>p27</i> ^{-/-}
PPT-D380	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>p27</i> ^{+/-} , <i>LSL-R26</i> ^{tva-lacZ/+}
PPT-D613	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>p27</i> ^{-/-}
PPT-D642	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>p27</i> ^{-/-}
PPT-W22	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} , <i>Trp53</i> ^{lox/lox} , <i>LSL-R26</i> ^{tva-lacZ/+}

PPT=Primary Pancreatic Tumor

Tabelle 2-22: Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Bovine Pituitary Extract (BPE)	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Collagen I, <i>Rat Tail</i>	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Collagenase Typ 2 und 4	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ (USA)
Collagenase, <i>Chlostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Cholera Toxin, <i>Vibrio cholerae</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (D-MEM) mit L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
D-MEM/F-12	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Epidermal Growth Factor (EGF), <i>mouse natural</i>	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin (D)
Fungizone® antimycotic	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
ITS+ Premix	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
MEK-Inhibitor PD0325901	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX (USA)

Bezeichnung	Hersteller
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
NuSerum™ IV	BD Biosciences, San Jose, CA (USA)
Opti-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Polyethylenimin (Pei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
<i>Soybean</i> Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Tabelle 2-23: Medien für die Zellkultur

Medium / Zelltyp	Zusammensetzung
Medium für primäre murine Pankreas-karzinomzelllinien	D-MEM 10% (v/v) FCS (Biochrom AG) 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin
Medium für primäre duktale Zellen aus dem murinen Pankreas	D-MEM / F-12 5% (v/v) NuSerum™ IV 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 5 mg/ml Glucose 0,1 mg/ml Trypsin-Inhibitor 0,5% (v/v) ITS+ Premix 25 µg/ml BPE 20 ng/ml EGF 5 nM T3 1 µM Dexamethason 1,22 mg/ml Nicotinamid 100 ng/ml Cholera toxin 2,5 µg/ml Fungizone® (bis Passage 2)
Medium zum Einfrieren der Zellen	70% (v/v) D-MEM 20% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO

Tabelle 2-24: Lösungen für die Isolierung primärer duktaler Pankreaszellen

Lösung	Zusammensetzung
Gewebelösung	HBSS 0,9 mg/ml Glucose 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 2,5 µg/ml Fungizone® 47,6 µM CaCl ₂
Collagen (zum Beschichten)	2,31 mg/ml Collagen I, <i>rat tail</i> 1x PBS 17 mM NaOH
Collagenase-Lösung	D-MEM/F-12 1 mg/ml Collagenase, <i>clostridium histolyticum</i>
Trypsin-Inhibitor-Lösung	D-MEM/F-12 25 mg/ml Trypsin-Inhibitor

2.11. Reagenzien und Lösungen für die Histochemie

Tabelle 2-25: Reagenzien für histochemische Analysen

Bezeichnung	Hersteller
Alcian blue 8GX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Alexa Fluor® 594 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Aluminiumsulfat	Honeywell Specialty Chemicals GmbH Seelze, Seelze (D)
Antigen Unmasking Solution, Citrate-based	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Certistain® Nuclear fast red	Merck KGaA, Darmstadt (D)
DAB Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Eosin wässrig, 2%	Waldeck GmbH & Co KG, Münster (D)
Goat serum G9023	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt (D)
H ₂ O ₂ , 30%	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Pancreas cancer tissue array, Cat No: PAC481	Pantomics, Inc, San Francisco, CA (USA)

Bezeichnung	Hersteller
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf (D)
Roti-Histofix 4%	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Roti-Histol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Tissue-Tec® O.C.T.T.™	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn (NL)
TO-PRO®-3 Iodid	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Vectashield mounting medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Vectastain® elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)

Tabelle 2-26: Lösungen für histochemische Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alcian blue, pH 2,5	1% Alcian blue 3% Essigsäure
Kernechtrot	0,1% Nuclear fast red 2,5% Aluminiumsulfat

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten und Experimente erfolgte unter Sicherheitswerkbanken unter sterilen Bedingungen. Alle murinen Zelllinien wurden in den entsprechenden Medien (Tab. 2-23) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.1.1. Isolierung primärer duktaler Pankreaszellen aus der Maus

Für die Isolierung primärer duktaler Pankreaszellen (PDCs) wurden Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen ausgewählt. Die Kultivierung der murinen PDCs erfolgte auf Collagen beschichteten Zellkulturschalen, die zu Beginn der Isolierung frisch vorbereitet und bei 37°C im Inkubator aufbewahrt wurden.

Die Isolierung der PDCs wurde anhand eines modifizierten Protokolls (Schreiber *et al.*, 2004) wie folgt durchgeführt. Nach schmerzfreier Tötung der Maus (s. 3.3.4.) erfolgte die schnelle Resektion des Pankreas und Überführung des Organs in Eis gekühlte Gewebelösung (Tab. 2-24). Unter einer Sterilbank wurde das Pankreas in ein steriles Becherglas überführt, mit frischer Gewebelösung bedeckt und mit Hilfe einer sterilisierten Schere in Gewebestücke mit einem Durchmesser kleiner 1 mm zerkleinert. Das Becherglas wurde anschließend mit Gewebelösung aufgefüllt und geschwenkt, so dass an der Oberfläche schwimmende Fettteilchen abgesaugt werden konnten. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde die Gewebelösung mit den Pankreasgewebeteilchen in eine 100 ml Schottflasche mit enthaltenem Magnetührstab überführt und die Gewebelösung durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Nach Zugabe von 25 ml Collagenase-Lösung (1 mg/ml) wurden die Gewebeteilchen für ca. 20 min im Wasserbad bei 37°C auf einem Unterwassermagnetrührer unter leichtem Rühren inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 25 ml Gewebelösung gestoppt und die gesamte Lösung in ein 50 ml Falcon überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1.000 rpm in einer gekühlten Zentrifuge wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Gewebepellet mit 2 ml Trypsin/EDTA für ca. 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Trypsin-Inhibitorlösung und kurzer Inkubation bei RT wurde das 50 ml Falcon mit Gewebelösung aufgefüllt und es erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.000 rpm. Nach vorsichtigem Absaugen wurde das Pellet in 50 ml D-MEM/F-12-Medium für duktale Zellen (Tab. 2-23) resuspendiert und erneut für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert, um restliche Collagenaseaktivität zu eliminieren und somit einem Verdau der Collagen beschichteten Zellkulturschalen vorzubeugen. Nach diesem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 12 ml D-MEM/F-12-Medium für duktale Zellen aufgenommen und vorsichtig auf eine Collagen beschichtete 6-Well-Platte aufgeteilt. Bis zum ersten Passagieren der primären dukталen Zellen, nach ca. 7 Tagen, erfolgte täglich ein Mediumwechsel, um restliche Zelltrümmer und Gewebestückchen zu entfernen.

3.1.2. Passagieren und Einfrieren primärer duktaler Pankreaszellen

Die primären PDCs wurden ein- bis zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3 passagiert, so dass eine Konfluenz von mehr als 85% vermieden wurde. Hierfür wurde die Collagenschicht

nach Entfernen des Mediums in ein 50 ml Falcon mit 10 ml steril filtrierter Collagenase-Lösung überführt und für ca. 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach vollständigem Verdau des Collagens wurden die Zellen für 5 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet nach Entfernen des Überstandes mit 1 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Trypsin-Inhibitorlösung abgestoppt und nach kurzer Inkubationszeit wurde das 50 ml Falcon mit D-MEM/F-12-Medium aufgefüllt und die Zellen erneut für 5 min bei 1.000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in D-MEM/F-12-Medium für duktales Zellen aufgenommen und auf Collagen beschichtete 10-cm-Kulturschalen verteilt. Nach dem Passagieren der Zellen erfolgte der Wechsel des Mediums alle 2 bis 3 Tage.

Das Einfrieren primärer PDCs wurde analog der oben beschriebenen Schritte für das Passagieren der Zellen durchgeführt, wobei das D-MEM/F-12-Medium für duktales Zellen zur Aufnahme des Zellpellets mit 5% DMSO versetzt wurde und die Zellen nach Aufteilung auf drei Einfrierröhrchen für 2 Tage bei -80°C aufbewahrt wurden, bevor sie dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.1.3. Behandlung der duktales Pankreaszellen mit 4-Hydroxytamoxifen

Zur Aktivierung der Tamoxifen induzierbaren Cre-Rekombinase ($R26\text{-Cre}^{\text{ERT}2}$), die in den aus $R26\text{-Cre}^{\text{ERT}2/+}$, $LSL\text{-Kras}^{\text{G}12\text{D}/+}$ transgenen Mäusen isolierten PDCs vom ubiquitären *Rosa26*-Genlocus aus exprimiert wird, wurden die Zellen nach dem Passagieren für 3, 5 und 7 Tage mit 200 nM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt. Das 4-OHT wurde zu einer Konzentration von 500 μM in EtOH gelöst und entsprechend mit D-MEM/F-12-Medium für duktales Zellen verdünnt. Als Negativkontrolle dienten EtOH behandelte PDCs. Aufgrund der Instabilität des stärker aktiven *Z*-(*trans*)-Isomers von 4-OHT in Kulturmedium erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

Zur Überprüfung der Rekombinationseffizienz wurden weiterhin PDCs aus einer $R26^{\text{CreERT}2/\text{mT-mG}}$ -Reportermauslinie isoliert, die das rot fluoreszierende Protein tdTomato vom *Rosa26*-Genlocus aus exprimiert (s. 3.3.2.). Eine Tamoxifen induzierte Cre-Rekombinaseaktivität führt hierbei zur Rekombination der geflochtenen tdTomato-Expressionskassette, was in einer Expression des grün fluoreszierenden Proteins eGFP resultiert. Die Analyse der Rekombinationseffizienz erfolgte nach Behandlung dieser murinen duktales Zelllinie für 2, 4, 6 und 8 Tage mit 200 nM 4-OHT mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.1.4. Isolierung und Kultivierung primärer muriner Pankreaskarzinomzellen

Die Isolierung primärer muriner Pankreaskarzinomzellen (PPT-Zellen; Tab. 2-21) erfolgte während der Sektion der Versuchstiere (s. 3.3.4.) unter möglichst sterilen Bedingungen. So wurden bei Vorhandensein eines primären Pankreastumors und evtl. makroskopisch sichtbaren Metastasen Gewebestücke der Größe von 1 bis 2 mm mit sterilisiertem Präparationsbesteck entnommen und in Petrischalen mit sterilem PBS überführt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung der Gewebeproben in separaten Petrischalen unter einer Sterilbank mit Hilfe von je zwei Skalpellern. Nach Aufnahme der Proben in je 5 ml D-MEM mit Collagenase Typ 2 (200 U/ml) wurden diese in Falcon-Röhrchen für ca. 24 h im

Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.000 rpm und das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes in 5 ml Medium für primäre Tumorzellen (Tab. 2-23) aufgenommen und in einer 25 cm²-Flasche kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und bei Erreichen der entsprechenden Konfluenz subkultiviert.

Das Passagieren der murinen Pankreastumorzellen erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS und anschließender Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zum vollständigen Ablösen der Zellen, um eine Selektion schlecht haftender Zellen zu vermeiden. Nach Zugabe von frischem Medium und vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension auf die neuen Kulturgefäße verteilt bzw. zuvor mit Hilfe einer Neubauerzählkammer eine definierte Zellzahl für die entsprechenden Versuche eingestellt.

Für eine Langzeitlagerung der entsprechenden Tumorzellkulturen wurden die murinen Tumorzellen nach dem oben beschriebenen Trypsin-Inkubationsschritt in PBS resuspendiert, für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (Tab. 2-23) aufgenommen. Nach dem Überführen in Einfrierrohrchen erfolgte eine 2-tägige Lagerung bei -80°C und die anschließende Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

3.1.5. siRNA-Transfektion muriner Pankreaskarzinomzellen

Für die Transfektion mit siRNA (*small interfering RNA*; Tab. 2-11) wurden die murinen Pankreaskarzinomzellen 24 h vor der Transfektion in 6-*well*- und 96-*well*-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde hierfür auf 50.000 Zellen pro 6-*well* und 5.000 Zellen pro 96-*well* eingestellt. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit D-MEM ohne Zusätze gewaschen, um auf die Transfektion inhibierend wirkende Serumreste zu entfernen. Als Transfektionsreagenz diente Polyethylenimin (Pei) (Wirth *et al.*, 2011), das im Volumenverhältnis von 2 µl Pei auf 1 ml Medium eingesetzt wurde und die Endkonzentration der siRNAs betrug 100 nM. Die Erstellung des Transfektionsansatzes für die entsprechenden *well*-Größen ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Ansatz für siRNA-Transfektionen

Ansatz	Zusammensetzung	6- <i>well</i>	96- <i>well</i>	Inkubation
1	Opti-MEM Pei	98 µl 2 µl	9,8 µl 0,2 µl	5 min bei RT; dann Zugabe zu Ansatz 2
2	Opti-MEM siRNA (40 µM)	97,5 µl 2,5 µl	9,75 µl 0,25 µl	20-25 min bei RT nach Zugabe von Ansatz 1
Gesamtvolumen		200 µl	20 µl	

Nach Inkubation des Transfektionsansatzes wurden je 800 µl D-MEM ohne FCS pro 6-*well* und 80 µl FCS freies D-MEM pro 96-*well* vorgelegt und die entsprechende Menge

Transfektionsansatz (200 μ l und 20 μ l) hinzugefügt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumaustausch durch D-MEM mit 10% FCS.

3.1.6. Behandlung der Zellen mit MEK-Inhibitor

Zur Analyse der Kopplung des Kras-MEK-ERK-Signalwegs an die Expression von Fra1 wurden sowohl murine Pankreaskarzinomzellen als auch primäre PDCs mit dem MEK-Inhibitor PD0325901 behandelt. Die primären Pankreaskarzinomzellen wurden aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert, auf 10 cm-Kulturschalen und in 96-well-Platten ausgesät und für 48h mit dem oben genannten MEK-Inhibitor behandelt. Hierfür wurde eine 50 μ M Stocklösung des Inhibitors mit DMSO hergestellt, aus der durch entsprechendes Verdünnen Konzentrationen von 10, 25 und 50 nM im Medium eingestellt wurden. Als Referenz dienten DMSO behandelte Zellen.

Die Isolation der primären PDCs erfolgte aus einer *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mauslinie. Diese Zellen wurden zunächst für 5 Tage mit 200 nM 4-OHT behandelt, um eine Aktivierung der Cre-Rekombinase zu induzieren, aus der eine Rekombination der *loxP*-Element flankierten Stopkassette resultiert, was schließlich zur Expression des onkogenen *Kras*^{G12D}-Gens führt. Anschließend wurden diese Zellen auf Collagen beschichtete 10 cm-Kulturschalen ausgesät und ebenfalls für 48 h mit dem MEK-Inhibitor PD0325901 in den oben genannten Konzentrationen behandelt.

3.1.7. MTT-Test

Der MTT-Test dient der Messung der Viabilität von Zellen, da mit ihm die Aktivität der zytosolischen und mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen bestimmt werden kann. Hierbei wird das schwach gelbliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von den Zellen aufgenommen und durch NADH abhängige Reduktasen in das wasserunlösliche, dunkelblaue Formazan umgewandelt. Für den MTT-Test wurden die Zellen stets in Triplikaten in 96-well-Platten ausgesät, wobei für siRNA-Transfektionen und Inhibitorbehandlungen 5.000 Zellen pro 96-well und für Zellviabilitätstests über 5 Tage ohne Behandlung 1.000 Zellen pro 96-well ausgesät wurden.

Die Anwendung des MTT-Tests nach der siRNA-Transfektion muriner Pankreastumorzellen erfolgte 48h nach der Transfektion durch Zugabe von 10 μ l MTT-Reagenz zu 100 μ l Medium und anschließender Inkubation für 4h bei 37°C. Nach Entfernen des Mediums wurden die wasserunlöslichen Formazankristalle durch Zugabe von 200 μ l eines EtOH/DMSO-Gemisches (1:1, v/v) gelöst und die 96-well-Platte für 10 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Mit Hilfe eines Photometers (Anthos 2001) wurde anschließend bei 600 nm die optische Dichte der Proben ermittelt und gegen die jeweilige Referenzprobe (Kontroll-siRNA) ins Verhältnis gesetzt.

Die Zellviabilität muriner Pankreaskarzinomzellen nach 48h Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD0325901 wurde ebenfalls mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt, wobei DMSO behandelte Zellen als Referenz dienten.

3.1.8. Caspase-Assay

Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte mit dem Caspase-Glo 3/7-Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers. Hierbei führt die spezifische Spaltung eines luminogenen Substrates durch Caspase 3/7 zur Freisetzung von Aminoluciferin, das nach einer anschließenden Luciferasereaktion in einem Lumineszenzsignal resultiert. Für die Messung der Caspase 3/7-Aktivität siRNA transfizierter muriner Pankreastumorzellen wurden je 100 µl Caspase-Reagenz pro 96-*well* zugegeben und nach 1h Inkubationszeit die Lumineszenz im FLUOstar Luminometer (BMG Labtech) analysiert.

3.1.9. Annexin V-Färbung

Für die Detektion apoptotischer Zellen wurden diese mit FITC-Annexin V markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Annexin V besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin (PS), einem Membranphospholipid, das in apoptotischen Zellen zur Außenseite der Plasmamembran transloziert wird. Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte eine kombinierte Färbung mit Propidiumjodid (PI), das nur perforierte Membranen durchdringen kann. Dies erlaubt neben der Identifizierung von nekrotischen Zellen (PI positiv; Annexin V negativ) die Detektion von Zellen, die sich in der frühen (PI negativ; Annexin V positiv) oder späten (PI positiv; Annexin V positiv) apoptotischen Phase befinden. Für die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach siRNA vermittelter Herunterregulierung von *Fra1* wurden die Zellen trypsiniert und zusammen mit dem Mediumüberstand für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen (5 min, 1.000 rpm, 4°C) und anschließend in 1 ml 1x Bindungspuffer (FITC Apoptosis Detection Kit) resuspendiert. Es wurden 100 µl Zellsuspension mit 400 µl Bindungspuffer (1x), 5 µl FITC Annexin V und 5 µl PI in FACS-Röhrchen pipettiert, gevortext und 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Calibur (BD Biosciences).

3.1.10. Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität

Für die Analyse zellulärer Seneszenz wurde die Aktivität der Seneszenz assoziierten β -Galaktosidase bei pH 6,0 untersucht, die das farblose Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) in Galaktose und ein blaues Indoxylderivat spaltet. Hierfür wurden in 6-*well*-Platten kultivierte murine Pankreastumorzellen dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für 5 min bei RT mit 2% PFA fixiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS (pH 7,4) wurden die Zellen mit frisch angesetzter X-Gal-Färbelösung (Tab. 2-18) bei 37°C für ca. 6 bis 16 Stunden inkubiert bis eine Blaufärbung unter dem Lichtmikroskop detektierbar war.

3.1.11. Präparation von Ganzzelextrakten

Murine Pankreaskarzinomzellen wurden für siRNA-Transfektionen in 6-*well*-Platten und für Inhibitor-Behandlungen in 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Zum Ernten der Zellen für die Proteingewinnung wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Kulturgefäße auf Eis überführt und je 30 µl gekühlter IP-Puffer (Tab. 2-16) inkl. Protease- und Phosphataseinhibitoren (1x konzentriert) pro 6-*well* bzw. 200 µl Puffer pro 10 cm-Kulturschale hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst, das Lysat in *Safe lock*-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Primäre PDCs wurden für die Induktion mit 4-OHT oder die Behandlung mit MEK-Inhibitor auf Collagen beschichteten 10 cm-Kulturschalen kultiviert und für die Gewinnung von Ganzzellextrakten erfolgte zunächst ein Inkubationsschritt in Collagenase-Lösung zur Freisetzung der Zellen (s. 3.1.2.). Die freigesetzten Zellen wurden für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet einmal mit kaltem PBS gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.000 rpm und 4°C wurde das Pellet in ca. 200 µl IP-Puffer inkl. Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen und ebenfalls in einem *Safe lock*-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

3.1.12. Präparation von nukleären und zytosolischen Zellextrakten

Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation des p27^{Kip1}-Proteins in primären murinen Pankreaskarzinomzellen wurden nukleäre und zytosolische Extrakte aus diesen Zellen gewonnen. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen auf je drei 10 cm-Kulturschalen pro Zelllinie ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80% geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und nach Zugabe von 300 µl PBS je Kulturschale mit einem Zellschaber auf Eis abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 2 min bei 1.600 rpm und 4°C wurde das Zellpellet in 400 µl Puffer A (Tab. 2-17) aufgenommen, resuspendiert und für 15 min auf Eis im Kühlraum inkubiert. Für einen mechanischen Zellaufschluss wurde die Suspension anschließend 7 bis 8 mal mit einer Spritze durch eine Injektionsnadel (26G) aufgezogen. Durch einen zweiten Zentrifugationsschritt für 2 min bei 6.800 rpm und 4°C wurden nun die Zellkerne pelletiert (Zellkern- und Membranfraktion). Der Überstand (Zytoplasmafraktion) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 min bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert, um restliche Zelltrümmer zu entfernen. Der hierbei erhaltene Überstand (Zytoplasmaproteine) wurde in ein 1,5 ml *Safe lock*-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Zellkernpellet wurde zweimal mit je 400 µl Puffer A gewaschen und für 2 min bei 6.800 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das nach dem zweiten Waschschrift erhaltene Pellet wurde in 50 µl Puffer C (Tab. 2-17) resuspendiert und zum Freisetzen der Kernproteine für 45-60 min auf einem Schüttler im Kühlraum eluiert. Nach der Inkubation erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt von 20 min bei 13.200 rpm und 4°C und der Überstand (Kernproteine) wurde ebenfalls in ein 1,5 ml *Safe lock*-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beide Fraktionen wurden bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Transformation von Bakterien

Für die Transformation der Plasmide, die zur Erstellung der Standardreihen für die Echtzeit-PCR dienen, wurden chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stamms TOP10 verwendet (Tab. 2-7). Zur Herstellung des Transformationsansatzes wurden 200-500 ng Plasmid mit 20 µl 5x KCM-Puffer und dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und vorsichtig zu 100 µl kompetenten Bakterien auf Eis hinzugefügt. Der Ansatz wurde zunächst für 20 min bei 4°C und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml S.O.C.-Medium wurden die TOP10 *E. coli* Bakterien für 1h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, um die Expression der erworbenen Resistenzgene bei erfolgreicher Plasmidaufnahme zu ermöglichen. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Kanamycin-Agarplatten (Antibiotikakonzentration 100 µg/ml) in verschiedenen Volumina ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Identifizierung positiver Klone, die das Plasmid mit einem korrekten Insert in der richtigen Orientierung aufgenommen haben, erfolgte zunächst mittels Kontroll-PCR. Hierfür wurden mehrere Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, für eine DNA-Isolierung in PCR-Reaktionsgefäße überführt und parallel auf eine neue LB-Agar-Platte mit Antibiotikum überimpft. Durch Zugabe von je 50 µl dH₂O in die PCR-Reaktionsgefäße und 5 min Inkubation in einer PCR-Maschine bei 95°C wurden die Bakterien lysiert und die freigesetzte DNA konnte direkt in die entsprechenden Kontroll-PCRs eingesetzt werden. Die Bakterienkolonien positiver Klone wurden von der parallel überimpften Platte gepickt und zur Plasmidamplifikation in je 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Antibiotikum überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen für 10 min bei 7.500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Bakterienpellet zur Gewinnung von Plasmid-DNA aufgereinigt (s. 3.2.2.). Zur Erstellung einer Glycerindauerkultur der positiven Klone wurden vor dem Abzentrifugieren 500 µl der Bakteriensuspension mit 400 µl Glycerin gemischt und die Kultur bei -80°C gelagert.

3.2.2. Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus einer 5 ml Bakterienkultur wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit nach Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel) verwendet. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Plasmide wurde photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 ermittelt. Die Überprüfung der Größe der generierten Plasmide erfolgte mittels Restriktionskontrollverdau anhand der erhaltenen Fragmentgrößen auf einem Agarosegel (s. 3.2.5.).

3.2.3. Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Gewebe und Zellen, die anschließend in Genotypisierungs-PCRs eingesetzt wurde, erfolgte durch Zugabe von 50-100 µl DNA-Lysepuffer (Soriano), der zuvor mit Proteinase K (1:50) versetzt wurde. Die DNA-Lyseansätze wurden für 1 h 30 min bei 55°C in einer PCR-Maschine inkubiert. Anschließend

erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 15 min bei 95°C. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für 10 sec gevortext und Zell- und Gewebereste für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur PCR-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Kary Mullis entwickelte Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986) wurde hauptsächlich zur DNA-Analyse der verschiedenen transgenen Mauslinien eingesetzt, für die spezielle Genotypisierungs-PCRs zur Identifikation der mutierten Allele im Vergleich zum Wildtyp-Allel etabliert wurden (Tab. 3-3). Die PCR diente außerdem der Überprüfung der Rekombination von Stop-Elementen (*LSL-Kras^{G12D}*) oder der Deletion gefloxter Gene (*Fra1^{lox}*) in isolierten Zelllinien oder Gewebeproben. Des Weiteren wurden positive Klone transformierter Bakterien (s. 3.2.1) mittels Kontroll-PCRs identifiziert, die nach einem Standard-PCR-Programm (Tab. 3-2) durchgeführt wurden.

Tabelle 3-2: Reaktionsansatz und Bedingungen für Standard-PCRs

Komponente	Volumen [μ l]	Reaktionsbedingungen		
<i>REDTaq® ReadyMixTM</i>	12,5	95°C	3 min	
Forward Primer (10 μ M)	0,25 - 1	95°C	45 sec	40 Zyklen
Reversed Primer (10 μ M)	0,25 - 1	55 - 62°C	1 min	
dH ₂ O	ad 25	72°C	1 min 30 sec	
DNA	1 - 2	72°C	7 min	

Die Genotypisierungs-PCRs wurden mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer, Tab. 2-8) in den optimierten Konzentrationen durchgeführt, wobei 1,5 μ l genomische DNA in die Reaktion eingesetzt wurden.

Tabelle 3-3: Bedingungen und Bandengrößen der Genotypisierungs-PCRs

PCR	Denaturierung	Annealing	Elongation	Bandengröße
<i>Pdx1-Cre</i>	95°C 45 sec	58°C 45 sec	72°C 1 min	390 bp (mut) keine Bande (wt)
<i>Ptf1a^{Cre}</i>		60°C 1 min	72°C 1 min 30 sec	400 bp (mut) 600 bp (wt)
<i>R26-Cre^{ERT2}</i>		55°C 1 min		190 bp (mut) keine Bande (wt)
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>				170 bp (mut) 270 bp (wt) 300 bp (stop del)

PCR	Denaturierung	Annealing	Elongation	Bandengröße
LSL-<i>Trp53</i>^{R172H}	95°C 30 sec	60°C 30 sec	72°C 1 min	270 bp (mut) 570 bp (wt)
<i>Cdkn2a</i>^{lox}	95°C 45 sec	58°C 1 min	72°C 1 min 30 sec	180 bp (mut) 140 bp (wt)
<i>Fra1</i>^{lox}		59°C 45 sec		354 bp (mut) 308 bp (wt) 408 bp (del)
<i>p27</i>^{wt}	95°C 30 sec	60°C 30 sec		1.300 bp (wt)
<i>p27</i>^{ko}		57°C 30 sec		500 bp (mut)
<i>R26-mT/mG</i>	95°C 45 sec	62°C 1 min		450 bp (mut) 650 bp (wt)
<i>LSL-R26</i>^{TvA-lacZ}				310 bp (mut) 600 bp (wt)

wt = Wildtyp-Allel; mut = mutiertes Allel; del = deletiert

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5.).

3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und Plasmidrestriktions-Ansätzen sowie auch die Qualitätskontrolle von RNA erfolgten durch elektrophoretische Auftrennung auf 0,8 bis 2%-igen Agarosegelen. Die Herstellung der Gele erfolgte durch Aufkochen von Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle. Die Gele wurden nach 20 min Abkühlen bei RT mit Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelgießform überführt. Die Proben wurden mit Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem Standard definierter Bandengrößen auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde für 1 bis 2h bei 110 V in 1xTAE-Puffer durchgeführt. Für die Detektion der Banden wurde das Geldokumentationssystem UVsolo TS verwendet.

3.2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) stellt eine einfache Methode zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen dar. Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass ungebundene DNA in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität aufweist im Vergleich zu DNA-Protein-Komplexen. Zur Visualisierung dieses Effekts werden häufig radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotide mit spezifischen Proteinbindungssequenzen eingesetzt. Für die Studie der AP-1-Bindungsaktivität in 4-OHT induzierten primären PDCs, isoliert aus einer *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mauslinie, wurde ein nicht radioaktiver EMSA angewandt, bei dem Fluorophor (Dy682) markierte doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einer AP-1-Konsensussequenz eingesetzt wurden (Tab. 2-10). Hierfür wurden die modifizierten einzelsträngigen Oligonukleotide zunächst in TE-Puffer auf eine Konzentration von 20 pmol/µl eingestellt und je 5 µl der komplementären Oligonukleotide hybridisiert. Für die Hybridisierung wurde der Ansatz in einer PCR-Maschine für 3 min bei 100°C inkubiert und anschließend durch Ausschalten der Maschine auf RT

abgekühlt. Anschließend wurden die hybridisierten Oligonukleotide mit dH₂O 1:200 verdünnt und mit Ganzzellextrakten aus 4-OHT induzierten und EtOH behandelten PDCs (s. 3.1.3. und 3.1.11.) anhand des Schemas in Tabelle 3-4 inkubiert. Als Kontrollreaktion wurde die Menge an Ganzzellextrakt durch 1x Bindungspuffer im Reaktionsansatz substituiert.

Tabelle 3-4: Ansatz für die Bindungsreaktion (EMSA)

Komponente	Volumen [µl]
10x Bindungspuffer	1
steriles ddH ₂ O	4
25 mM DTT / 2,5% Tween-20	2
AP1 DNA-Oligonukleotide (hybridisiert)	1
Ganzzellextrakt (2 µg)	2

Die Bindungsreaktionsansätze wurden für 20 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl *Orange G* Ladepuffer wurden die Ansätze auf ein natives 5%iges Acrylamidgel (Tab. 3-5) geladen und die Gelelektrophorese für ca. 30 min bei 10 V/cm in 1xTGE-Puffer lichtgeschützt durchgeführt.

Tabelle 3-5: Ansatz für die Gelpräparation (EMSA)

Komponente	Volumen
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5 ml
1 M Tris, pH 7,5	2 ml
2 M Glycin	7,6 ml
0,5 M EDTA	160 µl
dH ₂ O	25 ml
10% APS	200 µl
TEMED	30 µl

Die Analyse der AP-1-Bindungsaktivität erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System von LI-COR.

3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der photometrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Hierfür wurden die Zellysate (s. 3.1.11.) zunächst für 20 min bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit dH₂O verdünnt und je 300 µl pro *well* einer Microtiterplatte vorgelegt. Für die Quantifizierung der Lysate wurde eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen von BSA verwendet. Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben erfolgte in Triplikaten, wobei je 1 µl in jedes *well* pipettiert wurde. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Farbreaktion anhand der OD bei 600 nm mit dem Mikroplattenphotometer Anthos 2001 gemessen und die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet. Durch entsprechendes Verdünnen mit IP-Puffer wurden alle Proben auf die gleiche

Konzentration eingestellt und nach Zugabe von 5x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C erhitzt. Die denaturierten Proben wurden bis zur Analyse mittels *Western Blot* bei -20°C gelagert.

3.2.8. *Western Blot*

Die Analyse von Proteinen aus Zellextrakten erfolgte nach Auftrennung mittels einer diskontinuierlichen *Sodium dodecyl sulfat* Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurden zunächst Sammel- und Trenngele anhand der Zusammensetzung in Tabelle 3-6 angefertigt.

Tabelle 3-6: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

Komponente	Sammelgel	Trenngel	10%	12 %
ddH ₂ O	3 ml		4,1 ml	3,4 ml
Sammelgelpuffer	1,3 ml		-	-
Trenngelpuffer	-		2,6 ml	2,6 ml
Acrylamid (30%)	750 µl		3,3 ml	4 ml
SDS (10%)	50 µl		100 µl	100 µl
APS (10%)	25 µl		50 µl	50 µl
TEMED	10 µl		15 µl	15 µl

Nach Initiation der Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED zum Trenngelansatz wurde dieser in eine Gelgießapparatur gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Isopropanol entfernt und der mit APS und TEMED aktivierte Sammelgelansatz auf das polymerisierte Trenngel überführt und mit einem Kamm die Probenaschen definiert. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels und Reinigung der Geltaschen mit 1x Laufpuffer wurden 70-100 µg jeder Proteinprobe geladen, die zuvor für 5 min bei 95°C erhitzt wurden. Die Gelelektrophorese wurde bei 80-120 V für ca. 3 bis 4h mit 1x Laufpuffer (Tab. 2-16) durchgeführt.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-FL) erfolgte in einer *Wet Blot*-Kammer für 2h bei 350 mA unter Kühlung. Die Membran wurde zuvor kurz in Methanol aktiviert und in dH₂O gewässert.

Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Membranen nach dem *Western Blot* für 30 min bei RT in *Blocking*-Puffer auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit ca. 4 ml der entsprechenden primären Antikörperlösungen in Folie eingeschweißt und im Kühlraum bei 4°C über Nacht auf dem Wippschüttler inkubiert. Die Herstellung der meisten Antikörperlösungen erfolgte in *Blocking*-Puffer (Verdünnung 1:250 bis 1:1000). Antikörper zur Detektion phosphorylierter Proteine wurden in PBS mit 5% (w/v) BSA und 0,1% (v/v) Tween-20 verdünnt. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen 3 x 10 min mit Waschpuffer inkubiert und anschließend mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000) für 1-2h lichtgeschützt bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten (lichtgeschützt) wurden die Membranen mit dem Odyssey Infrared Imaging System bei den Wellenlängen

700 nm und 800 nm analysiert. Die Kontrolle einer einheitlichen Proteinladungsmenge erfolgte mittels Detektion von β -Aktin oder α -Tubulin (Verdünnung 1:2000).

3.2.9. Ras-Aktivierungs-Assay

Der Nachweis von aktiviertem GTP-gebundenem Ras in 4-OHT induzierten primären PDCs aus einer *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mauslinie wurde mit Hilfe eines Ras *pull down*-Assays durchgeführt. Die Durchführung des Assays orientierte sich am *Ras Activation Kit* Protokoll von Millipore. Hierbei wurden zunächst Ganzzellextrakte aus EtOH behandelten und für 5 und 7 Tage 4-OHT induzierten murinen PDCs gewonnen (s. 3.1.11.), wobei das Zellpellet in Eis gekühltem *Mg²⁺ Lysis Buffer* (inkl. Protease- und Phosphataseinhibitoren) aufgenommen wurde. Für den Ras-Aktivierungs-Assay wurden von jeder Probe 500 μ g Protein in einem Volumen von 500 μ l *Mg²⁺ Lysis Buffer* eingestellt. Nach Zugabe von je 10 μ l Raf-RBD-Agarose-Beads wurden die Ansätze für 1h im Kühlraum in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die *Beads* wurden anschließend durch Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert und die Überstände für weitere Proteinanalysen bei -80°C gelagert. Die *Beads* wurden 3x mit je 400 μ l *Mg²⁺ Lysis buffer* gewaschen und anschließend zur Freisetzung des gebundenen Ras-Proteins in 40 μ l 2x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden danach für 1 min bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert und 35 μ l des Überstandes auf einem 12%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels *Western Blot* analysiert (s. 3.2.8.).

3.2.10. RNA-Isolierung

Die Extraktion von RNA aus primären murinen Pankreaskarzinomzellen diente der Analyse der Genexpression und zur Überprüfung der RNA-Interferenz. Hierfür wurden die Zellen zum entsprechenden Analysezeitpunkt einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 100 μ l RLT-Puffer (inkl. 1% β -Mercaptoethanol) pro 6-well bzw. 600 μ l RLT-Puffer pro 10 cm-Kulturschale mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml *Safe lock*-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung von RNA aus PDCs erfolgte analog der Präparation von Ganzzellextrakten (s. 3.1.11.), wobei das Zellpellet in 600 μ l RLT-Puffer inkl. 1% β -Mercaptoethanol aufgenommen wurde. Für die Extraktion von RNA aus Pankreas- und Tumorgewebe wurde während der Sektion der Mäuse (s. 3.3.4.) ein 1 bis 2 mm großes Gewebestück in 1 ml RLT-Puffer inkl. β -Mercaptoethanol überführt, mit einem Homogenisator zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur Aufreinigung der RNA bei -80°C gelagert. Für die Isolierung der RNA wurden die Proben zunächst mittels *QIAshredder*-Säulchen homogenisiert und unter Verwendung des *RNeasy Mini-Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers weiter aufgereinigt. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der mit 40 μ l RNase freiem Wasser eluierten RNA-Proben wurden anschließend photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 ermittelt. Die Qualität von RNA-Proben, die für Microarray-Analysen dienten, wurde zusätzlich mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (s. 3.2.5.).

3.2.11. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit den *TaqMan® Reverse Transcription Reagents* der Firma Applied Biosystems nach dem Schema in Tabelle 3-7 in einer PCR-Maschine.

Tabelle 3-7: Reaktionsansatz und Programm der Reversen Transkription

Komponente	Volumen	Programm
10x <i>Taq Man RT Buffer</i>	5 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	11 µl	25°C 10 min
dNTP-Mix	10 µl	48°C 1 h
<i>Random hexamers</i> (50 µM)	2,5 µl	95°C 5 min
<i>RNase Inhibitor</i>	1 µl	
<i>Multiscribe RT</i> (50 U/µl)	1,25 µl	
RNA	1 µg	
ddH ₂ O	ad 19,25 µl	

Die aus 1 µg RNA in einem Reaktionsansatz von 50 µl generierte cDNA wurde 1:5 in TE-Puffer verdünnt und für Expressionsstudien mittels quantitativer Echtzeit-PCR verwendet.

3.2.12. Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) zur Ermittlung der Expressionsraten bestimmter Gene wurde mit dem Echtzeit-PCR-System StepOnePlus (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Detektion und Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte wurde der *SYBR® Green PCR Master Mix* verwendet. Der in diesem Mix enthaltene Farbstoff bindet spezifisch an doppelsträngige DNA, resultierend in einem Fluoreszenzsignal, das die Menge an entstandenem PCR-Produkt reflektiert. Die für die qPCR benötigten Oligonukleotide (Primer) (Tab. 2-9) wurden anhand der Gensequenzen (ensembl.org) mit dem Programm Primer3 generiert. Die hierbei gewählten Parameter waren eine Schmelztemperatur von 58 bis 60°C, eine PCR-Produktgröße von 70 bis 150 bp und eine Bindungsposition der Oligonukleotide in zwei Exons, die ein mind. 1000 bp großes Intron umspannen, um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Die Durchführung der qPCR erfolgte mit Triplikaten jeder Probe nach dem Reaktionsschema in Tab. 3-8, wobei *Cyclophilin* stets als internes Kontrollgen diente.

Tabelle 3-8: Reaktionsansatz und Programm der quantitativen Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen [µl]	Programm
2x SYBR® Green PCR Master Mix	12,5	95°C 10 min
		95°C 15 sec
fwd Primer (10 µM)	0,75	60°C 1 min 40 Zyklen
rev Primer (10 µM)	0,75	
ddH ₂ O	6	95°C 15 sec
cDNA (4 ng/µl)	5	60°C 1 min
		60°C +0,3°C/min SKA
		95°C 15 sec

SKA = Schmelzkurvenanalyse

Die Auswertung der Ergebnisse der qPCR erfolgte mit Hilfe der StepOne Software v2.2.2. (Applied Biosystems). Für die Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) wurde zunächst mit Hilfe einer cDNA-Verdünnungsreihe die Effizienz (E) der PCR für die spezifischen Oligonukleotide nach folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}}$$

Bei geeigneter Effizienz zwischen 1,8 und 2,2 wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode für die Berechnung der relativen mRNA-Expression wie folgt angewandt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (internes Kontrollgen)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (behandelte Probe)} - \Delta\text{Ct (Referenzprobe)}$$

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{n-fache Expression}$$

Bei unzureichender PCR-Effizienz bzw. für eine genauere Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte die Auswertung der qPCR anhand einer in den Lauf integrierten Standardreihe mit Proben definierter Kopienzahl der zu analysierenden Gene. Hierfür wurden die für die qPCR generierten Oligonukleotide in einer Standard-PCR (siehe Tab. 3-2) mit 50 ng cDNA eingesetzt und das zuvor auf einem Agarosegel geprüfte PCR-Produkt mit Hilfe des TOPO® TA Cloning Kits (Invitrogen) in den pCRII®-TOPO Vector inkloniert. Für den Klonierungsansatz wurden 2 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl *Salt Solution* und 0,5 µl Vector gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Reaktionsansatz für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien verwendet (s. 3.2.1.). Nach Identifizierung positiver Klone mittels Kontroll-PCR (Tab. 3-2) wurden die Plasmide aufgereinigt (s. 3.2.2.) und anhand ihrer Konzentration und der Anzahl der Basenpaare die Anzahl der Moleküle pro µl nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \text{Plasmidkonzentration} \left[\frac{\text{g}}{\mu\text{l}} \right] \cdot \frac{6,022 \cdot 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}}{\text{bp Plasmid} \cdot 660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}$$

Ausgehend von einer auf 10^9 Moleküle pro µl eingestellten Plasmidlösung wurden durch weiteres Verdünnen mit TE-Puffer geeignete Verdünnungsstufen hergestellt. Die in der

qPCR anhand der Standardreihe ermittelten Kopienzahlen der zu analysierenden Proben wurden durch die Kopienzahlen ihrer jeweiligen internen Kontrollproben (*Cyclophilin*) geteilt (Normierung). Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden die normierten Werte der zu vergleichenden Proben ins Verhältnis gesetzt.

3.2.13. Transkriptomanalysen mittels Microarray

Zur Studie veränderter Gensignaturen und Signalwege in primären murinen PDCs nach Induktion von onkogenem *Kras*^{G12D} wurden Expressionsanalysen des gesamten Genoms in diesen Zellen durchgeführt. Die für die Microarray-Analyse verwendeten PDCs wurden aus zwei *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert (s. 3.1.1.). Nach zweifachem Passagieren wurden die Zellen für 3 Tage mit 4-OHT induziert (s. 3.1.3.) bzw. die entsprechenden Kontrollen mit EtOH behandelt. Die extrahierte RNA wurde auf Qualität geprüft (s. 3.2.10.) und je 100 ng RNA wurden zunächst unter Verwendung des Affymetrix GeneChip® Poly-A RNA Control Kits und des Ambion® WT Expression Kits nach Angaben des Herstellers in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Ausgehend von doppelsträngiger cDNA erfolgte die Synthese von cRNA mittels *in vitro* Transkription, die nach Aufreinigung mit *Nucleic acid binding beads* (Ambion® WT Expression Kit) mittels reverser Transkription erneut in cDNA umgeschrieben wurde. Die bei diesem Schritt neben dTTP eingebauten dUTP-Bausteine dienten der Erkennung für die Fragmentierung und Markierung der einzelsträngigen cDNA mit dem Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit. Die Hybridisierung der fragmentierten und markierten Proben auf Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Arrays wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München von der Gruppe der *Expression Core Facility* (Prof. Dr. Thorsten Buch) unter Verwendung des Affymetrix GeneChip® Hybridization, Wash and Staining Kits durchgeführt.

Das RNA-Expressionsmuster primärer muriner Pankreaskarzinomzellen nach siRNA vermittelter Herunterregulierung der mRNA-Expression des *Fra1*-Gens wurde ebenfalls in Microarray-Analysen untersucht. Hierfür wurden zwei aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isolierte Pankreaskarzinomzelllinien für 48h mit zwei *Fra1* spezifischen siRNAs sowie parallel mit einer Kontroll-siRNA transfiziert (s. 3.1.5.). Die Prozessierung der isolierten RNA erfolgte analog zu den primären PDCs mit dem Ambion® WT Expression Kit und dem Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling Kit nach Angaben des Herstellers, wobei 250 ng RNA in den ersten cDNA-Syntheseschritt eingesetzt wurden. Die Hybridisierung der fragmentierten und markierten cDNA-Proben auf Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Arrays sowie die Bereitstellung der ausgelesenen Expressionsrohdaten erfolgte durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In analoger Weise erfolgten Transkriptomstudien primärer muriner Pankreastumorzellen aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen mit *p27*^{Kip1}-Wildtypstatus vs. homozygoter Deletion von *p27*^{Kip1}.

3.3. *In vivo* Analysen

3.3.1. Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar (München) in spezifisch pathogenfreien Bereichen (SPF). Experimentelle Tierversuche wurden nach den Richtlinien der *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) und Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.3.2. Mauslinien und Zuchtstrategien

Zur funktionalen Analyse ausgewählter Gene in der Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas werden diese Gene in etablierten murinen PDAC-Modellen spezifisch modifiziert. Für eine gewebsspezifische Deletion von Genen bzw. die Überexpression von Genen, die z.T. spezifisch mutiert wurden, wurde das Cre/loxP-Rekombinationssystem angewandt. Hierbei wurden Mausstämme, die eine Cre-Rekombinase unter einem gewebsspezifischen Promotor exprimieren, mit Mäusen, die das zu analysierende Transgen enthielten, verpaart. Die Modifikation des Transgens zeichnete sich hierbei zum Einen durch loxP flankierte Exons aus (*Fra1^{lox}*-Mauslinie), die durch Expression der Cre-Rekombinase deletiert wurden und zum anderen durch ein loxP flankiertes transkriptionelles Stop-Element, das nach Deletion zur Expression des nachgeschalteten mutierten Gens führte (*LSL-Kras^{G12D}*-Mauslinie). Aufgrund der Verpaarungen verschiedener Mausstämme, wiesen alle Mäuse einen gemischten genetischen Hintergrund (129Sv / C57/BL/6) auf.

***Pdx1-Cre* (Hingorani et al., 2003)**

Diese transgene Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. D. Melton (Harvard Stem Cell Institute, Cambridge, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. In diesen transgenen Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (*Pdx1*) Promotors exprimiert, der in die endodermale Differenzierung während der embryonalen Entwicklung des Pankreas und des Duodenums involviert ist. Daraus resultiert eine mosaikartige Aktivität der Cre-Rekombinase im Pankreasepithel, im Antrum des Magens, im extrahepatischen Gallengang und im Duodenum. *Pdx1* wird außerdem in β -Zellen des adulten Pankreas exprimiert.

***Ptf1a/p48^{Cre/+}* (Nakhai et al., 2007)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. H. Nakhai (Klinikum rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt. *Ptf1a/p48^{Cre/+}*-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem *pancreas specific transcription factor 1a* (*Ptf1a*)-Promotor, der spezifisch in Progenitorzellen während der Entwicklung des Pankreas sowie auch im exokrinen und endokrinen Pankreas aktiv ist. Die Cre-Rekombinase wird in diesen Mäusen außerdem in Neuronen der Retina, im Cerebellum und dem dorsalen Neuralrohr exprimiert.

***Rosa26-Cre^{ERT2}* (Ventura *et al.*, 2007)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. T. Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. *Rosa26-Cre^{ERT2}*-Mäuse exprimieren vom ubiquitären *Rosa26*-Genlokus aus ein Fusionsprotein, bestehend aus der Cre-Rekombinase und der mutierten humanen Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors, mit einer Sensitivität für Tamoxifen. Die Zugabe von Tamoxifen führt zur Bindung an die ER^{T2}-Domäne resultierend in einer Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus und somit zur Induktion der Cre-Rekombinase. Zur funktionalen Genanalyse in primären PDCs wurde diese Mauslinie mit *LSL-Kras^{G12D/+}*, *LSL-Trp53^{R172H}*- sowie *Cdkn2a^{lox}*-Mäusen verpaart und die aus den Nachkommen isolierten PDCs mit 4-OHT induziert (s. 3.1.3.).

***LSL-Kras^{G12D/+}* (Hingorani *et al.*, 2003)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. T. Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse tragen im *Kras*-Gen eine Punktmutation im Kodon 12 des zweiten Exons, die zu einer Substitution von Glycin durch Aspartat führt. Diese auch im humanen PDAC häufig auftretende Mutation resultiert in einer Beeinträchtigung der GTPase-Aktivität und somit zu einer konstitutiven Aktivierung des Ras-Signalwegs. Die Expression des mutierten *Kras^{G12D}*-Allels erfolgt nach Deletion der Stopkassette in Mäusen, die zusätzlich eine Cre-Rekombinase exprimieren bzw. nach Induktion der *R26-Cre^{ERT2}* durch 4-OHT in murinen duktalem Zellen.

***LSL-Trp53^{R172H}* (Hingorani *et al.*, 2005)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. T. Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. *LSL-Trp53^{R172H}*-Mäuse exprimieren nach Deletion der Stopkassette ein onkogenes p53-Protein, das eine *missense*-Mutation im Kodon 172 trägt, bei der eine Substitution von Arginin durch Histidin stattfindet. Diese Mutation entspricht der humanen *TP53^{R175H}*-Mutation und wird häufig in Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom sowie in spontan auftretenden humanen Tumoren festgestellt (Liu *et al.*, 2000; Olive *et al.*, 2004).

***Cdkn2a^{lox}* (Aguirre *et al.*, 2003)**

Diese *Knock-out*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. N. Bardeesy (Harvard Medical School, Boston, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. Der murine *Cdkn2a*-Genlokus kodiert für die Tumorsuppressoren p16^{Ink4a} und p19^{Arf} durch alternative Transkriptvarianten, die sich anhand des ersten Exons unterscheiden (Krimpenfort *et al.*, 2001). In *Cdkn2a^{lox}*-Mäusen sind die Exons 2 und 3 durch *loxP*-Elemente flankiert, so dass eine gleichzeitige Deletion beider Tumorsuppressoren mit Hilfe des Cre/*loxP*-Systems erfolgt.

***fra1^{lox}* (Eferl et al., 2004)**

Diese *Knock-out*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. E. Wagner (CNIO, Madrid (ES)) zur Verfügung gestellt. In *fra1^{lox}*-Mäusen sind die Exons 3 und 4, die für die Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomänen des Fra1-Proteins kodieren, durch *loxP*-Elemente flankiert, an die sich 3' des zweiten *loxP*-Elements ein *GFP*-Reporter gen anschließen. Nach Deletion der Exons 3 und 4 wird das *GFP*-Reporter gen an den verbleibenden N-terminalen Genabschnitt von *Fra1* (Exon 1 und 2) gesplittet, was zur Expression eines grün fluoreszierenden Fusionsproteins führt.

***p27^{ko}* (Fero et al., 1996)**

Diese *Knock-out*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. J. Roberts (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA (USA)) zur Verfügung gestellt. Bei *p27^{ko}*-Mäusen handelt es sich um einen generellen *knock out*, bei dem die für das *p27^{Kip1}*-Gen kodierenden Exons 1 und 2 mittels homologer Rekombination durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt wurden. Zu den wichtigsten phänotypischen Merkmalen von *p27^{ko}*-Mäusen zählen eine erhöhte Körpergröße, multiple Organhyperplasien, spontane Entwicklung von Hypophysentumoren und die Sterilität homozygoter *p27^{ko}*-Weibchen.

***LSL-PIK3CA^{H1047R}* (Eser et al., 2013)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde in der Gruppe von Prof. Dr. D. Saur (Klinikum rechts der Isar, München (D)) generiert. *LSL-PIK3CA^{H1047R}*-Mäuse exprimieren vom *Rosa26*-Lokus aus nach Deletion der Stopkassette eine onkogene Form der p110 α -Untereinheit, die eine Mutation im Kodon 1047 trägt, bei der eine Substitution von Histidin durch Arginin stattfindet. Die Expression von p110 α ^{H1047R} resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs.

***Rosa26^{mT/mG}* (Muzumdar et al., 2007)**

Diese *Knock-in*-Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. T. Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (USA)) zur Verfügung gestellt. Die *Rosa26^{mT/mG}*-Reportermauslinie ermöglicht die Überprüfung der Funktionalität von Cre-Rekombinasen und deren Rekombinationseffizienz. Hierbei wird zunächst das rot fluoreszierende Protein tdTomato vom ubiquitären *Rosa26*-Lokus aus exprimiert, dessen kodierende Sequenz von *loxP*-Elementen flankiert ist. Die Aktivität der Cre-Rekombinase führt in dieser Mauslinie zur Deletion des *tdTomato*-Gens, was in der Expression des 3' gelegenen grün fluoreszierenden *EGFP*-Gens resultiert.

3.3.3. Genotypisierung der Mäuse

Die Mäuse wurden im Alter von ca. 3 Wochen durch Entnahme einer ca. 1 bis 2 mm großen Schwanzbiopsie mit einem sterilen Skalpell nach entsprechender Anästhesie mit Isofluran genotypisiert. Hierbei erfolgte gleichzeitig eine Markierung der Mäuse durch Ohrlochung nach einem bestimmten Lochmuster. Dabei auftretende Blutungen wurden mittels Ätztift

gestoppt. Nach Isolierung der genomischen DNA aus den Biopsien (s. 3.2.3.) wurden die entsprechenden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt (s. 3.2.4.).

3.3.4. Sektion der Mäuse

Zur späteren Analyse der Zellproliferation im Gewebe der Mäuse erfolgte 2h vor der Sektion die intraperitoneale Injektion von BrdU (50 mg/kg Körpergewicht). Für die Sektion wurden die Versuchstiere zunächst mit Isofluran euthanasiert und anschließend durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Nach Sterilisation des äußeren Bauchfells mit 70% Ethanol wurden nach dem Öffnen des Peritoneums zunächst Gewebeproben des Pankreas bzw. des Tumors für die Extraktion von RNA und zur Isolierung von Tumorzellen entnommen (s. 3.1.4. und 3.2.10.). Bei Detektion eines primären Pankreastumors wurden dessen Parameter bestimmt und das Vorhandensein makroskopischer Metastasen überprüft. Anschließend wurden alle Organe entnommen, in PBS gewaschen und zur Fixierung für ca. 24h gekühlt in 4% PFA aufbewahrt. Die Entwässerung der in Einbettkassetten fixierten Organe erfolgte im Gewebeeinfiltrationsautomat ASP300.

3.3.5. Orthotope Implantation von Pankreazellen

Zur Studie der Relevanz primärer PDCs für die Tumorentwicklung des Pankreaskarzinoms wurden orthotope Implantationsversuche in das Pankreas von *NOD-scid-Il2Rg^{null}* (NSG)-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine (USA)) durchgeführt. Hierfür wurden primäre PDCs aus Mäusen mit den Genotypen *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}* sowie *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Cdkn2a^{lox/lox}* und *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Trp53^{R172H/R172H}* isoliert (s. 3.1.1.) und durch 6-tägige Behandlung der Zellen mit 4-OHT die Cre-Rekombinase induziert (s. 3.1.3.).

Der Eingriff der orthotopen Implantation wurde unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Die Tiere wurden zunächst mit Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) (MMF) narkotisiert und die Augen vor dem Austrocknen mit Augengel geschützt. Nach Desinfektion der Haut und einem links-lateralen abdominalen Schnitt wurde das Peritoneum geöffnet und durch Mobilisierung der Milz das mit diesem Organ verbundene Pankreas freigelegt. Die orthotope Implantation erfolgte mit Hilfe einer Hamilton Spritze mit einer 27G-Kanüle, wobei jeweils $1,5 \times 10^5$ duktale Pankreazellen in einem Volumen von 50 μ l Serum freiem D-MEM/F12 injiziert wurden. Nach vorsichtiger Reponierung der Organe wurde das Peritoneum mit Einzelnähten (Nahtmaterial Ethilon 5-0) und der Hautschnitt mit Wundklammern verschlossen. Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren Metacam (1 mg/kg) intraperitoneal injiziert.

3.3.6. Histologische Studien

3.3.6.1. Anfertigung von Paraffinschnitten

Die im Gewebeeinfiltrationsautomat entwässerten Organe (s. 3.3.4.) wurden mit dem Einbettssystem EG 1150H in Paraffinblöcke gegossen. Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die Blöcke für mind. 30 min bei -20°C vorgekühlt. Anschließend wurden am

Mikrotom HM355S serielle Schnitte von je 3 µm Dicke angefertigt und zur Glättung in ein Wasserbad (40-50°C) überführt. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen und über Nacht bei RT getrocknet.

3.3.6.2. Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung

Die H&E-Färbung diente zur Analyse von Gewebestrukturen und morphologischen Veränderungen. Im ersten Schritt wurden die Paraffinschnitte durch 2 x 5 min Inkubation in Roti-Histol entparaffinisiert und anschließend unter Verwendung einer Ethanolreihe mit absteigender Prozentualität (2 x 99% → 2 x 96% → 2 x 80%) rehydriert. Nach einer kurzen Inkubation in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für ca. 5 sec in Hämatoxylin getaucht und anschließend für 5 bis 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte für 20 sec in wässrigem Eosin (2%). Danach wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser inkubiert und mittels prozentual aufsteigender Ethanolreihe (2 x 80% → 2 x 96% → 2 x 99%) dehydriert. Durch die abschließende Inkubation in Roti-Histol (2 x 5 min) wurden die Gewebeschnitte geklärt und anschließend mit Pertex Eindeckmedium unter einem Deckgläschen fixiert. Die Dokumentation der Färbungen erfolgte mit dem Mikroskop Axio Imager.A1 und der AxioCam HRc (Carl Zeiss AG).

3.3.6.3. Alzianblau-Färbung

Die Alzianblau-Färbung wurde zur Detektion sulfatierter und carboxylierter Mucine angewandt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst analog zur H&E-Färbung (s. 3.3.6.2.) entparaffinisiert und rehydriert. Die Regulierung des pH-Werts erfolgte durch 10 min Inkubation in 3% Essigsäure und anschließend wurden die Schnitte für 30 min in 1% Alzianblau/3% Essigsäure-Lösung gefärbt. Nach kurzer Inkubation in 3% Essigsäure wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und für 7 min in einer Kernechtrot/Aluminiumsulfat-Lösung gegengefärbt. Die Dehydrierungs-, Klärungs- und Fixierungsschritte wurden analog zur H&E-Färbung durchgeführt.

3.3.6.4. Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie diente zur Analyse bestimmter Proteine und Strukturen im Gewebe. Die Paraffinschnitte wurden analog zur H&E-Färbung (s. 3.3.6.2.) entparaffinisiert und rehydriert und anschließend zur Demaskierung der Epitope in *Antigen Unmasking Solution* in der Mikrowelle (2 min / 800 Watt → 9 min / 360 Watt) erhitzt. Nach 20 min Abkühlen bei RT wurde die *Unmasking Solution* entfernt und die Gewebeschnitte dreimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 10 min lichtgeschützt bei RT in 3% H₂O₂ inkubiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen für 1h bei RT in PBS mit 5% Serum und Avidin inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers (Tab. 3-9) in PBS mit 5% Serum und Streptavidin über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tabelle 3-9: Verdünnungen der primären Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung
α -Sma, ab5694	1:100
BrdU, MCA2060	1:250
Cyclin D1 (SP4), RM9104-S	1:250
Cytokeratin 19, TROMA 3	1:300
Fra1 (C-12), sc-28310 (\rightarrow human)	1:50
Fra1 (N-17), sc-183 (\rightarrow murin)	1:100
Ki67 (SP6)	1:100
p27 (C-19), sc-528	1:100

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und für 1h bei RT mit dem entsprechenden sekundären, biotinylierten Antikörper (Tab. 2-13) inkubiert, der 1:500 in PBS mit 5% Serum verdünnt wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde die in PBS angesetzte *Vectastain® elite ABC-solution* (Komplex aus Avidin und biotinyliertem Enzym) für 30 min auf die Gewebe gegeben und anschließend entfernt (3 x PBS). Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch Zugabe des Peroxidasesubstrats 3, 3' -Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) und die Reaktion wurde nach ca. 2 bis 5 min bzw. nach sichtbarer Braunfärbung mit destilliertem Wasser abgestoppt. Die Gewebeschnitte wurden für ca. 5 sec mit Hämatoxylin gegengefärbt und wie unter 3.3.6.2. beschrieben, zur Fixierung aufbereitet.

3.3.6.4.1. Humaner Gewebe-Array

Die immunhistochemische Analyse der Fra1-Expression in humanen Pankreaskarzinomen erfolgte anhand des Gewebe-Arrays PAC481. Dieser Array enthielt Paraffinschnitte von normalem Pankreasgewebe sowie Gewebeschnitte aus PDACs von 20 Patienten, die auf einen Objektträger fixiert waren. Zur Vorbereitung wurde der Gewebe-Array zunächst für 30 min bei 60°C gebacken und anschließend die immunhistochemische Färbung, wie unter 3.3.6.4. beschrieben, durchgeführt. Anhand der erhaltenen Intensität der Fra1-Färbung erfolgte die Einteilung der humanen PDACs in die Intensitätsstufen 1 (schwache Expression), 2 (mäßige Expression) und 3 (starke Expression).

3.3.6.5. Anfertigung von Gefrierschnitten

Für Gewebeanalysen am Fluoreszenzmikroskop wurden Gefrierschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Pankreasgewebeprobe für 2h in 4% PFA bei 4°C fixiert und danach in PBS gewaschen. Die Dehydrierung der Gewebe erfolgte anschließend durch Inkubation in Sucroselösung mit steigender Konzentration (15%ige Lösung für 4h und 30%ige Lösung über Nacht bei 4°C). Die entwässerten Gewebeprobe wurden in *Tissue Tek* eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden am Mikrotom-Kryostat HM560 mit einer Dicke von 10 μ m angefertigt, auf Objektträger überführt und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

3.3.6.6. TO-PRO-3-/Phalloidin-Färbung

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der GFP-Expression im Pankreasgewebe von Fra1^Δ-Mäusen erfolgte eine nukleäre Gegenfärbung mit TO-PRO-3 sowie eine Färbung des Aktinfilaments mit Phalloidin. Hierfür wurden die Gefrierschnitte über Nacht bei RT getrocknet und zunächst für 1 min in 4% PFA fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS (je 5 min) wurden die Gewebe für 1h in *Blocking*-Lösung (PBS mit 3% BSA / 1% Triton-X-100 / 1% Saponin) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Gewebe mit Färbelösung (*Blocking*-Lösung mit TO-PRO-3 (1:1000) und Phalloidin (1:250)) für 2h bei RT. Nach drei Waschschritten mit *Blocking*-Lösung (je 20 min) und einem Waschschriff mit PBS (10 min) wurden die Gewebe mit Vectashield® *Mounting Medium* überschichtet und unter einem Deckgläschen mit Hilfe von schwarzem Nagellack versiegelt.

3.4. Statistische Auswertung

3.4.1. Generelle statistische Auswertung

Die Erstellung von Diagrammen und Abbildungen sowie die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, La Jolla, CA (USA)). Sofern nicht speziell kenntlich gemacht, wurden die Daten stets aus drei unabhängigen Versuchen generiert und als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurde bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität der *unpaired two-tailed Student's t-test* angewandt (parametrischer Test). Alternativ wurde der *Mann-Whitney U-test* angewandt (nicht-parametrischer Test). Die erhaltenen p-Werte ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)) wurden in den Abbildungen angegeben. Bei Durchführung mehrerer statistischer Analysen innerhalb eines Datensatzes wurde eine ANOVA (*Analysis of variance*) mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Analysen der Überlebensraten der Mäuse erfolgten nach Kaplan-Meier. Für die statistische Auswertung von Überlebenskurven wurde der *Log-rank*-Test verwendet.

3.4.2. Analyse der Microarray-Daten

Die Normalisierung der Microarray-Rohdaten zur Analyse der primären PDCs erfolgte am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München von der Gruppe der *Expression Core Facility* (Prof. Dr. Thorsten Buch) mit der Expression Console™ 1.1.2637.26569 (Affymetrix) unter Anwendung einer RMA (*robust multi-array analysis*). Die statistische Auswertung zur Identifizierung von Genexpressionsraten, die sich signifikant zwischen den definierten Gruppen unterscheiden, erfolgte mit SAM (*Significance Analysis for Microarrays*) und *limma* am oben genannten Institut. Die am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ausgelesenen Expressionsrohdaten zur Analyse der murinen Pankreaskarzinomzellen wurden durch Dr. Matthias Wirth (Klinikum rechts der Isar, München) mit dem Programm Expression Console 1.2.1.20 (Affymetrix) unter Verwendung des RMA Algorithmus normalisiert.

Für die Analyse von Gengruppen wurde außerdem eine *gene set enrichment analysis* (GSEA) durchgeführt, bei der die signifikante Anreicherung bestimmter Gengruppen untersucht wird (Subramanian *et al.*, 2005). Diese Analysen wurden unter Verwendung der vom Broad Institute (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA (USA)) bereitgestellten GSEA-Software durchgeführt. Die hierfür gewählten Parameter lauteten: *permutation type*: gene set, *permutation number*: 1000, *metric for ranking genes*: Signal2Noise, *enrichment statistics*: weighted und *genes et size restrictions*: 15 min / 500 max. Die Analyse der *Gene Sets* erfolgte unter Verwendung von c2.cpg.v3.0.symbols.gmt und c3.tft.v3.0.symbols.gmt (Subramanian *et al.*, 2005). Zur Überprüfung der Genanreicherung werden die *Gene Sets* mit einer Rangliste verglichen und der sogenannte *enrichment score* (ES) über eine Rangsummenstatistik berechnet. Hierfür werden die einzelnen Gene absteigend der Liste auf ihre Zugehörigkeit in den entsprechenden *Gene Sets* überprüft und bei einem positiven Ergebnis der Wert der Rankingstatistik hinzuaddiert bzw. subtrahiert, wenn das Gen nicht im *Gene Set* enthalten ist. Die maximale Abweichung von Null, die aus dieser Berechnung resultiert, ergibt den ES. Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener *Gene Sets* erfolgt eine Normalisierung des ES (NES) anhand eines Permutationsverfahrens der Datensätze. Die statistische Signifikanz des ES wurde anhand des nominalen p-Wertes bestimmt (NOM). Zur Kontrolle falsch-positiver Ergebnisse durch multiples Testen erfolgte außerdem die Berechnung der *false discovery rate* (FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995).

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung eines primären zellulären Modellsystems

4.1.1. Isolierung und Charakterisierung primärer duktaler Zellen des murinen Pankreas

Für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion von onkogenem *Kras* im Pankreas und deren Integration in andere genetische Programme wurde ein zellbasiertes *ex vivo* Modellsystem entwickelt, in dem die Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} durch 4-OHT induziert werden kann. Hierfür wurden primäre duktale Zellen (PDCs) (s. Schema Abb. 4-1A) aus dem Pankreas 6 bis 8 Wochen alter Mäuse isoliert, die sich anhand ihrer Koloniebildung nach ca. 7 Tagen detektieren ließen (Abb. 4-1B). Die zelluläre Identität der isolierten Zellen wurde anhand der Expressionsmuster von azinären, dukталen, Inselzell- und Progenitor-spezifischen Markergenen mit Hilfe von aus diesen Zellen erstellten Microarray-Datensätzen analysiert. Hierbei dominierte eindeutig die Expression von dukталen Markergenen, wie *Cytokeratin 7/19* und *Carboanhydrase 2*, während die Zellen weder azinäre noch Inselzell-Markergene exprimierten (Abb. 4-1C). Des Weiteren zeichnete sich eine Expression von bipotenten Progenitormarkergenen, wie *Pdx1*, *Hes1*, *Hnf1b* und *Sox9*, ab (Abb. 4-1C).

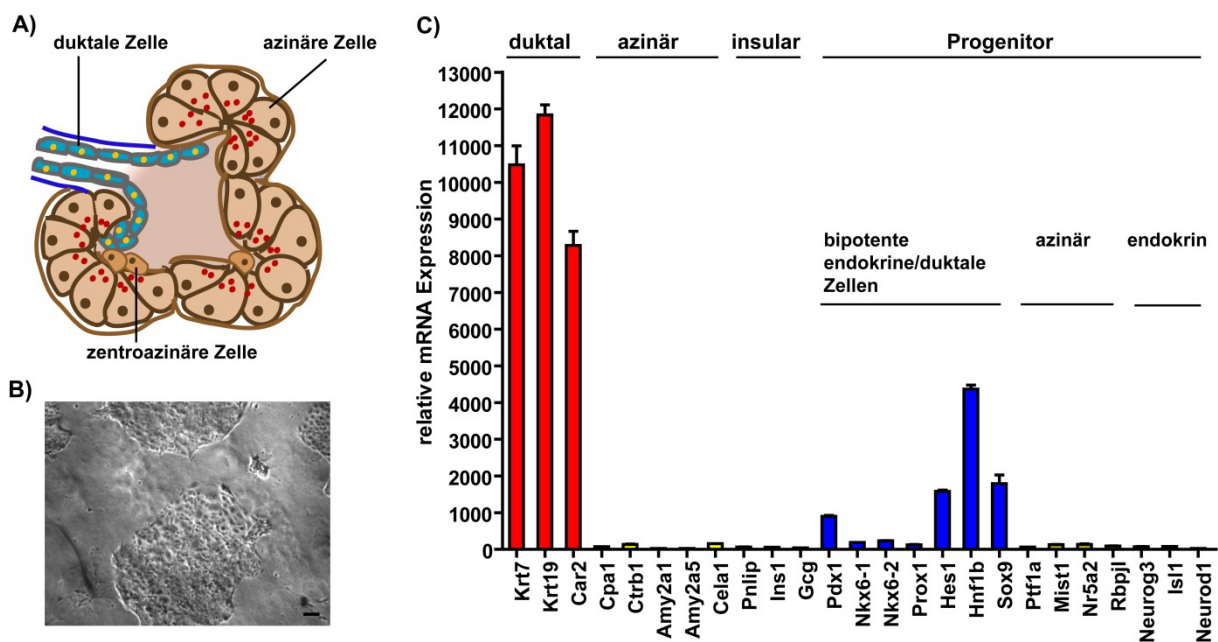


Abb. 4-1: Morphologie und Expressionsmuster primärer muriner duktaler Pankreaszellen (PDCs). **A)** Schematische Darstellung von Zelltypen des exokrinen Pankreas. **B)** Hellfeldmikroskopie einer Kolonie epithelial wachsender PDCs 7 Tage nach der Isolierung (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **C)** mRNA-Expressionsanalyse von dukталen-, azinären-, Inselzell- und Progenitor-spezifischen Markergenen. Die mRNA wurde aus nicht induzierten PDCs 6 bis 8 Wochen alter *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, (*LSL-Trp53*^{R172H/+})-Mäuse isoliert (n=4; PDC-D245, PDC-SD78, PDC-D264, PDC-SD81) und für Microarray-Analysen mit dem GeneChip mouse gene 1.0 ST aufbereitet.

Für eine induzierbare Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} vom endogenen Promotor aus wurden PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert (s. 3.3.2.). Die Expression

des mutierten *Kras*^{G12D}-Allels erfolgt in diesem Modell erst nach Deletion des geflochtenen Transkriptionsterminations-Elements durch Induktion der Cre-Rekombinase mit 4-OHT.

4.1.2. Rekombinationseffizienz in primären dukталen Pankreaszellen

Zur Überprüfung der Rekombinationseffizienz in PDCs diente die Reportermauslinie *R26*^{mT/mG} (Muzumdar *et al.*, 2007, s. 3.3.2.). PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2}/*R26*^{mT/mG}-Mäusen exprimieren zunächst das rot fluoreszierende Protein tdTomato, dessen kodierende Sequenz von *loxP*-Elementen flankiert ist, und zeigen keine Expression von eGFP (Abb. 4-2A und B). Die Behandlung der Zellen mit 200 nM 4-OHT führt zur Aktivierung der Cre-Rekombinase, was anhand einer effizienten Rekombination des Reportergeräts nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-2B). Über einen Behandlungszeitraum von 8 Tagen ließ sich anhand der zunehmenden Anzahl eGFP exprimierender PDCs eine Rekombinationseffizienz von über 90% detektieren (Abb. 4-2C).

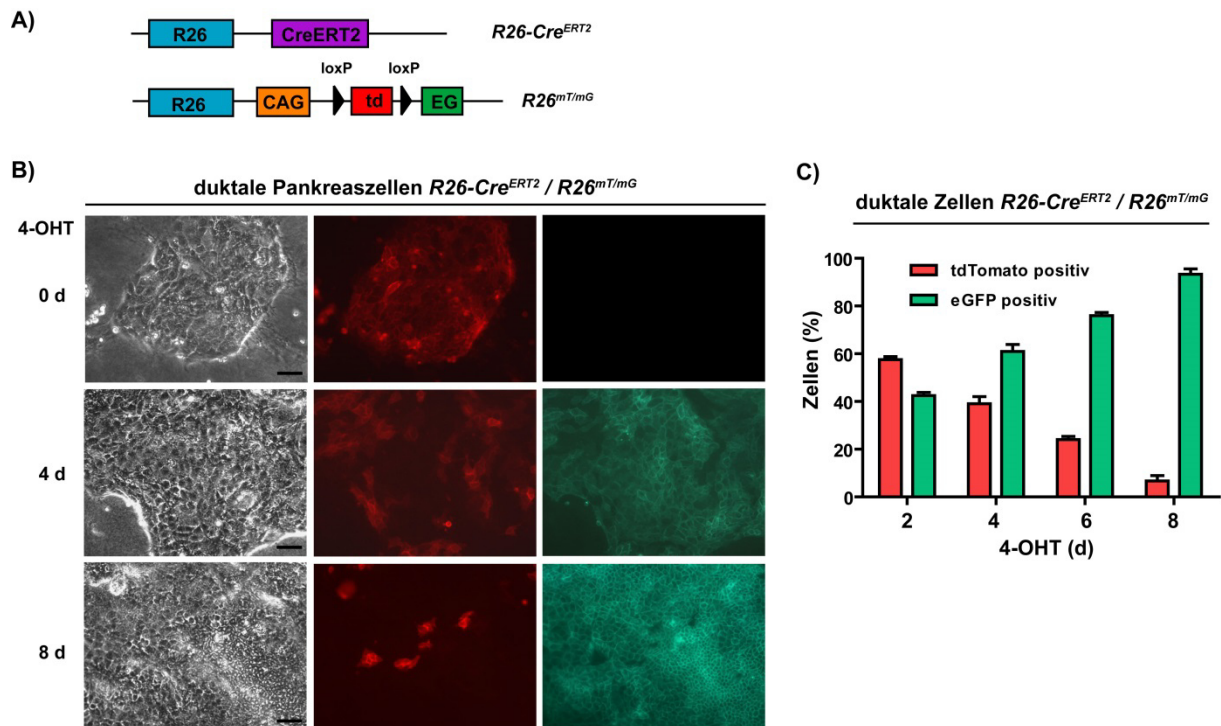


Abb. 4-2: Rekombinationseffizienz in murinen PDCs. **A)** Genetisches Modell der Reportermauslinie, die zur Bestimmung der Rekombinationseffizienz der Tamoxifen induzierbaren *R26-Cre*^{ERT2} in PDCs diente. **B)** Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie dukталer Zellen (PDC-SD51), die aus einer *R26-Cre*^{ERT2} / *R26*^{mT/mG}-Maus isoliert wurden. Die Zellen blieben dabei unbehandelt (0 d) oder wurden über einen Zeitraum von 8 Tagen mit 200 nM 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt und die Rekombinationseffizienz anhand der Expression der Reportergene *tdTomato* und *eGFP* überprüft (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **C)** Quantifizierung der Rekombinationseffizienz nach 2-, 4-, 6- und 8-tägiger Behandlung mit 4-OHT. Es wurden zu jedem Zeitpunkt 5 Gesichtsfelder (200-fache Vergrößerung) ausgezählt.

4.1.3. Die Expression von onkogenem *Kras*^{G12D} führt in primären dukталen Zellen zur Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs

Die Aktivierung von onkogenem *Kras* wurde in PDCs analysiert, die aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert wurden (Abb. 4-3A). Hierfür wurde zunächst die Deletion der Stopkassette des *LSL-Kras*^{G12D}-Allels nach 4-OHT-Behandlung der dukталen Zellen mittels spezifischer PCR (s. Tab. 3-3) überprüft. Vergleichbar zur Rekombinationseffizienz des *R26*^{mT/mG}-Lokus war auch bezüglich des *Kras*-Lokus eine kontinuierlich zunehmende Rekombination der geflochtenen Stopkassette nachweisbar, während in nicht induzierten Zellen keine Rekombination stattfand (Abb. 4-3B).

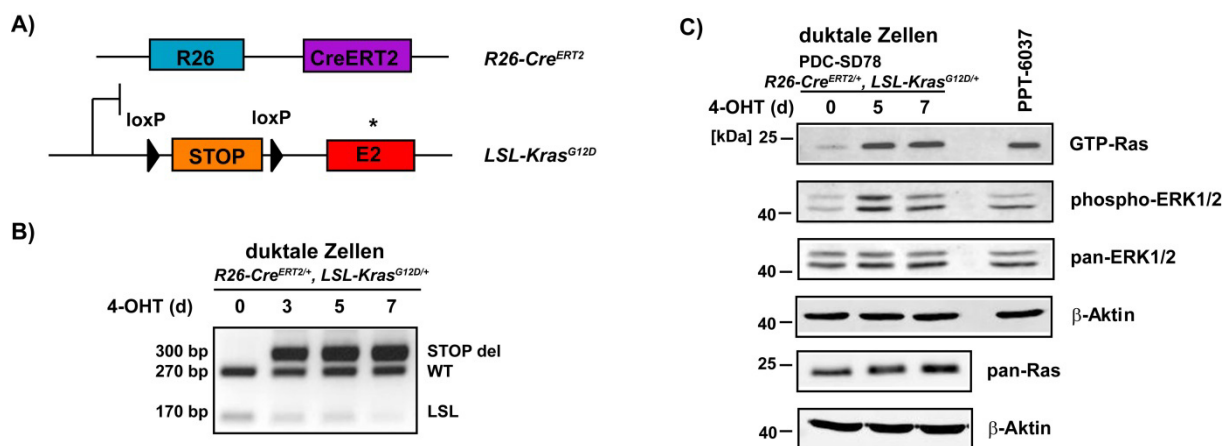


Abb. 4-3: Aktivierung von onkogenem *Kras*^{G12D} in PDCs. **A)** Genetisches Modell der Mauslinien, die zur Analyse der induzierbaren Expression von *Kras*^{G12D} in PDCs dienen. **B)** PCR-Analyse der Rekombination der Stopkassette (LSL) des *LSL-Kras*^{G12D}-Allels nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung der PDCs mit 200 nM 4-OHT. Die Überprüfung der intakten Stopkassette erfolgte in nicht induzierten Zellen (0 d). **C)** PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen wurden für 5 und 7 Tage mit 200 nM 4-OHT induziert oder unbehandelt belassen. Der Nachweis an aktiviertem GTP-gebundenem Ras erfolgte mittels Ras-pull down-Assay. Die Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs wurde anhand der Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 (Thr202/Tyr204) im Western Blot nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Proteinlysate einer murinen Pankreaskarzinomzelllinie aus dem *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Modell (PPT-6037).

Der Nachweis an aktiviertem GTP-gebundenem Ras in Proteinlysaten duktalere Zellen erfolgte mittels Ras-Aktivierungs-Assay durch einen pull down mit der an Agarose-Beads immobilisierten Ras-Bindungsdomäne der Raf-Kinase, einem Effektorprotein im kanonischen Ras-Signalweg. Hierbei ließ sich nach 5- und 7-tägiger Behandlung primärer PDCs mit 4-OHT eine Anreicherung an aktiviertem GTP-gebundenem Ras im Vergleich zu nicht induzierten Zellen feststellen (Abb. 4-3C). Weiterhin konnte in induzierten PDCs eine kanonische *Kras*-Signaltransduktion anhand der Phosphorylierung der nachgeschalteten Kinasen ERK 1 und 2 bestätigt werden, die vergleichbar zu einer Pankreaskarzinomzelllinie aus dem *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mausmodell war (Abb. 4-3C).

4.1.4. Synchrone Aktivierung von *Kras*^{G12D} und Inaktivierung von *Cdkn2a* führt zur malignen Transformation von primären dukталen Pankreaszellen

Zur Demonstration der Relevanz des primären Zellsystems für die Tumorentstehung wurden orthotope Transplantationsversuche in das Pankreas von *NOD-scid-II2Rg*^{null} (NSG)-Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst primäre PDCs mit aktiviertem *Kras*^{G12D} implantiert, welches die initiale Mutation in der Karzinogenese des Pankreas widerspiegelt.

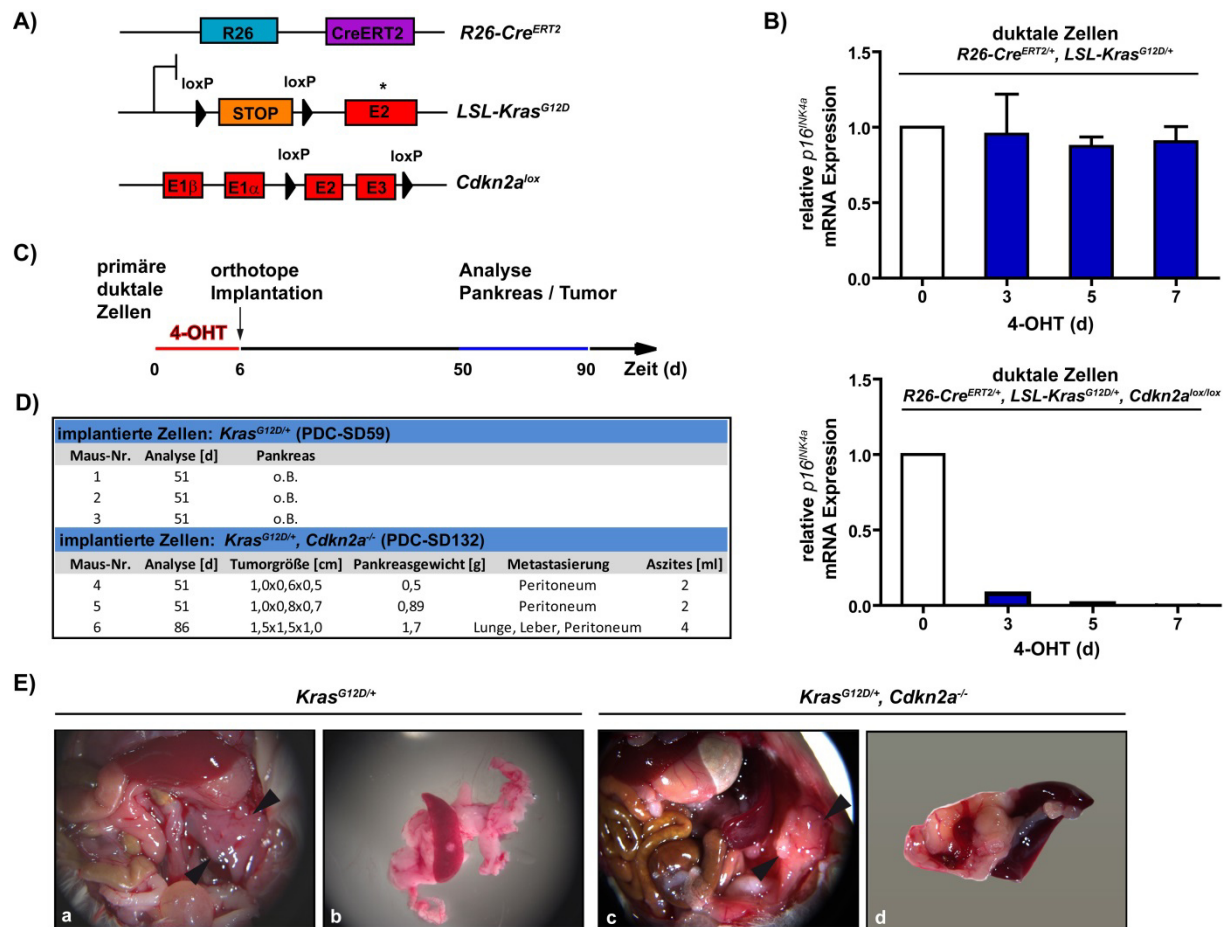


Abb. 4-4: Die Inaktivierung von *Cdkn2a* führt zur malignen Transformation *Kras*^{G12D} induzierter PDCs.

A) Modell der Allele, die eine synchrone Aktivierung von onkogenem *Kras*^{G12D} und Inaktivierung des *Cdkn2a*-Genlokus ermöglichen. **B)** Überprüfung der Deletion des *Cdkn2a*-Genlokus mittels qPCR ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) nach 4-OHT induzierter Aktivität der R26-Cre^{ERT2}. Relative *p16*^{INK4a}-mRNA-Expression von PDCs aus dem R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+} (n=3)- und dem R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox} (n=1)-Mausmodell nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 200 nM 4-OHT im Vergleich zu unbehandelten Zellen. **C)** Versuchsschema der orthotopen Implantation von PDCs aus R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+}- und R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen. Die PDCs wurden 6 Tage mit 200 nM 4-OHT behandelt und anschließend wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in das Pankreas von NSG-Mäusen implantiert (n=3 pro Zelllinie). Die Analyse der Entwicklung von Pankreastumoren erfolgte ca. 50 bis 90 Tage nach der Implantation. **D)** Überblick der Ergebnisse und Tumorparameter nach der orthotopen Implantation. NSG-Mäuse, denen induzierte PDCs aus R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+}-Mäusen implantiert wurden, waren ohne Befund (o.B.). Die Implantation von induzierten PDCs aus R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-*Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen führte zur Ausbildung metastasierender PDACs in NSG-Mäusen. **E)** Übersichtsaufnahme der Organe nach der Sektion der implantierten NSG-Mäuse. Das Pankreas (a) bzw. der Pankreastumor (c) sind durch Pfeile markiert. Detaillierte Aufnahmen des präparierten Pankreas (b) bzw. des Pankreastumors (d) mit Milz.

Die Analyse der Pankreata dieser transplantierten Mäuse zeigte jedoch weder die Entwicklung von prämaligen Vorläuferläsionen (PanINs), noch die Formation eines Pankreaskarzinoms (Abb. 4-4D; 4-5A).

Ein wichtiger Schritt für die Tumorprogression Kras induzierter Pankreaskarzinome ist die Inaktivierung des *Cdkn2a*-Genlokus (Aguirre *et al.*, 2003; Bardeesy *et al.*, 2006), der für die Tumorsuppressoren p16^{INK4a} und p19^{ARF} kodiert, die eine zentrale Funktion in der Onkogen-induzierten Seneszenz ausüben (Serrano *et al.*, 1997). Zur Überprüfung, ob die gleichzeitige Aktivierung von onkogenem *Kras*^{G12D} und Inaktivierung von *Cdkn2a* zur malignen Transformation führt, wurden PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen (Abb. 4-4A) isoliert und nach 6-tägiger Behandlung mit 4-OHT in das Pankreas von NSG-Mäusen implantiert. Die Deletion des *Cdkn2a*-Lokus wurde mittels qPCR nachgewiesen (Abb. 4-4B). In einem Zeitraum von 51 bis 86 Tagen nach der Zellimplantation konnte in allen Mäusen dieser Versuchsgruppe die Ausbildung von duktal differenzierten Pankreaskarzinomen detektiert werden (Abb. 4-4D-E; Abb. 4-5A).

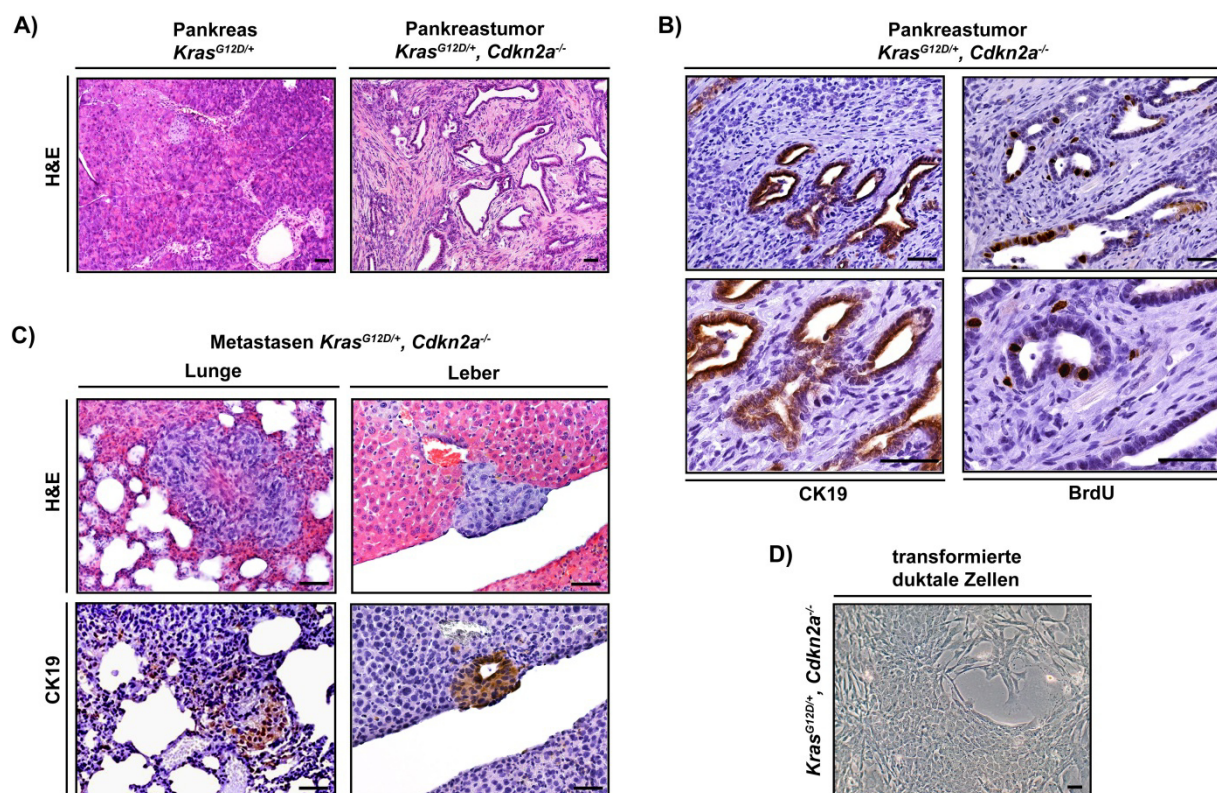


Abb. 4-5: Induzierte PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen bilden metastasierende PDACs in NSG-Mäusen aus. A) H&E-Färbung von Paraffinschnitten des Pankreas bzw. des PDAC von NSG-Mäusen nach orthotoper Implantation 4-OHT induzierter PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}- bzw. *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen. **B)** Der Nachweis der dukталen Differenzierung der Pankreaskarzinome aus *Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{-/-}-Zellen erfolgte mittels immunohistochemischer Färbung von CK19. Die proliferative Aktivität dieser Karzinome wurde anhand der Inkorporation von BrdU immunohistochemisch analysiert. **C)** H&E- und CK19-Färbung von Paraffinschnitten der Lunge und der Leber zur Indikation von Metastasen in NSG-Mäusen, denen induzierte PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{lox/lox}-Mäusen implantiert wurden. **D)** Mikroskopische Aufnahme isolierter Zellen aus *Kras*^{G12D/+}, *Cdkn2a*^{-/-}-Pankreaskarzinomen implantierter NSG-Mäuse (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Die duktale Differenzierung dieser Karzinome wurde anhand der immunhistochemischen Detektion der CK19-Expression bestätigt (Abb. 4-5B). In diesen Bereichen zeichnete sich auch anhand der BrdU-positiven Zellen eine proliferative Aktivität ab (Abb. 4-5B). Neben der Tumorformation konnte außerdem eine Metastasierung in das Peritoneum, die Lunge und die Leber festgestellt werden (Abb. 4-5C).

Die aus den entwickelten PDACs isolierten Zellen zeigten eine zu murinen Pankreas-tumorzellen ähnliche Morphologie (Abb. 4-5D) und ließen sich ohne Zugabe von weiteren Wachstumsfaktoren in 10% FCS-haltigem Medium (D-MEM) auf Plastik kultivieren.

4.1.5. Synchrone Aktivierung von *Kras*^{G12D} und Expression des mutierten Tumorsuppressors *Trp53*^{R172H} resultiert in der malignen Transformation primärer duktaler Pankreaszellen

Neben der Inaktivierung von *Cdkn2a* spielen Mutationen im Tumorsuppressor *Trp53* eine entscheidende Rolle in der *Kras*^{G12D} induzierten Karzinogenese des Pankreas. Dies konnte bereits anhand der Koexpression eines *Trp53*-Allels mit einer *missense*-Mutation im Kodon 172 (*Trp53*^{R172H}) im *Pdx1-Cre, LSL-Kras*^{G12D/+}-Modell gezeigt werden (Hingorani *et al.*, 2005).

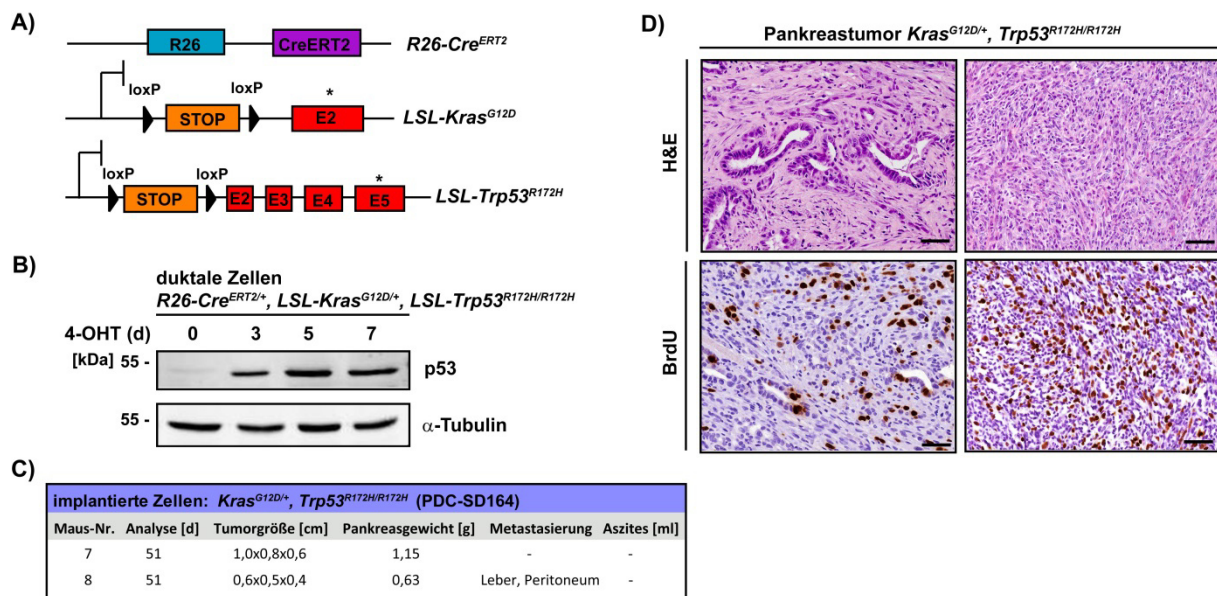


Abb. 4-6: Die Koexpression von mutiertem *Trp53*^{R172H} mit *Kras*^{G12D} führt zur malignen Transformation primärer PDCs. **A)** Modell der Allele, die eine synchrone Expression des Onkogens *Kras*^{G12D} und des mutierten Tumorsuppressors *Trp53*^{R172H} nach 4-OHT induzierter Aktivität der R26-Cre^{ERT2} ermöglichen. **B)** Überprüfung der Induktion der *Trp53*^{R172H}-Expression in PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *LSL-Trp53*^{R172H/R172H}-Mäusen nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 200 nM 4-OHT im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels *Western Blot*. **C)** Überblick der Ergebnisse und Tumorparameter nach der orthotopen Implantation der NSG-Mäuse mit PDCs aus *R26-Cre*^{ERT2/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *LSL-Trp53*^{R172H/R172H}-Mäusen, die für 6 Tage mit 200 nM 4-OHT induziert wurden (n=2). **D)** H&E-Färbung und immunhistochemischer Nachweis von BrdU in Paraffinschnitten von duktal differenzierten (links) und undifferenzierten (rechts) Bereichen des PDAC von NSG-Mäusen nach orthotoper Implantation 4-OHT induzierter PDCs des angegebenen Genotyps (Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Um festzustellen, ob die Aktivierung von *Kras*^{G12D} gemeinsam mit der Expression von mutiertem *Trp53*^{R172H} zur Transformation primärer PDCs führt, wurden diese aus *R26-*

Cre^{ERT2/+}, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *LSL-Trp53^{R172H/R172H}*-Mäusen (Abb. 4-6A) isoliert und analog zur Analyse der Relevanz des *Cdkn2a*-Genlokus nach 6-tägiger Behandlung mit 4-OHT in das Pankreas von NSG-Mäusen implantiert.

Die Induktion der *Trp53^{R172H}*-Expression wurde auf Proteinebene mittels *Western Blot* überprüft (Abb. 4-6B). Zum Zeitpunkt der Analyse nach 51 Tagen konnte auch in diesen Mäusen die Entwicklung duktal differenzierter Pankreaskarzinome detektiert werden, deren Größe und Gewicht vergleichbar mit Tumoren aus *Kras^{G12D}* aktivierten PDCs mit einer Deletion des *Cdkn2a*-Lokus war (Abb. 4-4D; Abb. 4-6C-D). Die Koexpression der beiden Onkogene *Kras^{G12D}* und *Trp53^{R172H}* verlieh diesen PDCs ebenfalls das Potential zur Metastasierung in die Leber und das Peritoneum (Abb. 4-6C). Anhand der erhöhten Fraktion BrdU-positiver Zellen konnte in diesen Tumoren zudem eine starke proliferative Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 4-6D).

4.1.6. Die Expression von onkogenem *Kras^{G12D}* führt in primären dukталen Pankreaszellen zu einer erhöhten Zellproliferation

Ausgehend von der gezeigten Relevanz des primären Zellsystems *in vivo* wurden im Folgenden *Kras*-abhängige Prozesse in PDCs untersucht. Die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade führt zellbiologisch zu einer gesteigerten Proliferation. Eine erhöhte Proliferationsrate nach Induktion von onkogenem *Kras^{G12D}* konnte auch in PDCs anhand von größeren Zellkolonien (Abb. 4-7A) und von Wachstumskurven bestimmt werden (Abb. 4-7B).

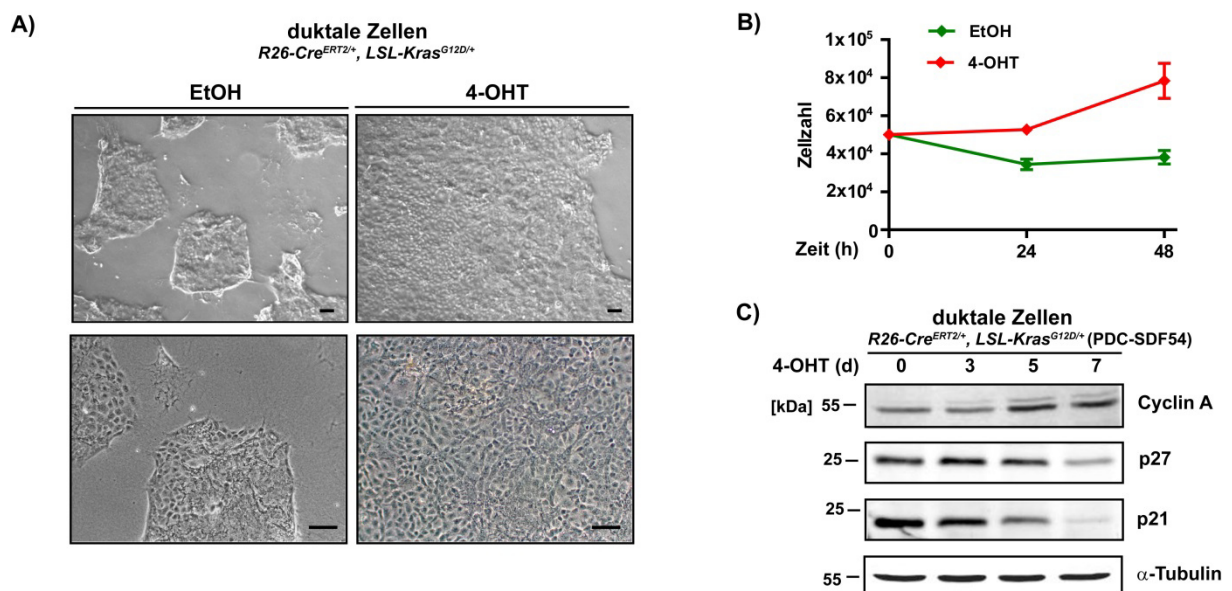


Abb. 4-7: Die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* führt in PDCs zu einer gesteigerten Proliferation. **A)** Hellfeldmikroskopie der Kolonien primärer PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen, die für 5 Tage mit 200 nM 4-OHT induziert oder unbehandelt (EtOH) belassen wurden (Alle Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m). **B)** Bestimmung der Proliferationsrate anhand der Zellzahl dukталer Zellen aus dem *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell, die 7 Tage mit 4-OHT bzw. EtOH (Kontrolle) behandelt wurden. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen in Triplikaten ausgesät und die Entwicklung der Zellzahl nach 24 und 48h analysiert (n=2). **C)** Analyse von Proliferationsmarkern in PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 4-OHT im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels *Western Blot*.

Des Weiteren ließ sich in $Kras^{G12D}$ exprimierenden PDCs eine erhöhte Expression von S-Phase assoziierten Proteinen, wie dem Cyclin A, sowie eine verminderte Expression der Zellzyklusinhibitoren $p21^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ nachweisen (Abb. 4-7C). Die CKIs $p21^{Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Sherr & Roberts, 1999). Eine Relevanz *in vivo* konnte bereits für $p21^{Cip1}$ demonstriert werden, dessen Haploinsuffizienz zu einer Akzeleration der Karzinogenese des Pankreas in $Pdx1-Cre$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p21^{+/-}$ -Mäusen führt (Morton *et al.*, 2010). Da über die Rolle des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ in der $Kras$ abhängigen Karzinogenese des Pankreas bisher keine Kenntnisse vorliegen, erfolgte die Untersuchung der genetischen Relevanz von $p27^{Kip1}$ *in vivo*.

4.2. *In vivo* Analyse des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$

4.2.1. Die Funktion von $p27^{Kip1}$ in der Tumorgenese $Kras^{G12D}$ induzierter muriner Pankreaskarzinome

Der Verlust des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ resultiert in $p27^{Kip1}$ -Knock-out-Mäusen in einer erhöhten Zellproliferation (Fero *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996), die auch in $Kras^{G12D}$ induzierten PDCs nach einer Reduktion der $p27^{Kip1}$ -Proteinexpression zu erkennen war (Abb. 4-7B und C). Für die Untersuchung der Relevanz von $p27^{Kip1}$ hinsichtlich der Pankreaskarzinogenese auf genetischer Ebene *in vivo* wurde die $p27^{Kip1}$ -Knock-out-Mauslinie in das etablierte murine $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -PDAC-Modell gekreuzt (Hingorani *et al.*, 2003). Aufgrund der Sterilität homozygoter $p27^{Kip1}$ -Knock-out-Weibchen (Fero *et al.*, 1996), konnten nur heterozygote $p27^{Kip1}$ -Knock-out-Weibchen für die Zucht eingesetzt werden, was die Effizienz für den Erhalt von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen verminderte. Für die Analyse von $p27^{Kip1}$ in den frühen Stadien der Tumorentwicklung des Pankreas (1 und 3 Monate) wurden daher nur $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{+/-}$ -Mäuse ausgewählt. Im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen zeigten $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse im Alter von 1, 3 und 6 Monaten keine signifikante Zunahme des Pankreasgewichtes prozentual zum Körpergewicht (Abb. 4-8A).

Die histologische Analyse der Pankreata beider Gruppen ergab ebenfalls ein ähnliches Entwicklungsmuster der prä malignen Vorläuferläsionen im Alter von 1 und 3 Monaten (Abb. 4-8B und C). Nach 6 Monaten zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Azinärduktalen Metaplasien (ADM) in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen (5,2 Läsionen/Feld) im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen (8,7 Läsionen/Feld) (Abb. 4-8D). $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse zeigten anhand ihrer histologischen Auswertung im Alter von 6 Monaten neben einer ebenfalls signifikant reduzierten Anzahl an ADMs (2,0 Läsionen/Feld) eine deutlich erhöhte Rate an Läsionen der Stufe PanIN-1A auf (6,5 Läsionen/Feld) gegenüber der $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Kontrollgruppe (2,9 Läsionen/Feld); (Abb. 4-8D und E). Neben den mucinhaltigen PanIN-1A-Läsionen (Abb. 4-8E) zeichneten sich die Pankreasgewebe der $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse durch zahlreiche dilatierte Gangstrukturen aus, während sich in keinem dieser Tiere hochgradige PanIN-3-Läsionen detektieren ließen.

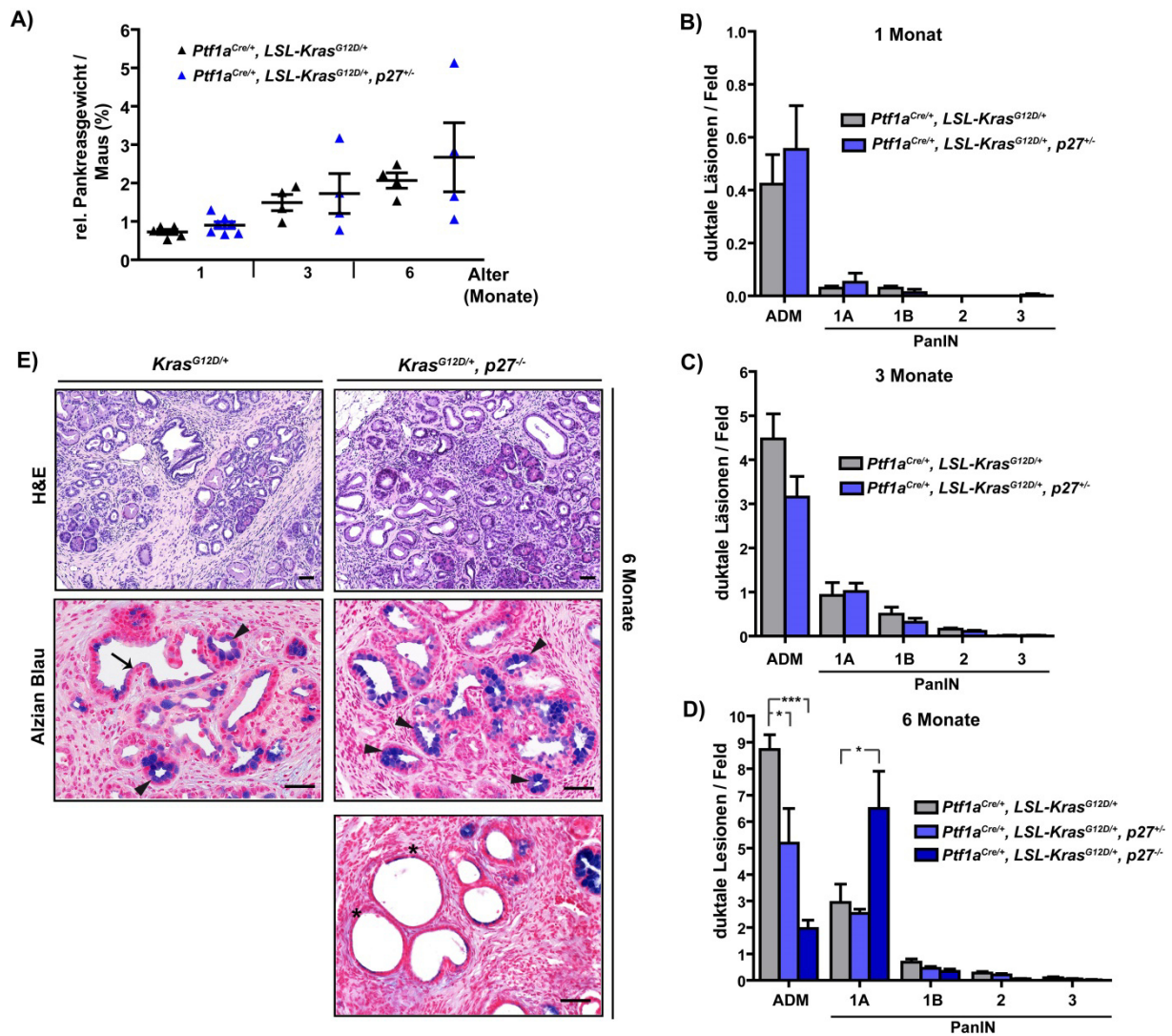


Abb. 4-8: Einfluss von $p27^{Kip1}$ in frühen Stadien der Tumorgenese des Pankreas in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen. **A)** Prozentuale Pankreasgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht von 1, 3 und 6 Monate alten $Kras^{G12D/+}$ -Mäusen im Vergleich zu $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen. (n=4-7 pro Versuchsgruppe). **B)** Anzahl duktaler Läsionen (ADM und PanIN) pro Gesichtsfeld (200-fache Vergrößerung) im Pankreas 1 Monat alter $Kras^{G12D/+}$ (n=3)- und $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse (n=4). **C)** Anzahl duktaler Läsionen pro Gesichtsfeld im Pankreas 3 Monate alter $Kras^{G12D/+}$ - und $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse (n=6 pro Gruppe). **D)** Anzahl duktaler Läsionen pro Gesichtsfeld im Pankreas 6 Monate alter $Kras^{G12D/+}$ -, $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ - und $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse (n=4 pro Gruppe). (*p<0,05; ***p<0,001, ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Es wurden pro Maus jeweils 20 Gesichtsfelder von jeweils drei Paraffinschnitten des Pankreasgewebes ausgezählt (**B**, **C** und **D**). **E)** H&E- und Alzianblau-Färbung von Paraffinschnitten des Pankreas 6 Monate alter $Kras^{G12D/+}$ - und $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse. PanIN-1A-Läsionen sind durch Pfeilspitzen markiert, während PanIN-1B-Läsionen durch Pfeile angezeigt sind. Dilatierte Gangstrukturen sind durch Sternchen gekennzeichnet (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

4.2.2. $p27^{Kip1}$ ist ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor in $Kras^{G12D}$ induzierten murinen Pankreaskarzinomen

Anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Abb. 4-9A) konnte $p27^{Kip1}$ in diesem murinen PDAC-Modell als haploinsuffizienter Tumorsuppressor charakterisiert werden, da bereits die Deletion eines $p27^{Kip1}$ -Allels zu einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit dieser Mäuse auf 353 Tage (Diersch *et al.*, 2013) im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen (466 Tage; Eser *et al.*, 2013) führte. $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse entwickelten zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen vergleichbare duktal differenzierte Adenokarzinome des

Pankreas (Abb. 4-9B). Die Deletion beider $p27^{Kip1}$ -Allele führte in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen zu einer drastischen Verkürzung der mittleren Überlebenszeit auf 179 Tage (Abb. 4-9A).

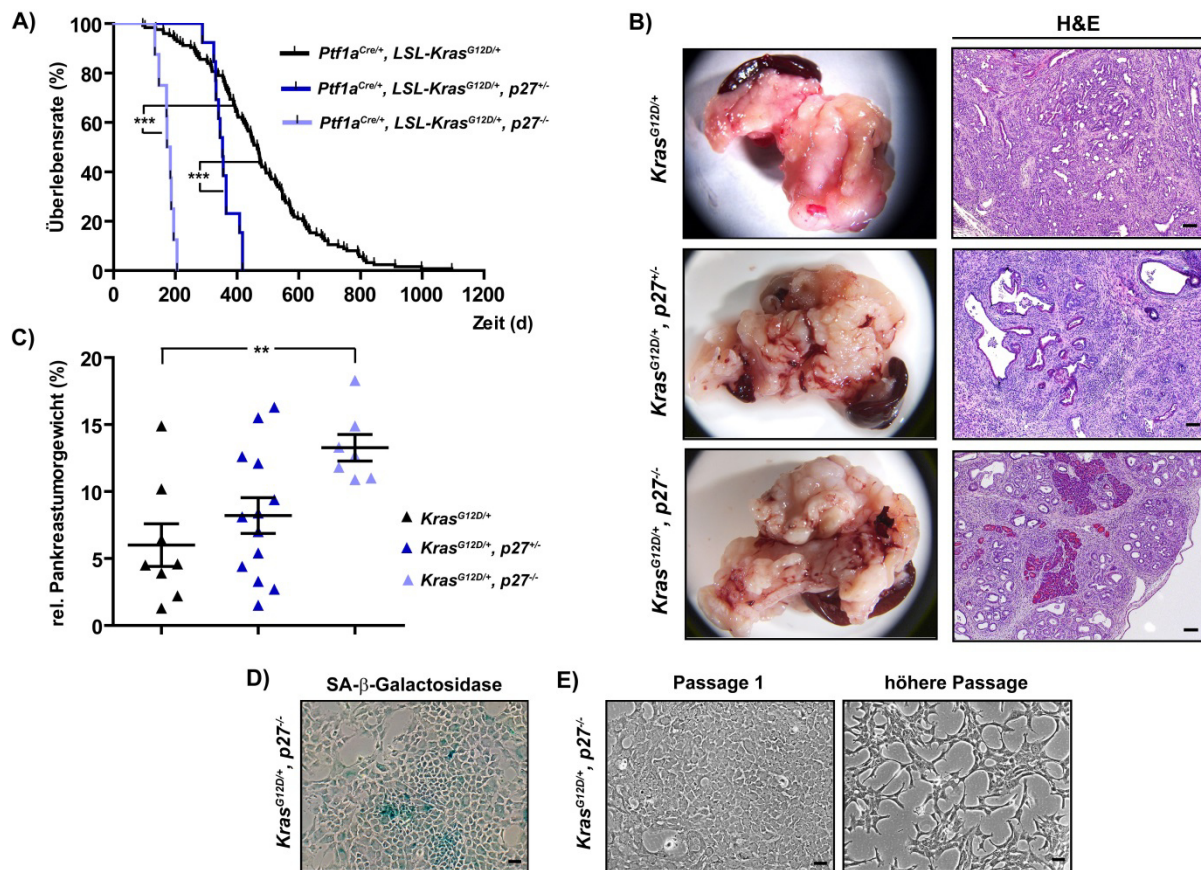


Abb. 4-9: $p27^{Kip1}$ ist ein haploinsuffizienter Tumorsuppressor im $Kras^{G12D}$ -induzierten PDAC. A) Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit von $Ptf1a^{Cre/+}$, $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen (n=13; 353 d) im Vergleich zur $Ptf1a^{Cre/+}$, $Kras^{G12D/+}$ -Kontrollgruppe (n=124; 466 d). Die homozygote Deletion von $p27^{Kip1}$ führte in diesem Mausmodell zu einer weiteren Verkürzung der Überlebenszeit (n=8; 179 d) (***) ($p < 0,001$; Log-rank-Test). **B)** Makroskopische Darstellung der präparierten Pankreastumore der angegebenen Genotypen. Die H&E gefärbten Paraffinschnitte der Tumorgewebe zeigen vergleichbare duktal differenzierte Pankreaskarzinome in $Kras^{G12D/+}$ - und $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen, während $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäuse nur prä-maligne Veränderungen im Pankreas aufweisen (Maßstabsbalken entspricht 100 μ m). **C)** Prozentuale Pankreastumorgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht von $Kras^{G12D/+}$ -Mäusen in Abhängigkeit vom $p27^{Kip1}$ -Status ($p27^{+/+}$ n=8; $p27^{-/-}$ n=13; $p27^{-/-}$ n=7) (** $p < 0,01$; t-Test). **D)** Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase-Färbung epithelialer Zellen, die aus Pankreastumoren von $Ptf1a^{Cre/+}$, $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen isoliert wurden. **E)** Änderung der Morphologie primärer Pankreastumorzellen aus $Ptf1a^{Cre/+}$, $Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen nach mehrfachem Passagieren der Zellen (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m).

Die Pankreata dieser Mäuse waren massiv vergrößert (Abb. 4-9B und C), was zu einer Obstruktion des angrenzenden Gastrointestinaltraktes führte. Anhand der histologischen Analysen ließ sich in den Pankreasgeweben von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen neben desmoplastischen Reaktionen und zahlreichen PanIN-Läsionen jedoch kein invasives Karzinom nachweisen (Abb. 4-9B). Passend hierzu durchliefen Zellen, die aus den Pankreata von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen isoliert wurden, eine Seneszenzkrise *in vitro*, was anhand einer Seneszenz assoziierten β -Galaktosidase-Färbung nachgewiesen

werden konnte (Abb. 4-9D). Diese wurde erst nach mehrfachem Passagieren der Zellen überwunden, einhergehend mit einer Veränderung der Zellmorphologie (Abb. 4-9E).

Des Weiteren konnte eine tendenziell erhöhte makroskopische Metastasierungsrate von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäusen in Leber, Lunge und Lymphknoten festgestellt werden (69,2%; 9/13) im Vergleich zu *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen (39,1%; 18/46) (Abb. 4-10A bis C). *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäuse zeigten neben sporadisch auftretenden Lungenadenomen (1/7) keine morphologischen Veränderungen von Leber, Lunge und Lymphknoten.

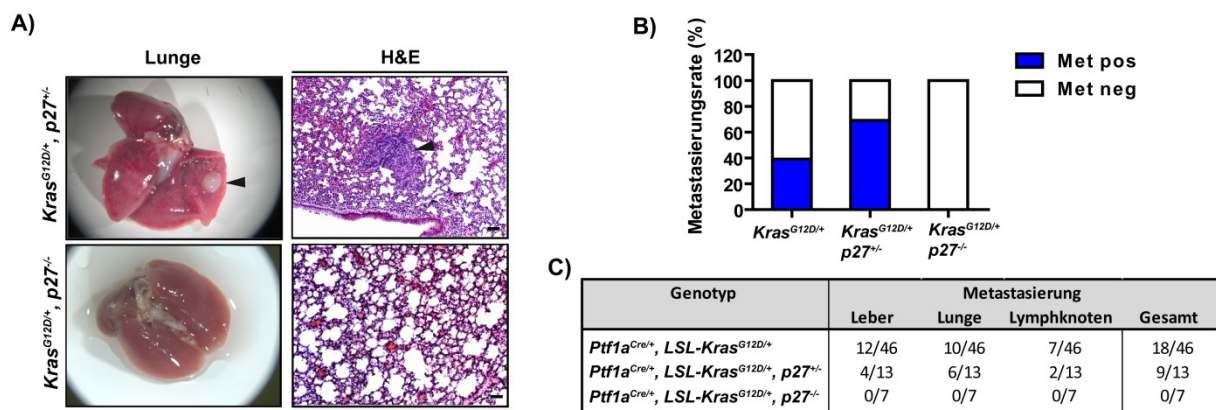


Abb. 4-10: Eine verminderte Expression von *p27*^{Kip1} resultiert in einer erhöhten Metastasierungsrate im murinen *Ptf1a*^{Cre/+}, *Kras*^{G12D/+}-PDAC. **A) Makroskopische Darstellung einer Lungenmetastase in *Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zum *Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/+}-Mausmodell, in dem keine Metastasen detektiert werden konnten. H&E-Färbung von Paraffinschnitten der Lunge mit Metastasierung in *Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäusen. Metastasen sind durch Pfeile markiert (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **B)** Prozentuale Darstellung der makroskopischen Metastasierungsraten von *Kras*^{G12D/+}-Mäusen in Abhängigkeit vom *p27*^{Kip1}-Status. (*p27*^{wt} 39,1%; *p27*^{+/-} 69,2%; *p*=0,067; Fisher's exact-Test) **C)** Überblick der Metastasierungsraten in Leber, Lunge und Lymphknoten der angezeigten Genotypen.**

4.2.3. Murine Pankreaskarzinomzellen weisen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von *p27*^{Kip1} auf

Um erste Hinweise zu erlangen, wie *p27*^{Kip1} die Karzinogenese des Pankreas akzeleriert und die Metastasierung beeinflusst, wurden Zelllinien isoliert. Eine wichtige Rolle für die regulatorische Aktivität von *p27*^{Kip1} spielt seine subzelluläre Lokalisation. In murinen PDAC-Zellen aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen konnte anhand der Analysen nukleärer und zytoplasmatischer Zellextrakte eine deutliche Anreicherung von *p27*^{Kip1} im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 4-11A). Im Vergleich hierzu konnten in Zellextrakten aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäusen geringere *p27*^{Kip1}-Proteinmengen detektiert werden, die jedoch auch vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert waren (Abb. 4-11A). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch bei der histologischen Analyse von *p27*^{Kip1} in PDAC-Gewebeschnitten von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}- und *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{+/-}-Mäusen wieder (Abb. 4-11B). Auch hier ließ sich eine Lokalisation von *p27*^{Kip1} im Zytoplasma detektieren, einhergehend mit einer reduzierten *p27*^{Kip1}-Expression in *p27*^{Kip1} heterozygoten Mäusen.

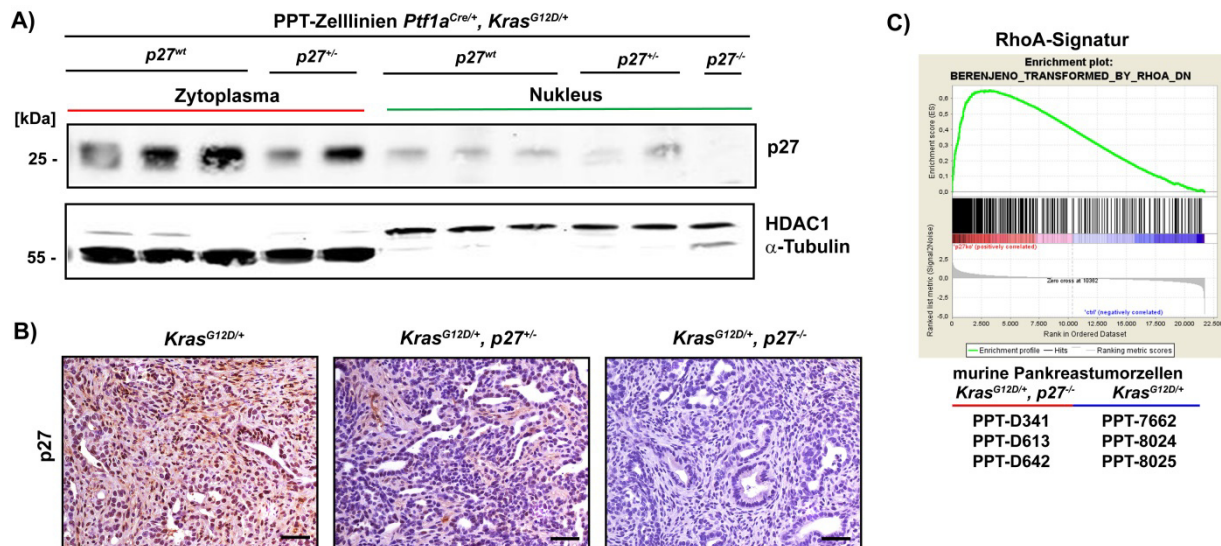


Abb. 4-11: Subzelluläre Lokalisation von p27^{Kip1} in murinen PDAC-Zellen. **A)** Western Blot-Analyse der subzellulären Lokalisation von p27^{Kip1} in murinen PPT-Zelllinien aus dem *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Modell mit unterschiedlichem *p27*^{Kip1}-Status (p27^{wt}: PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025; p27^{+/-}: PPT-D146, PPT-D261; p27^{-/-}: PPT-D341). Als Kontrollproteine der zellulären Fraktionen dienten HDAC1 (nukleär) und α -Tubulin (zytoplasmatisch). **B)** Immunhistochemischer Nachweis der p27^{Kip1}-Expression in Paraffinschnitten von Pankreastumorgewebe der angegebenen Genotypen (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m). **C)** Gene set enrichment analysis (GSEA) der mRNA-Expressionsprofile muriner Pankreastumorzellen aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}- und *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen mit signifikanter Anreicherung RhoA kontrollierter Gene in *p27*^{-/-}-Zelllinien. Für die GSEA wurde mRNA aus je drei Zelllinien pro Genotyp isoliert und für Microarray-Analysen mit dem GeneChip mouse gene 1.0 ST aufbereitet. Normalized enrichment score (NES): 2,802; Falschpositiv-Rate (FDR): q<0,001; Nominaler p-Wert: p<0,001.

Eine mögliche inhibitorische Funktion der RhoA-Aktivität von p27^{Kip1} im Zytoplasma, die bereits in anderen Studien nachgewiesen wurde (Besson *et al.*, 2004b; Wu *et al.*, 2006), konnte anhand von Gene Set Enrichment-Analysen (GSEA) der mRNA-Expressionsprofile von Pankreastumorzellen aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}- und *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen in Betracht gezogen werden. Hierbei zeigte sich in *p27*^{Kip1} defizienten Tumorzellen eine signifikante Anreicherung RhoA kontrollierter Gene (Berenjeno *et al.*, 2007) im Vergleich zu Tumorzellen mit *p27*^{Kip1}-Wildtyp-Status (Abb. 4-11C).

4.2.4. Die verminderte Expression von p27^{Kip1} hat keinen Einfluss auf die Viabilität und die Proliferation von murinen Pankreaskarzinomzellen

In seiner Rolle als Tumorsuppressor stoppt p27^{Kip1} durch Inhibierung von Cyclin/CDK-Komplexen die Zellproliferation (Sherr & Roberts, 1999). Um den Effekt der p27^{Kip1}-Expression auf die Proliferationsrate des murinen PDAC zu untersuchen, wurden Tumorgewebe von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen mit unterschiedlichem *p27*^{Kip1}-Status mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistochemisch analysiert (Abb. 4-12A). Anhand der Ki67-positiven Zellen zeigte sich hierbei zwischen *Kras*^{G12D} induzierten PDACs mit *p27*^{Kip1}-Wildtyp-Status (39 \pm 7%) und *p27*^{Kip1} heterozygoten PDACs (36 \pm 10%) kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate (Abb. 4-12B).

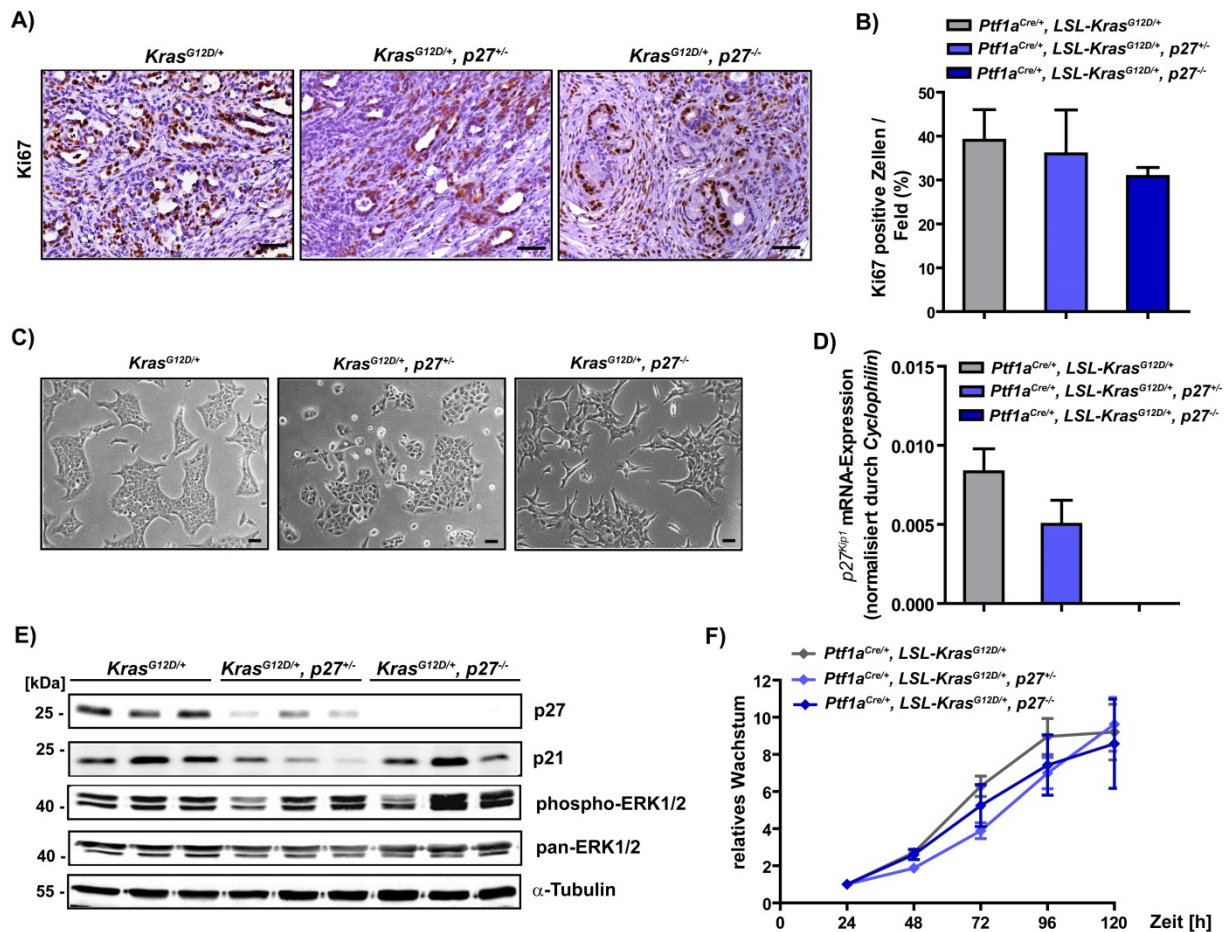


Abb. 4-12: Proliferation und Viabilität muriner PDAC-Zellen sind unabhängig von der *p27^{Kip1}*-Expression. **A)** Immunhistochemische Analyse der Proliferation anhand Ki67 positiver Zellen im Pankreastumorgewebe von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit unterschiedlichem *p27^{Kip1}*-Status (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **B)** Quantifizierung Ki67-positiver Zellen im Pankreastumorgewebe der angegebenen Genotypen (n=3 pro Genotyp). Es wurden pro Maus jeweils 5 Gesichtsfelder (200-fache Vergrößerung) von drei Paraffinschnitten des Pankreastumorgewebes ausgezählt. **C)** Hellfeldmikroskopie zur Darstellung der Morphologie primärer Pankreastumorzellen der angezeigten Genotypen (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **D)** Gendosis abhängige *p27^{Kip1}*-mRNA-Expression in murinen Pankreastumorzellen mit hetero- oder homozygoter Deletion von *p27^{Kip1}* im Vergleich zu Zellen mit *p27^{Kip1}*-Wildtyp. Es wurde mRNA von je drei Zelllinien der angegebenen Genotypen isoliert und mittels qPCR unter Verwendung einer Standardreihe analysiert. Die Normalisierung erfolgte durch *Cyclophilin*. **E)** Western Blot zur Darstellung der Gendosis abhängigen *p27^{Kip1}*-Expression auf Proteinebene. Des Weiteren wurden Effekte der verminderten *p27^{Kip1}*-Expression auf die Aktivierung des ERK-Signalweges sowie auf die Expressionsraten des Tumorsuppressors *p21^{Cip1}* analysiert (n=3 Zelllinien pro Genotyp). **F)** MTT-Assay von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Zelllinien mit unterschiedlichem *p27^{Kip1}*-Status. Es wurden 1000 Zellen pro Zelllinie ausgesät und die n-fache Veränderung der Zellviabilität nach 24, 48, 72, 96 und 120 h bestimmt (n=3 Messzyklen mit je drei Zelllinien der angegebenen Genotypen; *p27^{wt}*: PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025; *p27^{+/-}*: PPT-D146, PPT-D261, PPT-D380; *p27^{-/-}*: PPT-D341, PPT-D613, PPT-D642).

Die Deletion beider *p27^{Kip1}*-Allele führte ebenfalls zu keiner gesteigerten Zellproliferation im Pankreas von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen (31±2% Ki67-positive Zellen, Abb. 4-12B). Isolierte Pankreastumorzelllinien aus *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit heterozygoter oder homozygoter Deletion von *p27^{Kip1}* zeigten eine ähnliche epitheliale bis intermediäre Zellmorphologie wie *p27^{Kip1}* exprimierende *Kras^{G12D}* induzierte Tumorzellen (Abb. 4-12C). Die Expressionsraten von *p27^{Kip1}* in Zelllinien aus *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, p27^{+/-}*-Mäusen waren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich reduziert verglichen mit *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Zelllinien (Abb. 4-12D und E). In Tumorzellen aus *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-*

$Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen ließ sich, wie erwartet, keine $p27^{Kip1}$ -Expression detektieren (Abb. 12D und E).

Zur Überprüfung evtl. auftretender kompensatorischer Effekte wurde die Expressionsrate des Zellzyklusinhibitors $p21^{Cip1}$ auf Proteinebene analysiert (Abb. 4-12E). Hierbei ließ sich in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Zelllinien eine zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien vergleichbare $p21^{Cip1}$ -Expression nachweisen, während in den $p27^{Kip1}$ heterozygoten Zelllinien eine verminderte Proteinmenge von $p21^{Cip1}$ vorlag (Abb. 4-12E). Die Aktivierung des Mitogen aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Signalwegs in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien mit unterschiedlichem $p27^{Kip1}$ -Status wurde anhand der ERK-Phosphorylierung untersucht. Hier zeigte sich unabhängig der $p27^{Kip1}$ -Expression in allen Zelllinien ein starkes ERK-Phosphorylierungssignal, was auf eine vergleichbare MAPK-Aktivierung schließen lässt (Abb. 4-12E). Mit Hilfe eines MTT-Assays, der häufig mit der Zellzahl korreliert, wurden außerdem Unterschiede des Wachstums der isolierten Pankreastumorzelllinien *in vitro* zu den Zeitpunkten 24, 48, 72, 96 und 120h nach Aussaat der Zellen untersucht (Abb. 4-12F). Anhand des Kurvenverlaufs des relativen Wachstums über den untersuchten Zeitraum konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien mit unterschiedlichem $p27^{Kip1}$ -Status festgestellt werden. Die erreichten Steigerungen des relativen Wachstums zum Zeitpunkt von 120h lagen bei 9,2-fach ($p27^{wt}$), 9,6-fach ($p27^{+/-}$) und 8,6-fach ($p27^{-/-}$) mit einer anhand des linearen Verlaufs erkennbaren Steigerungstendenz $p27^{Kip1}$ heterozygoter Zelllinien (Abb. 4-12F).

Neben seiner inhibitorischen Wirkung auf Cyclin/CDK-Komplexe, spielt $p27^{Kip1}$ außerdem eine wichtige Rolle bei der Bildung der für den G_1/S -Phasen-Übergang essentiellen Komplexe aus D-Cyclinen mit CDK4 oder 6 (LaBaer *et al.*, 1997). In murinen Pankreastumorzellen konnte in dieser Studie eine modulatorische Funktion von $p27^{Kip1}$ auf die Expression von Cyclin D1 festgestellt werden.

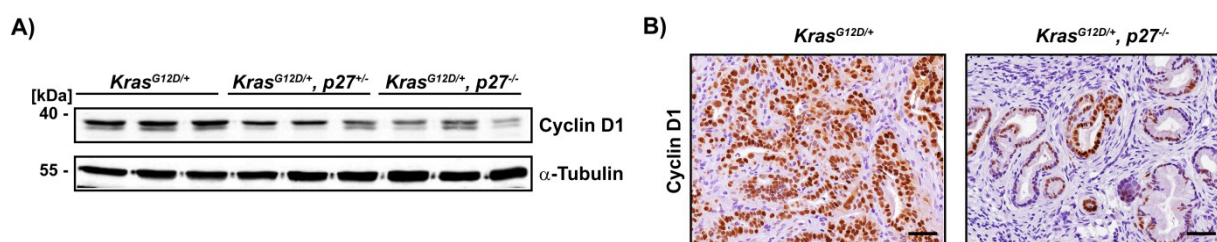


Abb. 4-13: Verminderte Cyclin D1-Expression in $p27^{Kip1}$ defizienten murinen Pankreastumorzellen. **A)** Western Blot der Proteinlysate von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien mit unterschiedlichem $p27^{Kip1}$ -Status zur Analyse der Cyclin D1-Expression ($p27^{wt}$: PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025; $p27^{+/-}$: PPT-D146, PPT-D261, PPT-D380; $p27^{-/-}$: PPT-D341, PPT-D613, PPT-D642). **B)** Immunohistochemischer Nachweis von Cyclin D1 im Pankreastumorgewebe von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m).

So zeigten $p27^{Kip1}$ defiziente $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien in *Western Blot*-Analysen eine durchschnittlich geringere Cyclin D1-Expression im Vergleich zu Kontrollzelllinien (Abb. 4-13A). Eine deutlich verminderte Cyclin D1-Expression ließ sich auch in Pankreas-

tumorgewebe von *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *p27^{-/-}*-Mäusen anhand der histologischen Gegenüberstellung zu *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen erkennen (Abb. 4-13B).

4.2.5. Die Reduktion der *p27^{Kip1}*-Expression in *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen fördert Gendosis abhängig die Entstehung von Gallengangs-karzinomen

Der Transkriptionsfaktor Ptf1a/p48 moduliert im exokrinen Pankreas Proliferationssignale, an denen *p27^{Kip1}* beteiligt ist (Rodolosse *et al.*, 2004). Um diesbezügliche Effekte einer Haploinsuffizienz von Ptf1a/p48 auf die Funktion von *p27^{Kip1}* im *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell auszuschließen, wurden *p27^{Kip1}* defiziente Mäuse auch in das *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell gekreuzt (Hingorani *et al.*, 2003). Dieses Modell ermöglicht zudem die Untersuchung weiterer Bereiche des Gastrointestinaltraktes, da die Expression von *Pdx1* bereits in Progenitorzellen während der Entwicklung des Vorderdarmepithels erfolgt und somit über die *Pdx1-Cre*-Linie auch Zellen im Magen, Duodenum und dem Gallengang markiert werden können (Offield *et al.*, 1996).

In dieser Studie führte die heterozygote Deletion von *p27^{Kip1}* in *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen zu einer dramatischen Verkürzung der mittleren Überlebenszeit von 421 auf 161 Tage, die sich nach homozygoter Deletion von *p27^{Kip1}* weiter auf 105 Tage reduzierte (Abb. 4-14A). Dabei zeigten nahezu 50% der *p27^{Kip1}* heterozygoten Tiere eine Dilatation des Gallenganges (*Ductus hepatocholedochus* (DHC)) (Abb. 4-14B). Die Dilatation des DHC war in 100% der *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D}*, *p27^{-/-}*-Mäuse nachweisbar. Makroskopisch zeigten sich Gallengangskarzinome in den *p27^{-/-}*-Tieren (Abb. 4-14B).

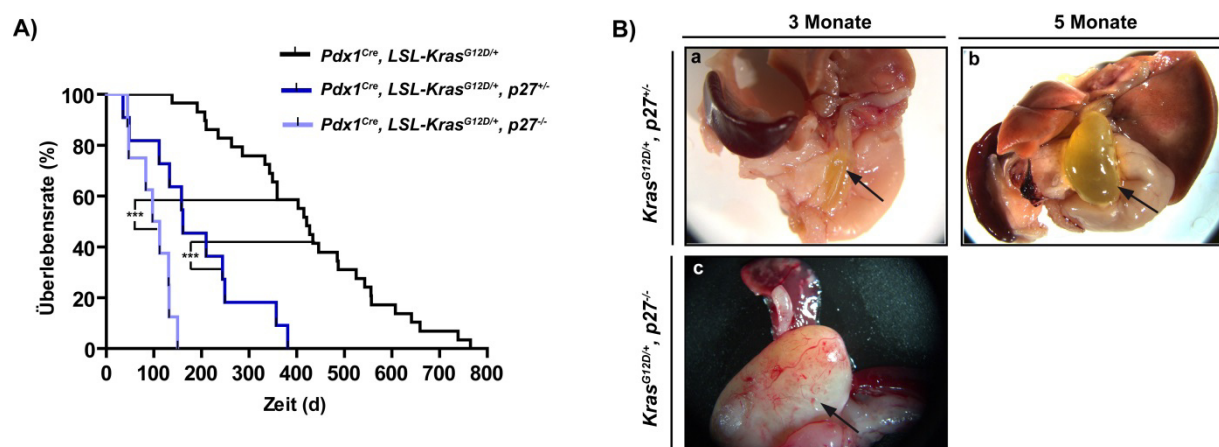


Abb. 4-14: Funktionale Rolle des Tumorsuppressors *p27^{Kip1}* bei der Entstehung von Gallengangs-karzinomen im *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell. **A) Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit von *Pdx1-Cre*, *Kras^{G12D/+}*, *p27^{-/-}*-Mäusen ($n = 11$; 161 d) im Vergleich zur *Pdx1-Cre*, *Kras^{G12D/+}*-Kontrollgruppe ($n=29$; 421 d). Die homozygote Deletion von *p27^{Kip1}* führte in diesem Mausmodell zu einer weiteren Verkürzung der Überlebenszeit ($n=8$; 105 d); (** $p < 0,001$; *Log-rank-Test*). **B)** Übersichtsaufnahme der präparierten Organe des Gastrointestinaltraktes der angezeigten Genotypen. Der *Ductus hepatocholedochus* (DHC) (a, b) bzw. das Karzinom des DHC (c) sind durch Pfeile markiert.**

Mittels histologischer Analysen von 3 und 5 Monate alten Kontrolltieren (*Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D/+}*) konnten im DHC nur niedrig gradige biliäre intraepitheliale Neoplasien (BillN)

nachgewiesen werden (Abb. 4-15A und B). Im Vergleich hierzu zeigte sich in $p27^{Kip1}$ heterozygoten Mäusen bereits im Alter von 3 Monaten die Ausbildung biliärer Papillomatosen im Bereich der Papille, die die Ursache der Gallenabflussbehinderungen darstellen (Abb. 4-15A). Des Weiteren ließen sich in diesen Tieren BillNs der Stufe 2 und eine Verdickung des DHC feststellen, was an einigen Stellen zu Verengungen der Gallenwege führte (Abb. 4-15A).

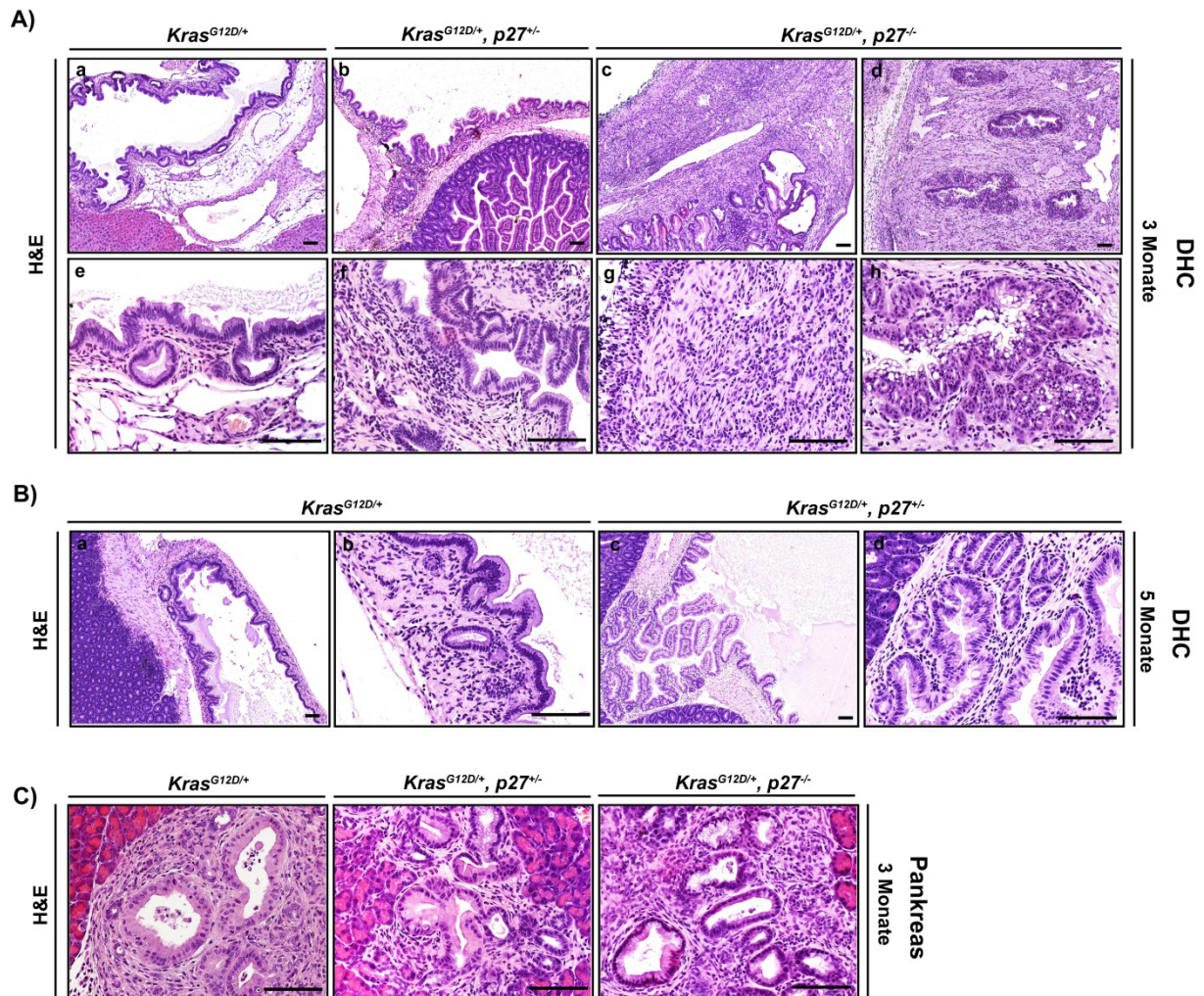


Abb. 4-15: Eine verminderte Expression des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ akzeleriert die Entstehung von Gallengangskarzinomen im $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mausmodell. A) Die H&E gefärbten Paraffinschnitte der DHC-Gewebe zeigen biliäre intraepitheliale Neoplasien (BillN) der Stufe 1 in $Kras^{G12D/+}$ -Mäusen (a, e) bzw. der Stufe 2 in $Kras^{G12D/+}, p27^{-/-}$ -Mäusen (b, f), während $Kras^{G12D/+}, p27^{-/-}$ -Mäuse im Alter von 3 Monaten bereits Karzinome des DHC aufweisen (c, d, g, h). B) Zunehmende Veränderungen des DHC mit biliären Papillomatosen im Bereich der Papille in 5 Monate alten $Kras^{G12D/+}, p27^{-/-}$ -Mäusen (c, d) im Vergleich zur Kontrollgruppe (a, b). C) Die H&E-Färbung von Paraffinschnitten der Pankreata 3 Monate alter $Pdx1-Cre, Kras^{G12D/+}$ -Mäuse mit unterschiedlichem $p27^{Kip1}$ -Status zeigt ein ähnliches Muster prämaligener Vorläuferläsionen (ADM und PanIN-1); (Alle Maßstabsbalken entsprechen 100 μm).

Eine Steigerung dieser atypischen Wachstumsvorgänge ließ sich anhand der zunehmenden Gallenabflussbehinderungen und einer weiteren Dilatation des DHC im Alter von 5 Monaten in $p27^{Kip1}$ heterozygoten Mäusen beobachten (Abb. 4-14B und 4-15B).

Die homozygote Deletion von $p27^{Kip1}$ in $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen führte bereits im Alter von 3 Monaten zu massiven Veränderungen des DHC, was anhand hochgradiger BillNs und metaplastischer Strukturen histologisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-15A). Im Pankreas 3 Monate alter $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäuse zeigten sich dagegen unabhängig der $p27^{Kip1}$ -Expression nur PanIN-Läsionen niedrigen Grades (Abb. 4-15C), was übereinstimmt mit den erhaltenen Daten zu $p27^{Kip1}$ im $Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Modell (Abb. 4-8C) und auf eine exponierte Stellung des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ in der Karzinogenese des extrahepatischen Gallengangs hinweist.

4.2.6. Die verminderte Expression von $p27^{Kip1}$ akzeleriert die Entstehung $PIK3CA^{H1047R}$ induzierter muriner Gallengangskarzinome

Um die Funktionalität von $p27^{Kip1}$ in der Karzinogenese des Gallengangs näher zu analysieren, sollten Zelllinien aus dem DHC isoliert werden. Aus dem limitierten Gewebe des DHC konnte jedoch keine erfolgreiche Generierung von Zelllinien erzielt werden. Daher wurden, um unvoreingenommen potentielle von $p27^{Kip1}$ kontrollierte Signalwege zu finden, die eine wichtige Rolle in der Karzinogenese übernehmen, $p27^{Kip1}$ profiziente und defiziente PDAC-Zelllinien verwendet. Es wurden zunächst *Gene Set Enrichment* Analysen (GSEA) der mRNA-Expressionsprofile von Pankreastumorzellen aus $Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}$ - und $Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, p27^{-/-}$ -Mäusen ausgewertet. In $p27^{Kip1}$ defizienten Tumorzellen konnte hierbei eine signifikante Anreicherung von AKT1-Zielgenen (Xu *et al.*, 2007) im Vergleich zu Tumorzellen mit $p27^{Kip1}$ -Wildtyp-Status nachgewiesen werden (Abb. 4-16A). Zur Validierung dieser Daten wurde mittels *Western Blot*-Analysen der AKT-Phosphorylierungsstatus in $Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien in Abhängigkeit der $p27^{Kip1}$ -Expression überprüft (Abb. 4-16B). Nach Normalisierung der Proteinmengen mit pan-AKT zeigte sich eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von AKT (Ser473) sowohl in $p27^{Kip1}$ heterozygoten (1,6-fach; $p=0,07$) als auch in $p27^{Kip1}$ homozygot deletierten Tumorzellen (1,4-fach; $p=0,06$) im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Kontrollzelllinien (Abb. 4-16C). Die relativen Phosphorylierungsraten für AKT (Thr308) lagen bei 1,4-fach ($p27^{+/-}$) und 1,2-fach ($p27^{-/-}$) im Vergleich zu $p27^{Kip1}$ -Wildtypzelllinien (Abb. 4-16C). Die Relevanz des PI3K-AKT-Signalwegs in der Tumorgenese des Gallengangs konnte bereits in Studien belegt werden (Tanno *et al.*, 2004; Marsh *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des $Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mausmodells (Eser *et al.*, 2013) das Potenzial der aktivierenden Punktmutation (H1047R) der katalytischen Untereinheit p110 α von PI3K in der Karzinogenese des DHC untersucht und dabei Effekte einer verminderten $p27^{Kip1}$ -Expression analysiert. Die mittlere Überlebenszeit von $Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mäusen lag mit 273 Tagen (Abb. 4-16D) deutlich unter der von $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen (421 Tage; Abb. 4-14A) (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Dieter Saur, München). Die Signaltransduktion der onkogenen PI3K induziert in $Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mäusen die Karzinogenese im Gallengang und im Pankreas. Gallengangskarzinome treten aber im Vergleich zu $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen nur in $Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mäusen auf. So zeigten einige $Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mäuse bereits im Alter von 6 Monaten fortgeschrittene Metaplasien des DHC (Abb. 4-16E). Im Gegensatz zu $Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D}, p27^{+/-}$ -

Mäusen, bei denen ca. 50% der Tiere neoplastische Veränderungen des DHC aufwiesen, ließ sich in allen *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, *p27^{Kip1}*-Mäusen eine deutliche morphologische Veränderung des DHC beobachten, die anhand histologischer Analysen als hochgradige BillNs bereits im Alter von 3 Monaten identifiziert werden konnten (Abb. 4-16E).

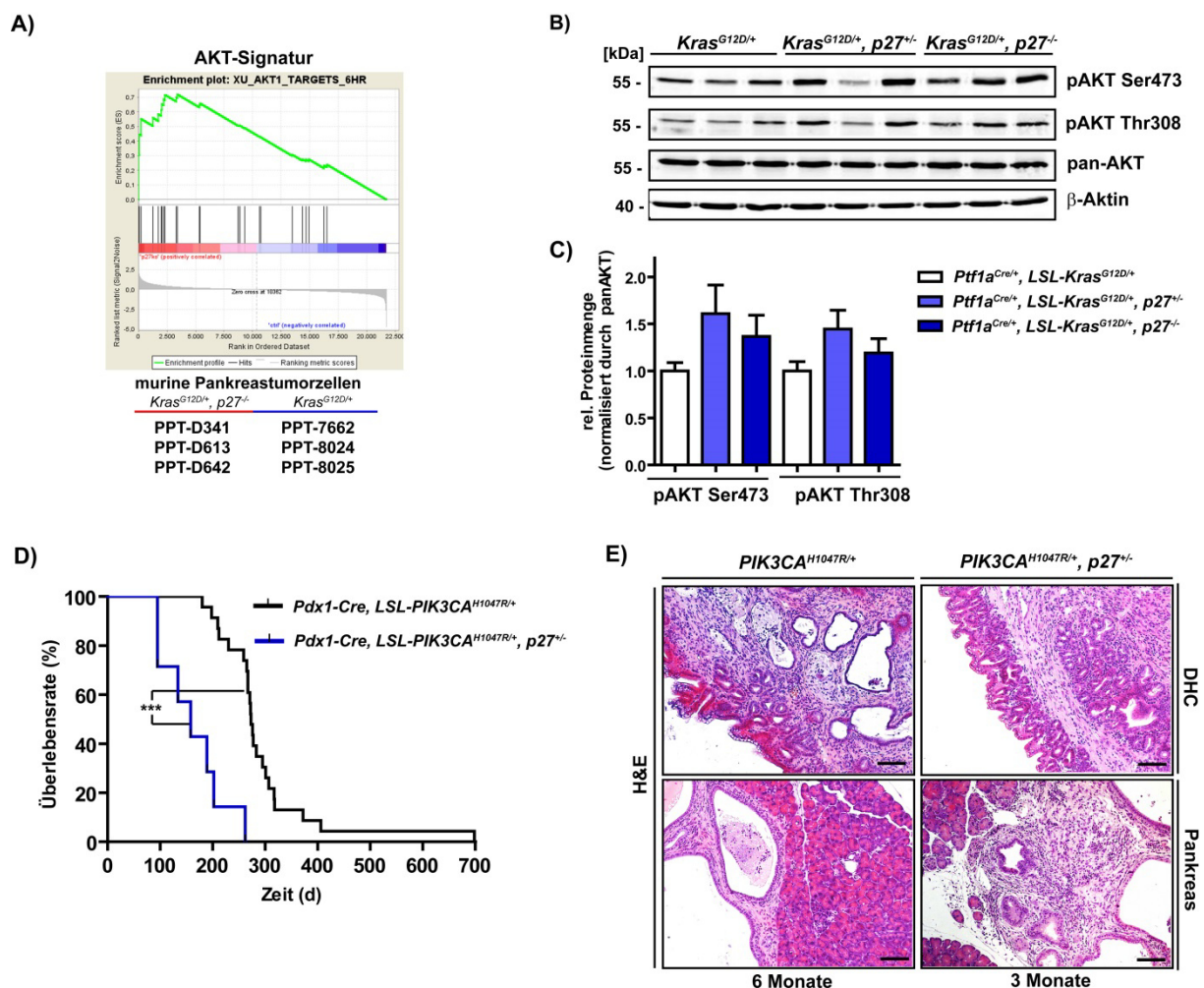


Abb. 4-16: Modulatorische Effekte von $p27^{Kip1}$ auf die PI3K-AKT-Signaltransduktion. A) GSEA der mRNA-Expressionsprofile muriner Pankreastumorzellen aus *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}* (n=3)- und *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *p27^{-/-}*-Mäusen (n=3) mit signifikanter Anreicherung von AKT1-Zielgenen in *p27^{-/-}*-Zelllinien. NES: 2,053; FDR: $q < 0,001$; NOM: $p < 0,001$. **B)** Western Blot zur Analyse von Effekten verminderter *p27^{Kip1}*-Expression auf die Aktivierung des AKT-Signalweges (Zelllinien: *p27^{wt}*: PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025; *p27^{-/-}*: PPT-D146, PPT-D261, PPT-D380; *p27^{-/-}*: PPT-D341, PPT-D613, PPT-D642). **C)** Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse mit tendenziell erhöhten relativen Proteinmengen an phosphoryliertem AKT (Ser473 und Thr308) nach Normalisierung durch pan-AKT in *p27^{Kip1}* reduzierten murinen Pankreastumorzellen. **D)** Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen eine signifikante Verkürzung der Überlebenszeit von *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, *p27^{-/-}*-Mäusen (n=7; 158 d) im Vergleich zur *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*-Kontrollgruppe (n=23; 273 d). (***) $p < 0,001$; Log-rank-Test). **E)** H&E gefärbte Paraffinschnitte der DHC-Gewebe 6 Monate alter *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*-Mäuse zeigen fortgeschrittene Metaplasien, die in *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, *p27^{-/-}*-Mäusen bereits nach 3 Monaten detektiert werden konnten. Die Pankreata dieser Mäuse weisen zystische Läsionen und PanINs niedrigen Grades auf (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m).

Vergleichbar zum *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras^{G12D}*-Modell führte eine verminderte *p27^{Kip1}*-Expression auch in *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*-Mäusen zu keinem vermehrten Auftreten von präneoplastischen Läsionen im Pankreas. So zeigten *PIK3CA^{H1047R/+}*- und *PIK3CA^{H1047R/+}*, *p27^{-/-}*-Mäuse zum Zeitpunkt fortgeschrittener Metaplasien des DHC nur zystische Läsionen

und PanINs niedrigen Grades im Pankreas (Abb. 4-16E). Entsprechend zu diesen Daten führte die heterozygote Deletion von $p27^{Kip1}$ in $Pdx1-Cre$, $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mäusen zu einer weiteren signifikanten Reduktion der mittleren Überlebenszeit auf 158 Tage (Abb. 4-16D). Anhand der Gegenüberstellung beider Mausmodelle konnte somit eine größere Relevanz des PI3K-Signalwegs in der Karzinogenese des Gallengangs demonstriert werden. Hierbei scheint das Ausmaß der Aktivierung des PI3K-Signalwegs von $p27^{Kip1}$ moduliert zu werden. Die Entschlüsselung hierfür grundlegender Mechanismen ist Gegenstand laufender Studien und wurde in dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt.

4.3. Signaltransduktion von onkogenem $Kras^{G12D}$ im primären Zellsystem

4.3.1. Funktionale Analyse der Signaltransduktion von onkogenem $Kras^{G12D}$ in primären dukталen Zellen des murinen Pankreas

Nachdem gezeigt wurde, dass molekulare Veränderungen im Modell der primären dukталen Pankreaszellen, wie die Regulation der $p27^{Kip1}$ -Expression, relevant für die $Kras^{G12D}$ induzierte Karzinogenese *in vivo* sind, sollte dieses Modell verwendet werden, um unvoreingenommen neue $Kras$ abhängige Signalwege zu finden.

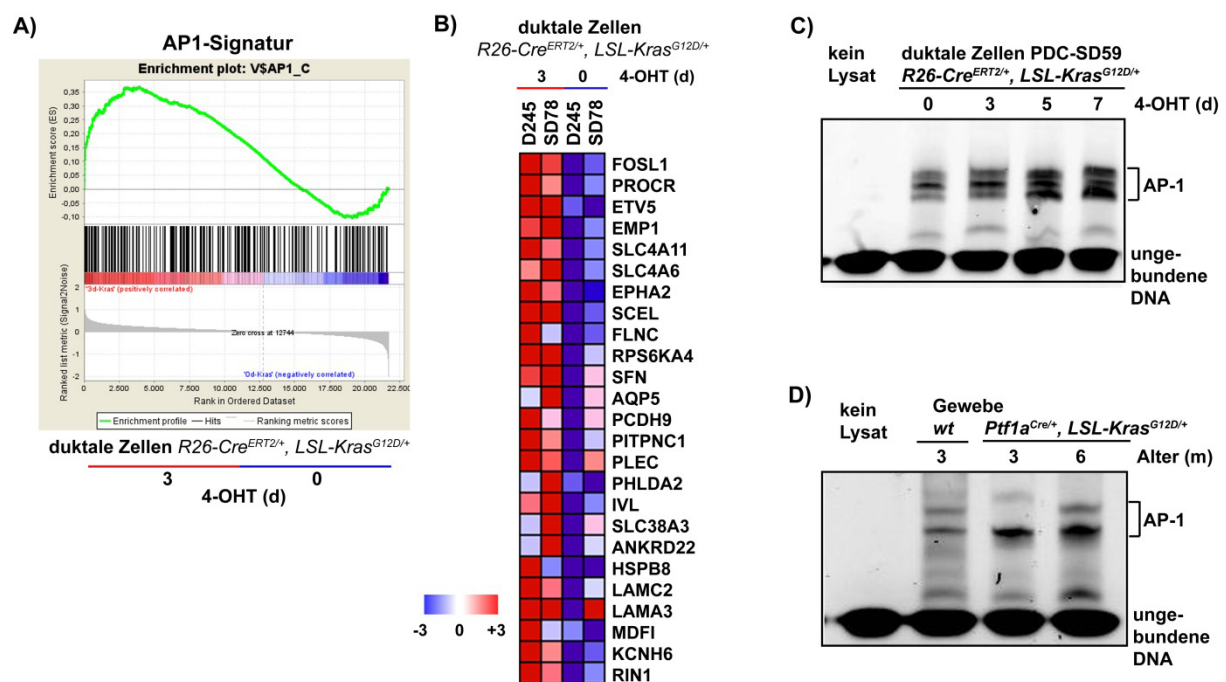


Abb. 4-17: Die Aktivierung von onkogenem $Kras^{G12D}$ führt in primären PDCs zur Induktion von AP-1-Zielgenen. **A)** GSEA der mRNA-Expressionsprofile primärer PDCs aus $R26-Cre^{ERT2/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen mit signifikanter Anreicherung von AP-1-Zielgenen nach 3-tägiger Induktion von onkogenem $Kras^{G12D}$ durch 4-OHT. Für die GSEA wurde mRNA aus je zwei Zelllinien isoliert, die für 3 Tage mit 200 nM 4-OHT behandelt wurden bzw. unbehandelt blieben (EtOH), und für Microarray-Analysen mit dem GeneChip mouse gene 1.0 ST aufbereitet. NES: 1,684; FDR: $q < 0,05$; NOM: $p < 0,001$. **B)** Ausschnitt der Heat Map mit hochregulierten Genen der unter **A)** gezeigten AP-1-Signatur. **C)** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) von Proteinlysaten aus 0, 3, 5 und 7 Tage 4-OHT behandelten PDCs aus $R26-Cre^{ERT2/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen, die mit Fluorophor (Dy682) markierten doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden mit einer AP-1-Konsensussequenz inkubiert wurden. **D)** EMSA von Proteinlysaten aus Pankreasgeweben von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen zur Analyse der AP-1-Bindungsaktivität im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Pankreasgewebe.

Hierzu sollten mit Hilfe von Transkriptomanalysen primärer PDCs, die aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen isoliert und für 3 Tage mit 4-OHT induziert wurden, zunächst erste Einblicke in die *Kras^{G12D}* abhängigen genetischen Programme dieser Zellen erhalten werden. Die mRNA-Expressionsprofile Vehikel- und 4-OHT behandelter PDCs wurden mit einer *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA) ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* in diesen Zellen die Expression von AP-1-Zielgenen induziert (Abb. 4-17A und B). Hierzu passend ließ sich in einem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) eine kontinuierliche Zunahme der AP-1-Bindungsaktivität in PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 4-OHT nachweisen (Abb. 4-17C). Eine vermehrte AP-1-DNA-Bindung konnte auch *in vivo* festgestellt werden. So resultierte die Aktivierung von *Kras^{G12D}* im Pankreas von *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen in einer erhöhten AP-1-Bindungsaktivität im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren (Abb. 4-17D).

4.3.2. Die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* induziert in primären dukталen Pankreaszellen die Expression von *Fra1*

Zur Identifizierung der Mitglieder der AP-1-Familie, die zu einer verstärkten AP-1 Bindungsaktivität nach Aktivierung von *Kras^{G12D}* beitragen, wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Hierbei zeigte sich für die AP-1-Mitglieder *c-Fos*, *FosB* und *c-Jun* in PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 4-OHT eine undulierende bzw. gar keine Expression (Daten nicht gezeigt).

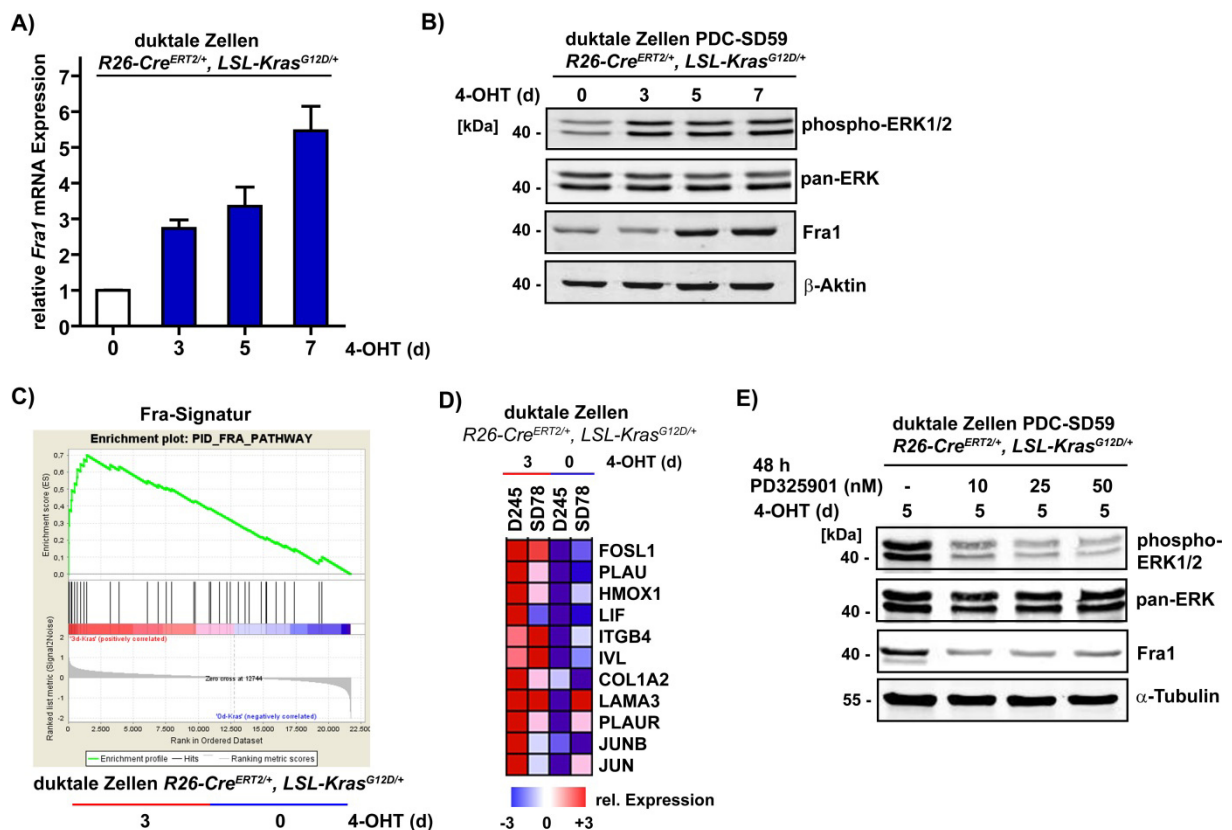


Abb. 4-18: Induktion des AP-1-Mitglieds Fra1 in primären PDCs nach Aktivierung von Kras^{G12D}. **A)** Kontinuierlicher Anstieg der *Fra1*-mRNA-Expression in PDCs nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 200 nM 4-OHT. Es wurden je vier Zelllinien des angegebenen Genotyps isoliert (PDC-D245, PDC-SD59, PDC-SD139, PDC-SDF54) und mit EtOH bzw. 4-OHT behandelt. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qPCR ($\Delta\Delta$ CT-Methode). **B)** *Western Blot*-Analyse der Fra1-Expression nach 3-, 5- und 7-tägiger Induktion von Kras^{G12D} in murinen PDCs mit 200 nM 4-OHT im Vergleich zu nicht induzierten Zellen. Die Phosphorylierungsrate der Kinasen ERK1/2 (Thr202/Tyr204) diente als Nachweis der Kras^{G12D}-Induktion. **C)** GSEA der mRNA-Expressionsprofile primärer PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit signifikanter Anreicherung Fra1 relevanter Gene nach 3-tägiger Induktion von onkogenem Kras^{G12D} durch 4-OHT (n=2) im Vergleich zu EtOH behandelten Zellen (n=2). NES: 2,304; FDR: q<0,001; NOM: p<0,001. **D)** Ausschnitt der *Heat Map* mit hochregulierten Genen der unter **C)** gezeigten Fra1-Signatur. **E)** *Western Blot*-Analyse der Fra1-Expression nach MEK-Inhibierung. PDCs des angegebenen Genotyps wurden für 5 Tage mit 4-OHT induziert und anschließend für 48h mit dem MEK-Inhibitor PD325901 in den Konzentrationen 10, 25 und 50 nM behandelt. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt. Der Nachweis der MEK-Inhibierung erfolgte anhand der reduzierten Phosphorylierung der Effektorproteine ERK1/2.

Eine Kras^{G12D} induzierbare und stabile Expression auf mRNA- und Proteinebene konnte über diesen Zeitraum jedoch für das AP-1-Mitglied Fra1 beobachtet werden (Abb. 4-18A und B). Eine signifikante Anreicherung Fra1 relevanter Gene konnte zudem anhand der GSEA-Auswertung der mRNA-Expressionsprofile Vehikel- und 4-OHT behandelte PDCs ermittelt werden (Abb. 4-18C und D). Die Expression von Kras^{G12D} induziertem Fra1 scheint direkt an den kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg gekoppelt zu sein, da die Inhibierung von MEK neben der verminderten Phosphorylierung von ERK zu einer deutlichen Reduktion der Fra1-Expression führte (Abb. 4-18E).

4.4. Analyse des AP-1-Mitglieds Fra1 in der Karzinogenese des Pankreas

4.4.1. Die Aktivierung von onkogenem Kras^{G12D} im murinen Pankreas resultiert in einer erhöhten Fra1-Expression

Um die Ergebnisse des primären zellbasierten Modells auf die *in vivo* Situation zu übertragen, wurde die Fra1-Expression im murinen *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-PDAC-Modell analysiert. Im Pankreasgewebe dieser Mäuse wurde zunächst im Alter von 1, 3 und 6 Monaten die *Fra1*-mRNA-Expression ermittelt und den *Fra1*-Expressionsdaten von Wildtyp-Mäusen gleichen Alters gegenübergestellt (Abb. 4-19A). Hierbei zeigten beide Versuchsgruppen im Alter von 1 Monat zunächst ähnlich niedrige mRNA-Expressionsraten von *Fra1* (Abb. 4-19A). Im Alter von 3 und 6 Monaten konnte jedoch im Pankreasgewebe von Kras^{G12D} exprimierenden Mäusen ein deutlicher Anstieg der *Fra1*-mRNA-Expression festgestellt werden, die im Durchschnitt 4,5-fach (3 Monate) bzw. 4,4-fach (6 Monate) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöht war (Abb. 4-19A). Mittels immunhistochemischer Analysen wurde weiterhin die Proteinexpression von Fra1 und dessen Lokalisation im Pankreasgewebe von Kras^{G12D} exprimierenden und Wildtyp-Mäusen untersucht (Abb. 4-19B und C). Auch hier zeigten Wildtyp-Mäuse verschiedener Altersstufen eine eher schwache Proteinexpression von Fra1, die in nukleären Bereichen der Azini sowie teilweise im Interstitium des Pankreas detektiert werden konnten (Abb. 4-19B). In den Pankreata 1 Monat alter *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse ließ sich dagegen eine erhöhte Anzahl Fra1-positiver Stromazellen nachweisen, die in unmittelbarer Nähe von Azinär-duktalem Metaplasien (ADM) zu finden waren (Abb. 4-19C). In den Pankreasgeweben von 3 und 6 Monaten alten *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen, in denen hauptsächlich präneoplastische PanIN-1 und -2

Läsionen vorliegen, konnte eine kontinuierliche Zunahme Fra1 exprimierender Zellen beobachtet werden. Hierbei beschränkte sich die Fra1-Expression fast ausschließlich auf Areale mit ADMs und PanINs. Während die PanIN-Läsionen in der Regel Fra1-negativ waren, zeigte das sie umgebende Stroma eine starke Fra1-Expression. Weiterhin waren in den 3 Monate alten Tieren die *Kras*^{G12D} induzierten ADMs regelmäßig Fra1-positiv (Abb. 4-19C).

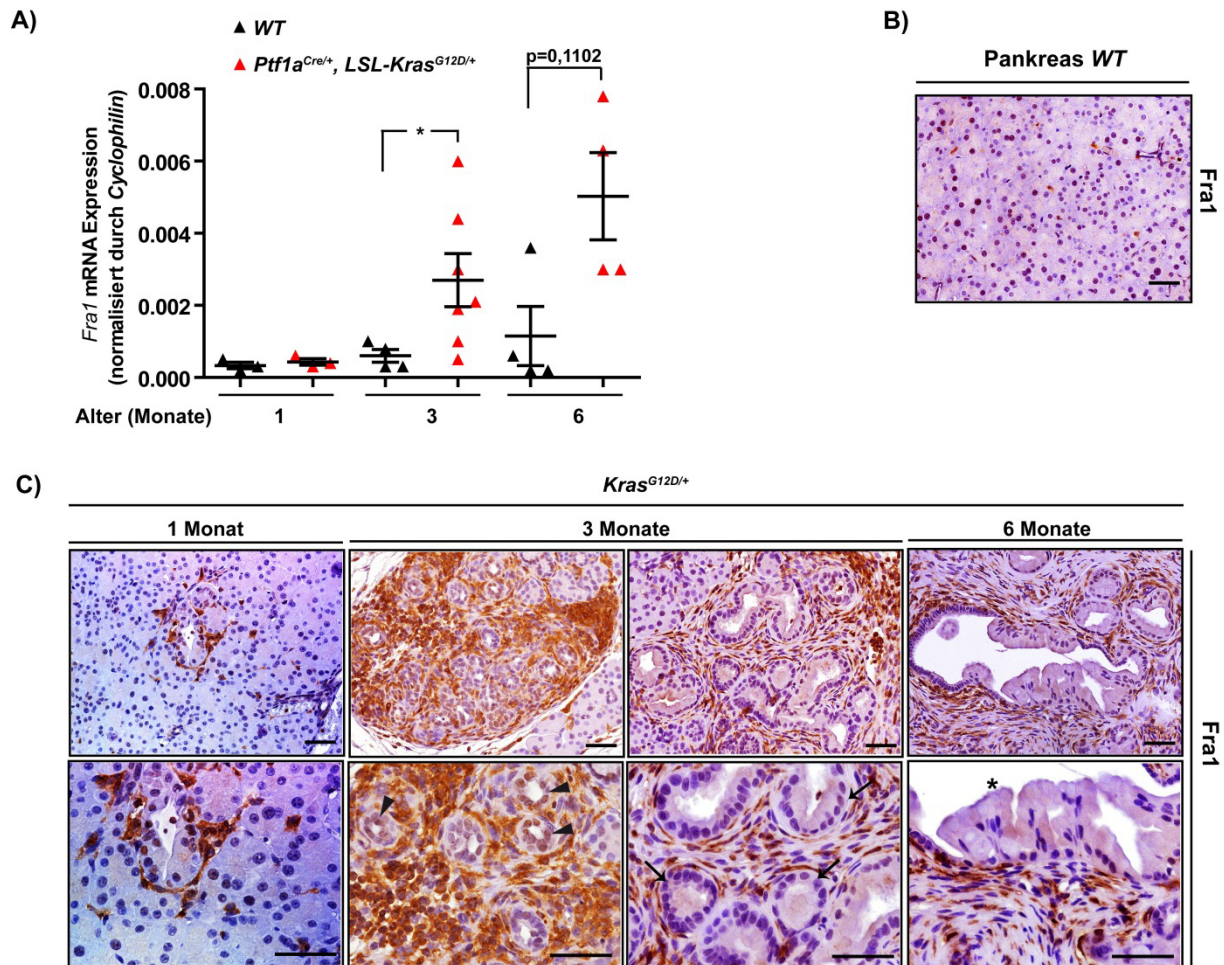


Abb. 4-19: Fra1-Expression im Pankreasgewebe von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen. **A)** Kontinuierlich ansteigende *Fra1*-mRNA-Expression im Pankreasgewebe von 1, 3 und 6 Monate alten *Kras*^{G12D/+}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp (*WT*)-Mäusen (n=4-7 pro Versuchsgruppe). Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels qPCR unter Verwendung einer Standardreihe und Normalisierung durch *Cyclophilin* (*p<0,05; *Mann-Whitney U*-Test). **B)** Die immunhistochemische Analyse von Fra1 im Pankreasgewebe von Wildtyp-Mäusen (*WT*) zeigt nur eine schwache Fra1-Expression auf. **C)** In den Pankreata von 1, 3 und 6 Monate alten *Kras*^{G12D/+}-Mäusen lässt sich immunhistochemisch eine erhöhte Fra1-Expression vor allem im Stroma nachweisen. Neben Fra1-positiven ADMs (mit Pfeilspitzen gekennzeichnet) zeigten PanIN-Läsionen in der Regel keine Fra1-Expression (PanIN-1A durch Pfeile und PanIN-1B durch Sterne gekennzeichnet); (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 µm).

Um einen Hinweis auf den Zelltyp im Stroma mit verstärkter Fra1-Expression im Pankreasgewebe von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen zu erhalten, erfolgte die immunhistochemische Analyse der α -Sma-Expression, die zur Identifizierung von aktivierten Fibroblasten und Stellatzellen dient. Anhand der Gegenüberstellung von Stromabereichen mit erhöhter Fra1-Expression und Arealen mit α -Sma-positiven Zellen ließ sich in seriellen

Schnitten zum Teil eine Überlappung der Expression beider Proteine nachweisen (Abb. 4-20). Daneben zeigten jedoch auch viele α -Sma-negative Stromabereiche eine starke Fra1-Proteinexpression, was darauf hinweist, dass auch in anderen Zelltypen des Stromas Fra1 exprimiert wird.

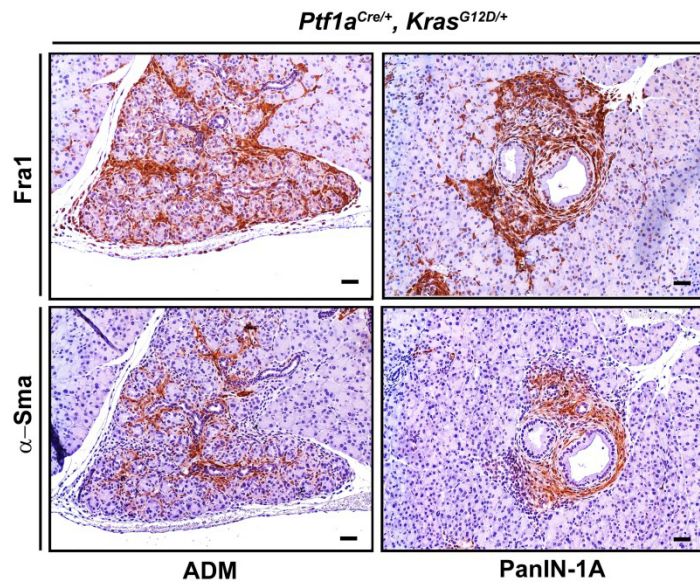


Abb. 4-20: α -Sma-Expression in Fra1-positiven Arealen des Pankreasgewebes von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen. Der immunhistochemische Nachweis von α -Sma zeigt in einigen ADM infiltrierenden (links) und PanIN-1A umgebenden (rechts) Bereichen eine korrelative Expression zu Fra1 (Maßstabsbalken entspricht 50 μ m).

Die Aktivierung von Stromazellen führt zur Freisetzung von Cytokinen und anderen Wachstumsfaktoren, welche die Tumorprogression fördern (Mueller & Fusenig, 2004). Um das Proliferationspotenzial Fra1-positiver Stromazellen zu ermitteln, wurden in seriellen Schnitten die Rate der BrdU-Inkorporation und die Expression von Fra1 bestimmt. Hier zeigte sich eine partielle Überlappung von Fra1-Expression und BrdU-Inkorporation in ADM infiltrierenden Stromazellen (Abb. 4-21).

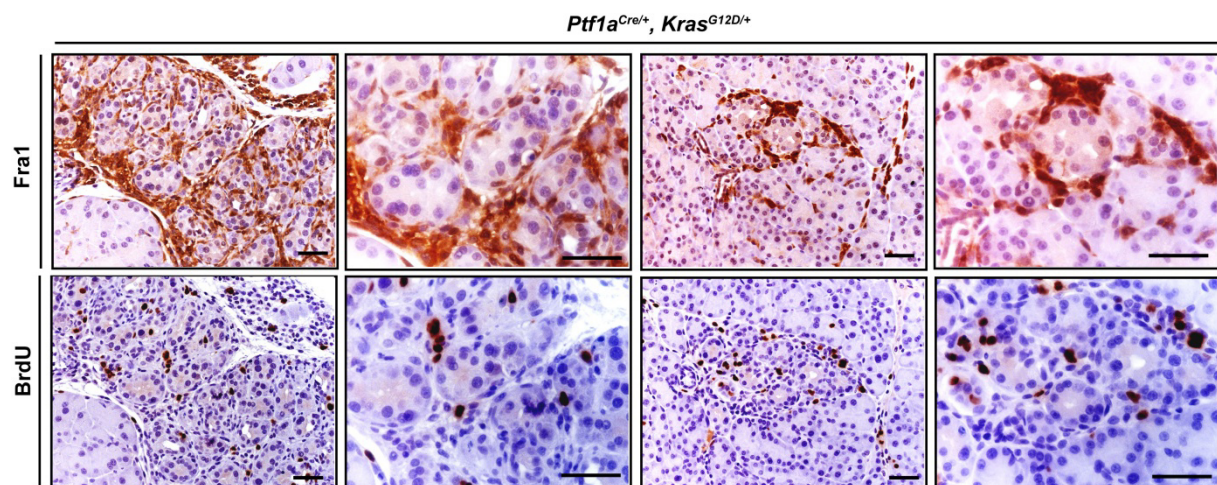


Abb. 4-21: Proliferationsrate in Fra1-positiven Arealen des Pankreasgewebes von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen. Immunhistochemischer Nachweis von BrdU-positiven Zellen in ADM infiltrierenden Bereichen mit erhöhter Fra1-Expression (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

4.5. Funktionale Analyse von Fra1 in der Tumoraufrechterhaltung

4.5.1. Fra1 wird im duktalem Adenokarzinom des Pankreas hoch exprimiert

Neben der Expressionsanalyse von Fra1 in der Karzinogenese des Pankreas wurde die Expression von Fra1 auch im Karzinom untersucht, um erste Hinweise auf eine Rolle von Fra1 in der Tumoraufrechterhaltung zu erhalten.

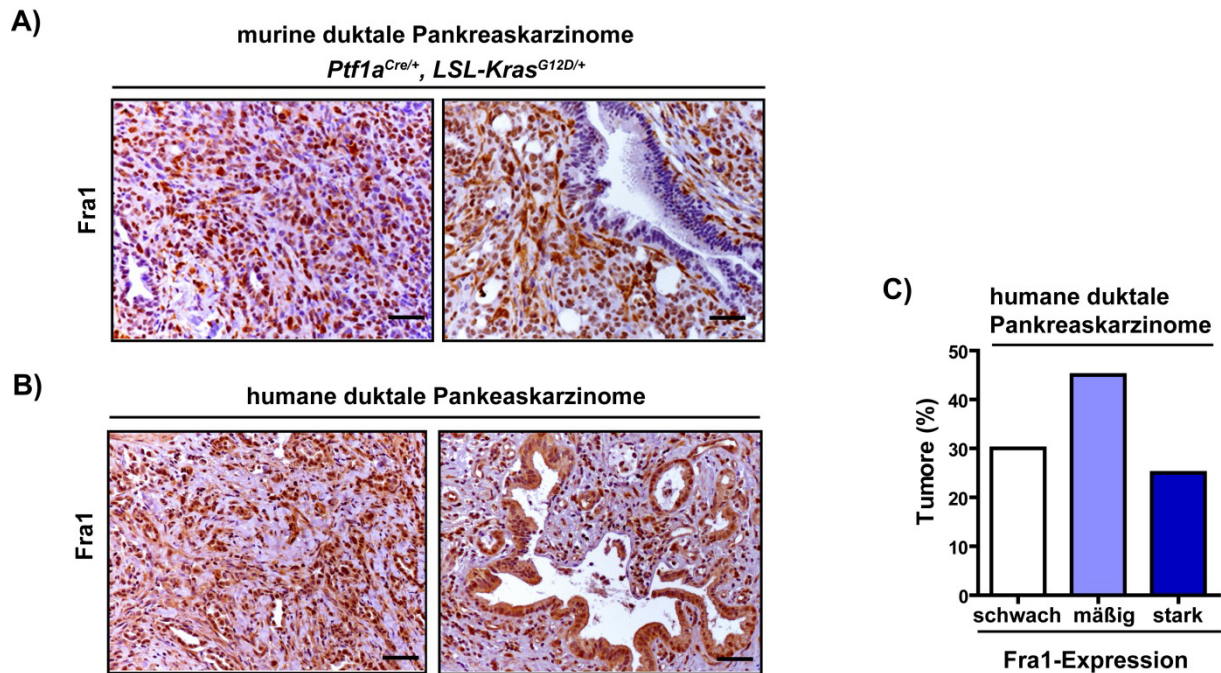


Abb. 4-22: Fra1-Expression im PDAC. **A)** Immunhistochemische Färbung von Fra1 im Gewebe muriner PDACs des angegebenen Genotyps. **B)** Immunhistochemischer Nachweis der Fra1-Expression im humanen PDAC (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 µm). **C)** Quantifizierung der Fra1-Expression in 20 humanen PDACs eines Gewebe-Arrays mit prozentualer Einteilung der Fra1-Färbung in schwach, mäßig und stark.

Hier konnte mittels immunhistochemischer Analysen in PDACs von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen eine starke Fra1-Expression in Tumor- und Stromazellen detektiert werden (Abb. 4-22A). Um erste Hinweise auf eine Relevanz von Fra1 in der humanen Erkrankung dieser Tumorart zu erhalten, wurde die Fra1-Expression in humanen PDACs immunhistochemisch untersucht (Abb. 4-22B). Hierbei zeigten 70% der 20 analysierten Tumorgewebe eine deutliche Fra1-Expression und 25% der Tumore wiesen eine stark erhöhte Expression von Fra1 auf (Abb. 4-22C), was auf eine relevante Funktion dieses Proteins im humanen Pankreaskarzinom hindeutet.

4.5.2. Fra1-Expressionsraten in verschiedenen duktalem Zelllinien des Pankreas

Um weitere Erkenntnisse über die Expression von Fra1 *in vitro* zu erhalten, wurden die Fra1-Expressionsraten in PDAC-Zelllinien aus *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit Fra1-Proteinmengen von primären duktalem Zellen aus 3 bis 7 Monate alten *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen und nicht induzierten PDCs (*LSL-Kras^{G12D/+}*) verglichen (Abb. 4-23A). Da

die Aktivierung von onkogenem $Kras^{G12D}$ bereits nach wenigen Wochen zur Ausbildung von PanIN-Läsionen führt, wurden primäre duktale Zellen aus $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen als PanIN-Zellen bezeichnet.

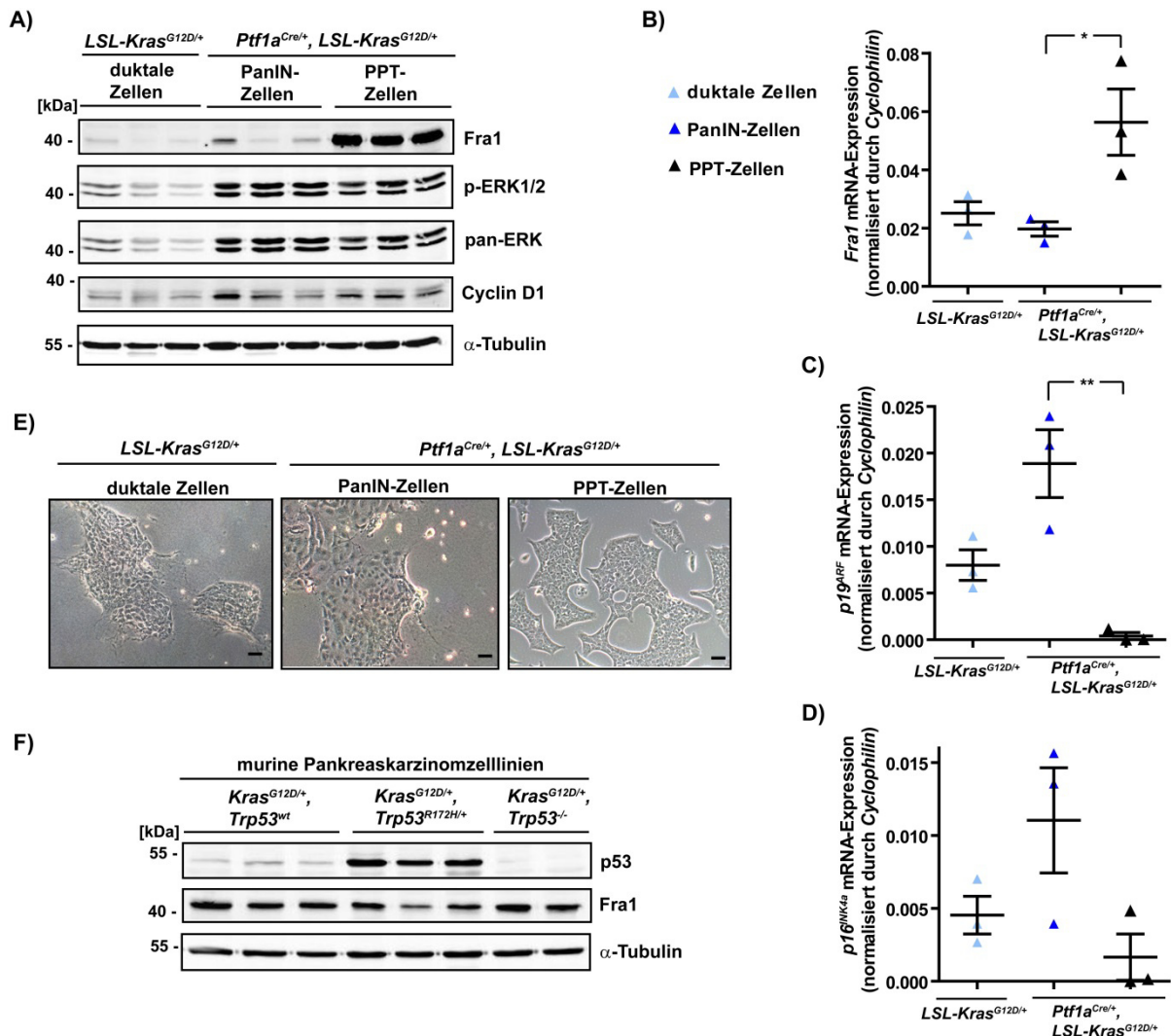


Abb. 4-23: Fra1-Expression in murinen PDCs, PanIN- und PDAC-Zellen. **A)** Western Blot-Analyse der Fra1-Expressionsraten in murinen PDAC-Zellen (PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025) im Vergleich zu PanIN-Zellen (PanIN-D239, PanIN-D382, PanIN-D758) und nicht induzierten primären PDCs (PDC-SDF54, PDC-SDF58, PDC-D482) der angezeigten Genotypen. Des Weiteren wurde die Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs anhand der Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen sowie die Proteinmengen von Cyclin D1 bestimmt. **B)** mRNA-Expressionsraten von *Fra1* (**B**), *p16^{INK4a}* (**C**) und *p19^{ARF}* (**D**) in primären PDCs, PanIN- und PDAC-Zellen der angezeigten Genotypen (n=3). Die Quantifizierung der Genexpressionsraten erfolgte mittels qPCR unter Verwendung von Standardreihen und Normalisierung durch *Cyclophilin* (*p<0,05; **p<0,01, Student's t-Test). **E)** Hellfeldmikroskopie primärer muriner PDCs, PanIN- und PDAC-Zellen der angezeigten Genotypen mit epithelialer Morphologie (Maßstabsbalken entspricht 50 µm). **F)** Western Blot der Proteinlysate von $Kras^{G12D/+}$ -Zelllinien mit unterschiedlichem *Trp53*-Status zur Analyse der Fra1-Expression (*Trp53^{wt}*: PPT-7662, PPT-8024, PPT-8025; *Trp53^{R172H/+}*: PPT-AA373, PPT-BK50, PPT-434; *Trp53^{-/-}*: PPT-6554, PPT-W22).

In den drei murinen PDAC-Zelllinien konnte in dieser Gegenüberstellung eine stark erhöhte Fra1-Proteinexpression detektiert werden, wogegen in nicht induzierten PDCs nahezu keine Fra1-Expression auf Proteinebene nachweisbar war (Abb. 4-23A). In den $Kras^{G12D}$ exprimierenden PanIN-Zellen ließ sich anhand des mit murinen PDAC-Zellen vergleichbaren Phosphorylierungsstatus von ERK die Induktion des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signal-

wegs nachweisen (Abb. 4-23A), jedoch konnten in diesen Zelllinien nur schwache Fra1-Proteinexpressionsraten festgestellt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den überwiegend Fra1-negativen PanIN-Läsionen 3 bis 6 Monate alter *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse (Abb. 4-19C). Die Gegenüberstellung der *Fra1*-mRNA-Expressionsraten von primären PDCs, PanIN- und PDAC-Zellen zeigte ein ähnliches Ergebnis. Für die murinen PDAC-Zelllinien konnte hier eine signifikant erhöhte (2,9-fach) *Fra1*-mRNA-Expression im Vergleich zu *Kras^{G12D}* induzierten PanIN-Zelllinien ermittelt werden (Abb. 4-23B). Um Hinweise auf den Grad der Transformation der drei PanIN-Zelllinien zu erhalten, wurden außerdem die mRNA-Expressionsraten der Tumorsuppressoren *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* analysiert, deren Inaktivierung eine wichtige Rolle für die Tumorprogression *Kras* induzierter Pankreaskarzinome spielt (Aguirre *et al.*, 2003; Bardeesy *et al.*, 2006). Im Vergleich zu den murinen PDAC-Zelllinien, in denen nahezu keine mRNA-Expression von *p19^{ARF}* mehr detektierbar war und nur eine dieser Zelllinien nachweislich *p16^{INK4a}* exprimiert, zeigten alle PanIN-Zelllinien eine deutliche mRNA-Expression beider Tumorsuppressoren (Abb. 4-23C und D). Unabhängig von der erhöhten Expression von *p16^{INK4a}* und *p19^{ARF}* zeigten diese nicht transformierten PanIN-Zellen, die analog zu primären PDCs auf Collagen kultiviert wurden (Abb. 4-23E), ein gutes Proliferationsverhalten und ähnliche Expressionsraten des Zellzyklusregulators Cyclin D1 wie murine PDAC-Zellen (Abb. 4-23A).

In *Kras^{G12D}* induzierten murinen PDAC-Zellen wurden weiterhin modulatorische Effekte einer Deletion des Tumorsuppressors *Trp53* oder der Expression eines *Trp53*-Allels mit einer *missense*-Mutation im Kodon 172 (*Trp53^{R172H}*) auf die *Fra1*-Expression untersucht. Hierbei konnte sowohl in Tumorzellen, die onkogenes *Trp53^{R172H}* exprimieren, als auch in *Trp53* defizienten Tumorzellen eine ähnlich starke Expression von *Fra1* nachgewiesen werden, wie in Tumorzellen mit einem *Trp53*-Wildtypstatus (Abb. 4-23F).

4.5.3. Die siRNA vermittelte Depletion von *Fra1* resultiert in einer verminderten Viabilität muriner Pankreaskarzinomzellen

Zur funktionalen Analyse von *Fra1* in der Tumoraufrechterhaltung wurde die RNA-Interferenz in PDAC-Zelllinien aus *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen angewandt. Die erfolgreiche siRNA vermittelte Herunterregulation von *Fra1* in murinen PDAC-Zellen wurde zunächst nach 48h sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene überprüft (Abb. 4-24A und B). Anhand von MTT-Assays konnte nach dieser Zeit eine signifikante Abnahme der Zellviabilität in *Fra1* depletierten PDAC-Zellen festgestellt werden (Abb. 4-24C). Im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen konnte hierbei eine Reduktion der Viabilität auf 67% und 64% für die Zelllinie PPT-7662 und auf 79% und 74% für die Zelllinie PPT-8024 nach Transfektion mit zwei *Fra1* spezifischen siRNAs festgestellt werden (Abb. 4-24C). Anhand der unveränderten Expression des Proliferationsmarkers PCNA und der Zellzyklusregulatoren Cyclin A und *p27^{Kip1}* nach siRNA vermittelter Depletion von *Fra1*, scheint die Abnahme der Zellviabilität jedoch nicht aus einer verminderten Zellproliferation zu resultieren (Abb. 4-24B).

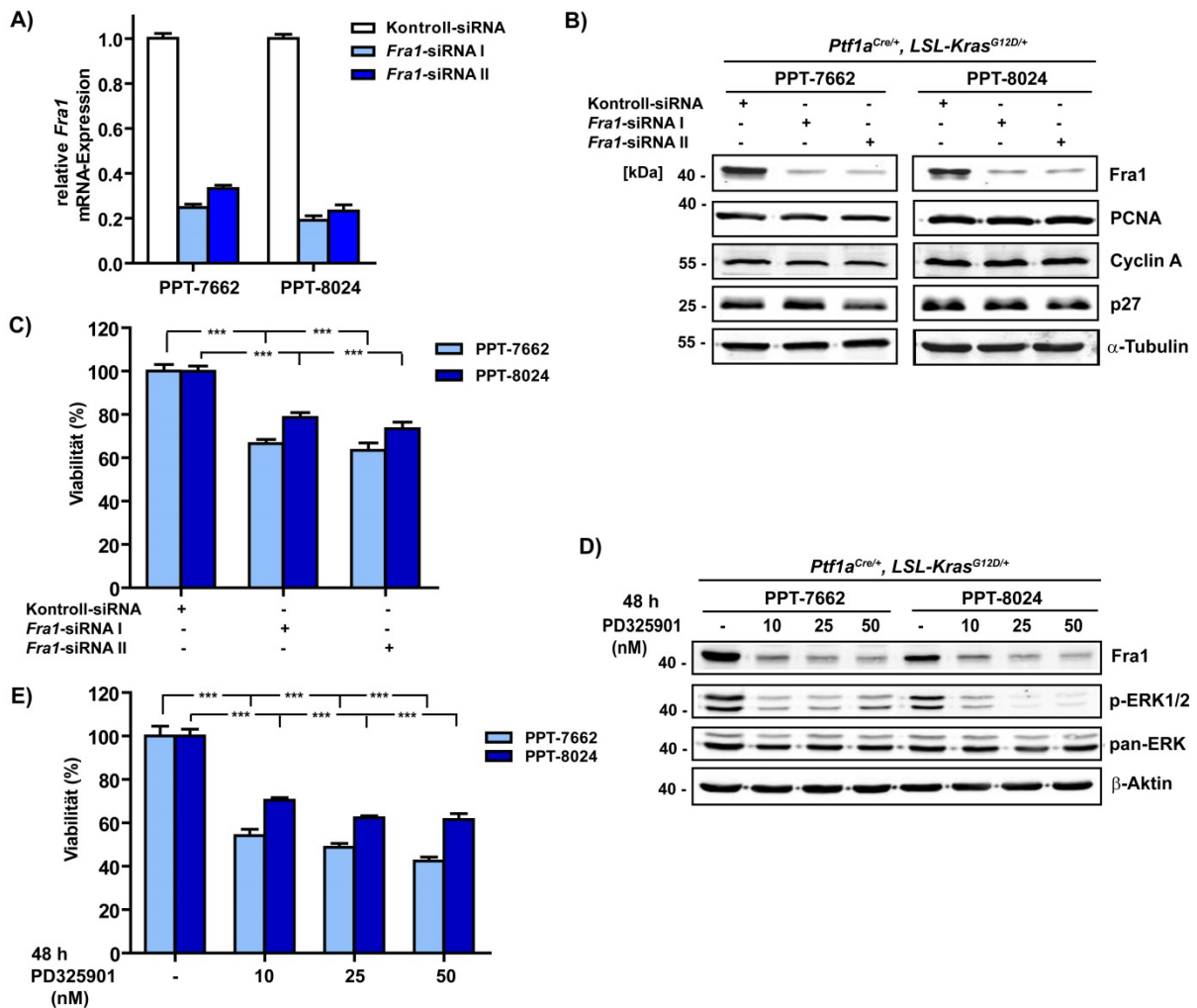


Abb. 4-24: *Fra1*-depletierte murine PDAC-Zellen weisen eine verminderte Zellviabilität auf. **A)** Relative *Fra1*-mRNA-Expression in den aus *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isolierten PDAC-Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 48h nach der Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qPCR ($\Delta\Delta$ CT-Methode). **B)** Western Blot-Analyse der *Fra1*-Expressionsraten in den murinen PDAC-Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 nach 48-stündiger Transfektion mit Kontroll-siRNA oder *Fra1*-spezifischen siRNAs. Weiterhin wurde die Expression der Proliferationsmarker PCNA, Cyclin A und p27^{Kip1} bestimmt. **C)** MTT-Assays der Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 nach 48-stündiger Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (***) $p < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). **D)** Western Blot-Analyse der *Fra1*-Expression nach MEK-Inhibierung. Die Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 wurden für 48h mit dem MEK-Inhibitor PD325901 in den Konzentrationen 10, 25 und 50 nM behandelt. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt. **E)** MTT-Assay der Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 nach 48-stündiger Behandlung mit PD325901 in den angegebenen Konzentrationen im Vergleich zu DMSO behandelten Kontrollzellen (***) $p < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni-Korrektur).

Analog zu primären PDCs (Abb. 4-18E) ließ sich auch für murine PDAC-Zellen eine Kopplung der *Fra1*-Expression an den kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg nachweisen, da auch hier die Inhibierung von MEK zu einer deutlichen Reduktion der *Fra1*-Expression führte (Abb. 4-24D). Neben reduzierten *Fra1*-Proteinmengen zeigten beide PDAC-Zelllinien 48h nach Inhibierung von MEK eine deutliche Reduktion der Zellviabilität, die in der Zelllinie PPT-7662 auf 54% bis 42% und in der Zelllinie PPT-8024 auf 70% bis 62% erniedrigt war im Vergleich zu Vehikel behandelten Kontrollzellen (Abb. 4-24E).

4.5.4. Die Verminderung von *Fra1* induziert in murinen Pankreaskarzinomzellen keine Apoptose

Um grundlegende Mechanismen der verminderten zellulären Viabilität nach siRNA vermittelter Depletion von *Fra1* in murinen PDAC-Zellen zu entschlüsseln, wurde eine mögliche Induktion von Apoptose in diesen Zellen analysiert. Hierzu wurden in zwei murinen PDAC-Zelllinien nach 24- und 48-stündiger Transfektion mit Kontroll- oder *Fra1* spezifischen siRNAs die Aktivitäten von Effektorcaspasen mittels Caspase 3/7-Assay bestimmt.

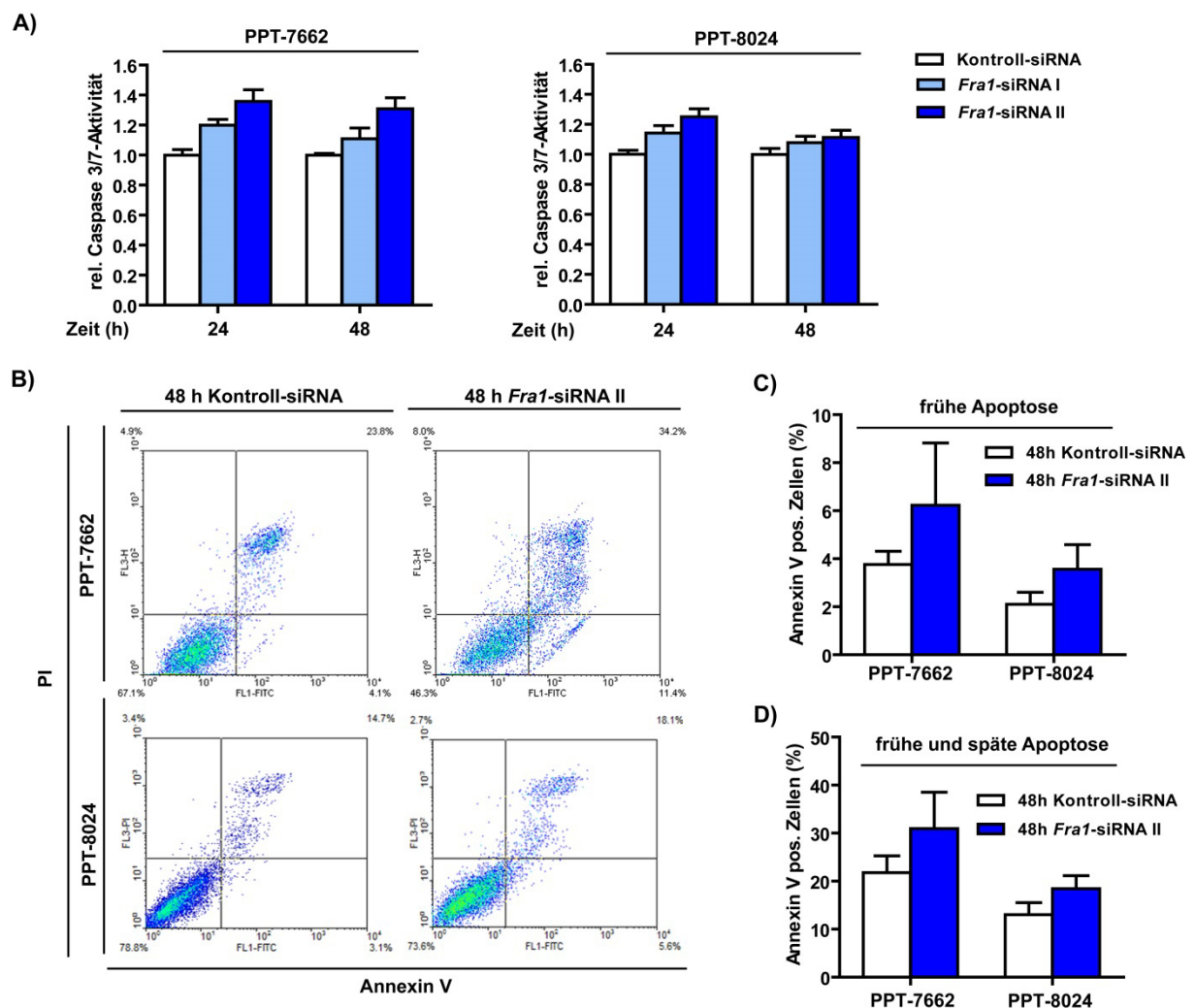


Abb. 4-25: Die Depletion von *Fra1* induziert keine Apoptose in murinen PDAC-Zellen. **A)** Relative Caspase 3/7-Aktivität der murinen PDAC-Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte mittels Caspase-Glo-3/7-Assay. **B)** FACS-Analyse der Annexin V positiven Zellen der Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 nach 48h Transfektion mit Kontroll-siRNA oder *Fra1*-siRNA II. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) und FITC gelabeltem Annexin V-Antikörper gefärbt. Repräsentative Darstellung der *Dotplot*-Graphen aus einem von drei Versuchen. **C)** und **D)** Prozentuale Anteile der Zellfraktionen der frühen (**C)**) (PI neg.; Annexin V pos.) und späten (**D)**) (PI pos.; Annexin V pos.) Apoptose der Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 nach 48-stündiger Transfektion mit *Fra1*-siRNA II im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (n=3).

Die Depletion von *Fra1* führte hierbei in beiden Zelllinien zu keiner deutlichen Aktivierung der Caspasen, was anhand der relativen Aktivitäten im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen erkennbar war (Abb. 4-25A). So ließen sich für beide Messzeitpunkte in Zellen mit verminderter *Fra1*-Expression nur 1,1- bis 1,4-fach höhere Enzymaktivitäten der Caspasen 3/7 ermitteln (Abb. 4-25A). Zur Verifizierung dieser Daten wurden die Zellen parallel nach 48-stündiger siRNA-Transfektion mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels FACS-Analyse quantifiziert. Auch hier zeigte sich nach verminderter *Fra1*-Expression keine signifikante Zunahme Annexin V-positiver Zellen (Abb. 4-25B bis D). Der prozentuale Anteil von Zellen, die sich in der frühen Apoptose befanden (Annexin V positiv; PI negativ), erhöhte sich nach siRNA vermittelter *Fra1*-Depletion lediglich von 3,8% auf 6,2% für die Zelllinie PPT-7662 und von 2,1% auf 3,6% für die Zelllinie PPT-8024 (Abb. 4-25C). Die Fraktion der Zellen aus früher und später Apoptose (Annexin V positiv; PI positiv) erhöhte sich nach Reduktion der *Fra1*-Expression durchschnittlich von 21,8% auf 30,9% (PPT-7662) und von 13% auf 18,4% (PPT-8024), so dass auch hier keine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen erkennbar war (Abb. 4-25D).

4.5.5. *Fra1* depletierte murine Pankreaskarzinomzellen zeigen eine Aktivierung pro-inflammatorischer genetischer Programme

Die Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren ist an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt, die in Prozessen der Tumorgenese, wie z.B. Proliferation, Überleben, zelluläre Motilität, Apoptose und Invasivität eine wichtige Rolle spielen (Eferl & Wagner, 2003; Verde *et al.*, 2007). Zur Identifizierung der durch *Fra1* modulierten Prozesse und der hierfür relevanten *Fra1*-Zielgene wurden *Gene Set Enrichment* Analysen (GSEA) der mRNA-Expressionsprofile von PDAC-Zellen aus *Ptf1a^{Cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen nach siRNA vermittelter Depletion von *Fra1* bzw. Transfektion mit Kontroll-siRNA erstellt. Hier zeigte sich nach Reduktion der *Fra1*-Expression eine deutliche Induktion des inflammatorischen Transkriptoms mit einer signifikanten Anreicherung der Expressionsraten verschiedener Cytokine und Interleukinrezeptoren (Abb. 4-26A und B). Die Verifizierung der Microarray-Daten erfolgte für ausgewählte Gene mittels quantitativer PCR (Abb. 4-26C). Im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten murinen PDAC-Zellen ließen sich in *Fra1* depletierten Zellen 3- bis 10-fach höhere Expressionsraten der CXC-Chemokin-Familienmitglieder *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL5* detektieren, während das CC-Chemokin *CCL20* sogar eine bis zu 23-fach erhöhte Genexpression erreichte. Die Cytokine IL6 und TNF α , die eine Schlüsselrolle in inflammatorischen Prozessen ausüben, wiesen nach verminderter *Fra1*-Expression 1,5- bis 4,4-fach (*IL6*) und 3,5- bis 16-fach (*TNF α*) erhöhte Expressionsraten auf. Die in *Fra1* depletierten murinen PDAC-Zellen angereicherten Interleukin-Rezeptorgene zeigten in der quantitativen PCR für *IL2RG* eine bis zu 8-fach und für *IL13RA2* eine bis zu 110-fach erhöhte mRNA-Expression (Abb.4-26C). Diese Daten lassen auf eine wichtige regulatorische Rolle von *Fra1* in inflammatorischen Prozessen in der Karzinogenese des Pankreas schließen.

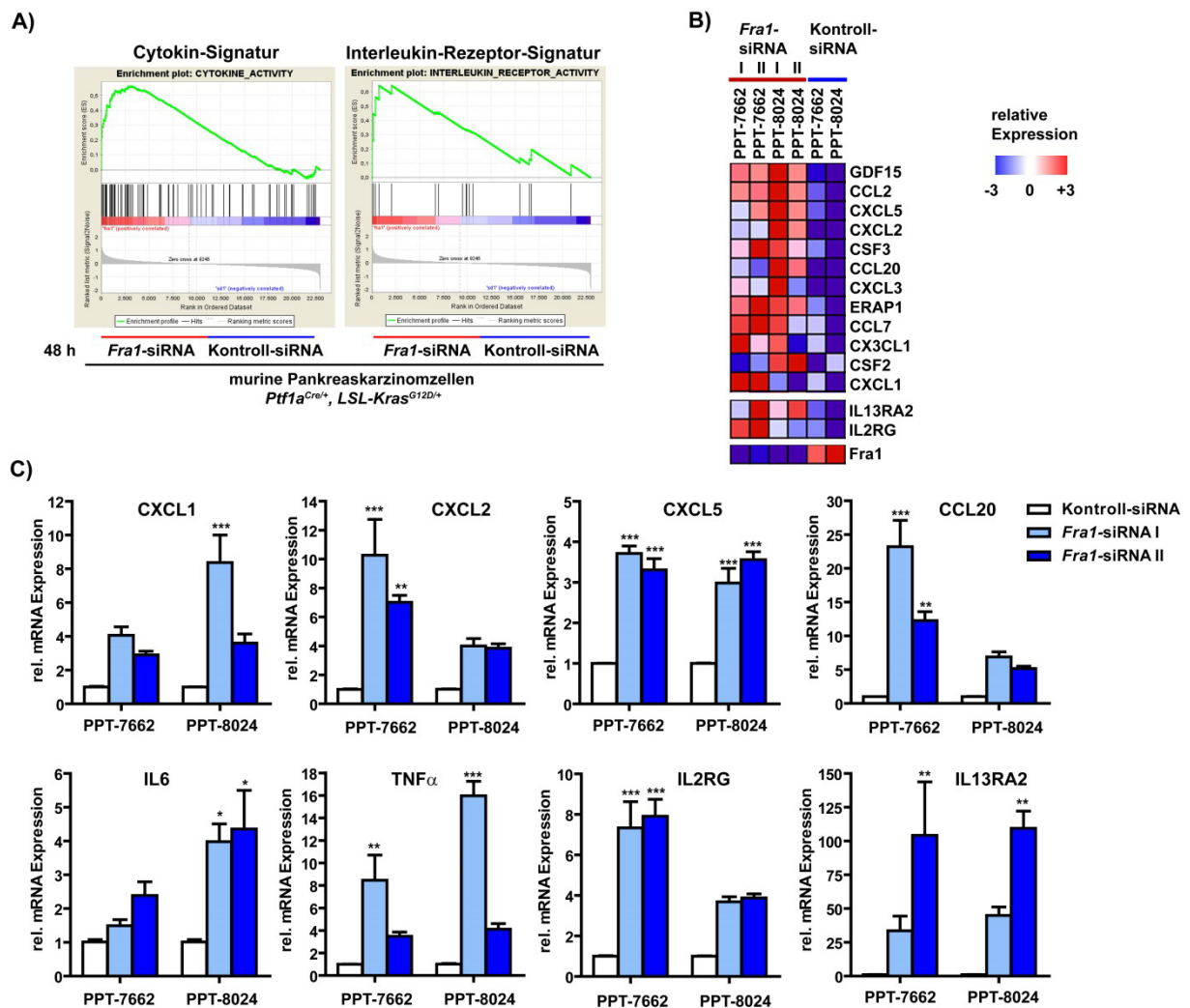


Abb. 4-26: Aktivierung des inflammatorischen Transkriptom in *Fra1*-depletierten murinen PDAC-Zellen. **A)** GSEA der mRNA-Expressionsprofile muriner PDAC-Zellen mit signifikanter Anreicherung von Cytokin- und Interleukinrezeptor-Genen nach 48-stündiger Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Für die GSEA wurde mRNA aus je zwei *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Zelllinien isoliert, die mit den entsprechenden siRNAs transfiziert wurden, und für Microarray-Analysen mit dem GeneChip mouse gene 1.0 ST aufbereitet. Signatur der Cytokin-Aktivität: NES: 2,390; FDR: $q < 0,001$; NOM: $p < 0,001$. Signatur der Interleukin-Rezeptor-Aktivität: NES: 1,920; FDR: $q = 0,047$; NOM: $p = 0,0026$. **B)** Ausschnitt der *Heat Map* mit hochregulierten Genen der unter **A)** gezeigten Signaturen nach siRNA vermittelter Depletion von *Fra1* in den murinen PDAC-Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024. **C)** Relative mRNA-Expression der Cytokine *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*, *CCL20*, *IL6*, *TNF α* und der Interleukinrezeptoren *IL2RG* und *IL13RA2* in den Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024 48h nach der Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qPCR ($\Delta\Delta$ CT-Methode); (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni-Korrektur).

Die erhöhte Freisetzung von Cytokinen resultiert außerdem in der Aktivierung verschiedener Effektoren, wie z.B. der NF κ B- und Stat3-Transkriptionsfaktoren, die das Wachstum und Überleben von Tumorzellen kontrollieren (Grivennikov *et al.*, 2010). Eine signifikante Induktion von Genen des NF κ B-Signalwegs konnte auch anhand der mRNA-Expressionsprofile muriner PDAC-Zellen nach Depletion von *Fra1* nachgewiesen werden (Abb. 4-27A und B).

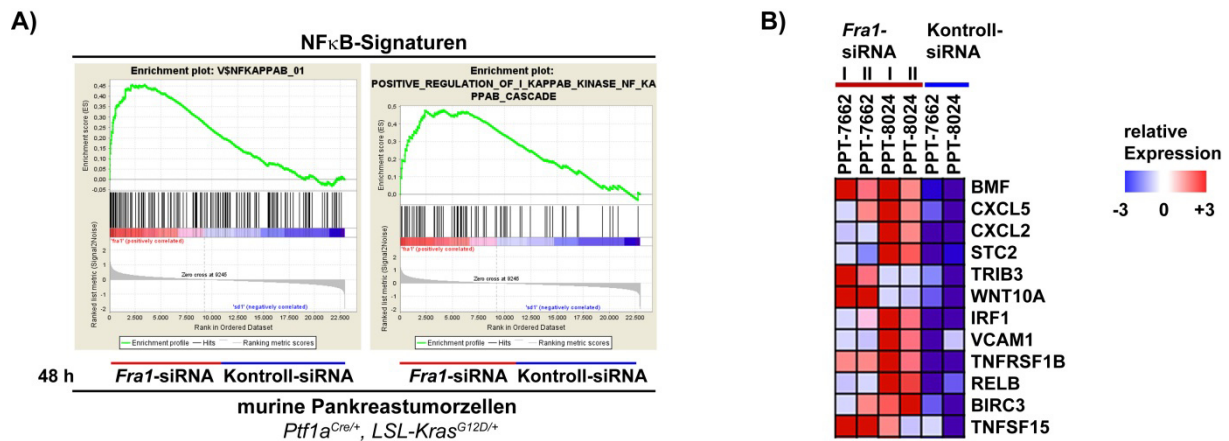


Abb. 4-27: Induktion von Genen des NFκB-Signalwegs in *Fra1*-depletierten murinen PDAC-Zellen. **A)** GSEA der mRNA-Expressionsprofile muriner PDAC-Zellen mit signifikanter Anreicherung von Genen des NFκB-Signalwegs nach 48-stündiger Transfektion mit *Fra1* spezifischen siRNAs im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (n=2 Zelllinien). NFκB-Signatur (links): NES: 2,135; FDR: $q < 0,001$; NOM: $p < 0,001$. NFκB-Signatur (rechts): NES: 1,990; FDR: $q = 0,026$; NOM: $p < 0,001$. **B)** Ausschnitt der *Heat Map* mit hochregulierten Genen der unter **A)** (links) gezeigten NFκB-Signatur nach siRNA vermittelter Depletion von *Fra1* in den murinen PDAC-Zelllinien PPT-7662 und PPT-8024.

4.5.6. Analyse der Expression von Cytokinen in *Kras^{G12D}* induzierten primären duktalem Pankreaszellen

Um weitere Hinweise auf die regulatorische Rolle von *Fra1* bezüglich der Expression inflammatorischer Gene im Pankreas zu erhalten, wurde die mRNA-Expression ausgewählter Cytokine in murinen primären PDCs nach Induktion von onkogenem *Kras^{G12D}* analysiert, da dies zu einem kontinuierlichen Anstieg der *Fra1*-Expression führte (Abb. 4-18A und B). Für das Chemokin *CXCL1* zeigte sich über den Verlauf von 7 Tagen keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression, während die Expressionsrate von *CXCL2* nach 3-tägiger *Kras^{G12D}*-Induktion zunächst auf das 0,6-fache reduziert war, jedoch nach 7 Tagen der Expression nicht induzierter Zellen entsprach (Abb. 4-28).

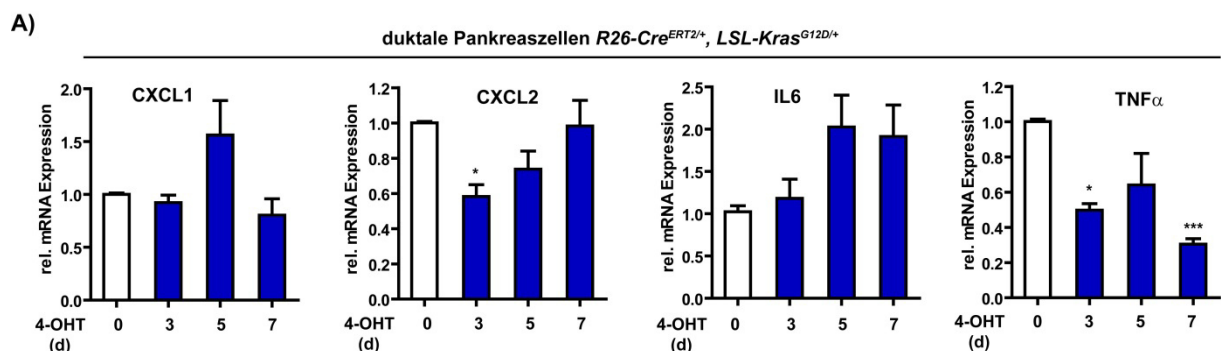


Abb. 4-28: Cytokin-Expression in primären PDCs nach Aktivierung von *Kras^{G12D}*. **A)** Relative mRNA-Expression der Cytokine *CXCL1*, *CXCL2*, *IL6* und *TNFα* in PDCs nach 3-, 5- und 7-tägiger Behandlung mit 4-OHT. Es wurden je drei Zelllinien des angegebenen Genotyps isoliert und mit EtOH bzw. 4-OHT behandelt. Die Analyse der mRNA erfolgte mittels qPCR ($\Delta\Delta C_T$ -Methode); (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni-Korrektur).

Das Cytokin IL6, das häufig durch Signalwege gesteuert wird, die durch Onkoproteine wie Ras aktiviert werden, wies in induzierten PDCs nach 5 und 7 Tagen eine 2-fach erhöhte mRNA-Expression auf (Abb. 4-28). Eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression nach $Kras^{G12D}$ -Induktion konnte dagegen für $TNF\alpha$ nachgewiesen werden, das durch seine aktivierende Funktion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B eine zentrale Rolle in Tumor fördernden Prozessen einnimmt (Grivennikov *et al.*, 2010). Hierbei zeigten murine PDCs bereits nach 3-tägiger Induktion von onkogenem $Kras^{G12D}$ eine deutliche Reduktion der $TNF\alpha$ -Expression um 50%, die nach 7 Tagen weiter auf die 0,3-fache Expression vermindert war im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (Abb. 4-28). Dies lässt auf eine inverse Korrelation der Expressionsraten von $Fra1$ und $TNF\alpha$ schließen, da in $Fra1$ depletierten murinen PDAC-Zellen eine bis zu 16-fach erhöhte Expression von $TNF\alpha$ detektiert werden konnte (Abb. 4-26C).

4.6. *In vivo* Analyse der Deletion von $Fra1$ in der $Kras^{G12D}$ induzierten Karzinogenese des Pankreas

Um die Funktion von $Fra1$ in der Karzinogenese des Pankreas auf genetischer Ebene zu entschlüsseln, wurde eine konditionale $Fra1$ -Knock-out-Mauslinie ($Fra1^{lox/lox}$; Eferl *et al.*, 2004) in das murine $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -PDAC-Modell gekreuzt. In $fra1^{lox}$ -Mäusen sind die Exons 3 und 4, die für die Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomänen des $Fra1$ -Proteins kodieren, durch $loxP$ -Elemente flankiert, an die sich 3' des zweiten $loxP$ -Elements ein GFP-Reportergen anschließt (Abb. 4-29A). Die spezifische Rekombination des $Fra1$ -Genlokus im Pankreasgewebe wurde mittels PCR nachgewiesen (Abb. 4-29B). Die Expression des GFP-Reportergens, das nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion an den verbleibenden N-terminalen Genabschnitt von $Fra1$ gesplitt wird, wurde zunächst in einer PanIN-Zelllinie überprüft, die aus einer 3 Monate alten $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $Fra1^{lox/lox}$ -Maus isoliert wurde (Abb. 4-29C). In dieser Zelllinie wurde außerdem unter Verwendung Exon spezifischer Primer die Deletion der von $loxP$ -Sequenzen flankierten Exons 3 und 4 des $Fra1$ -Lokus mittels quantitativer PCR überprüft, wobei die PanIN-Zelllinie einer 3 Monate alten $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Maus als Referenz diente (Abb. 4-29D). Neben der erfolgreichen Deletion der für die Funktionalität des $Fra1$ -Proteins benötigten Exons 3 und 4, konnte in den PanIN-Zellen der $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $Fra1^{lox/lox}$ -Maus im Vergleich zur Referenzzelllinie eine 25-fach erhöhte mRNA-Expressionsrate des $Fra1$ -Genlokus mit den für die Exons 1 und 2 spezifischen Primern detektiert werden (Abb. 4-29D).

Die pankreasspezifische Expression des GFP-Reportergens ließ sich auch mittels Fluoreszenzmikroskopie im gesamten Pankreasgewebe von $Ptf1a^{Cre/+}$, $Fra1^{lox/lox}$ -Mäusen bzw. in PanIN-Läsionen und azinären Bereichen von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $Fra1^{lox/lox}$ -Mäusen nachweisen, während die in diesem Modell zunehmenden desmoplastischen Bereiche um die PanIN-Läsionen GFP-negativ waren (Abb. 4-29E).

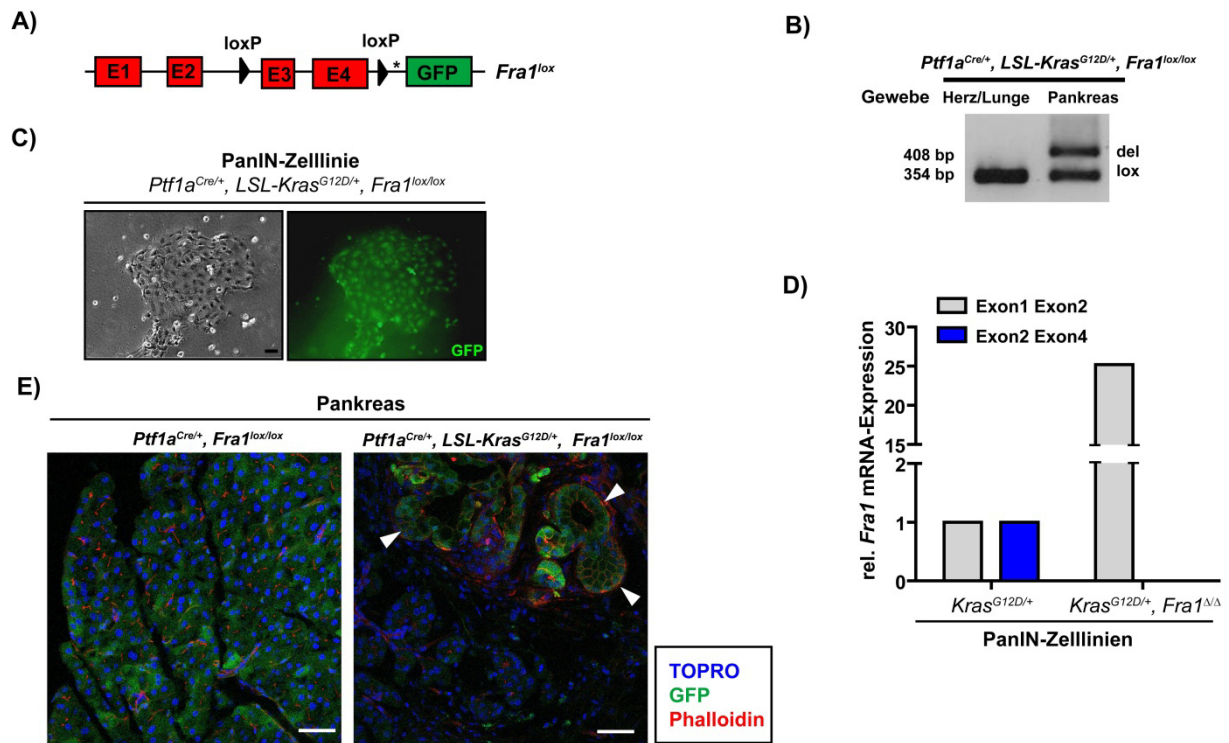


Abb. 4-29: Pankreasspezifische Inaktivierung von *Fra1* in vivo. **A)** Modell des *Fra1*-Genlokus der konditionalen *Fra1*-Knock-out-Mauslinie. Die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion der Exons 3 und 4 ermöglicht eine Inaktivierung von *Fra1* mit gleichzeitiger Aktivierung eines GFP-Reportergens. **B)** Nachweis der pankreas-spezifischen Rekombination des *Fra1*-Genlokus in *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mittels Genotypisierungs-PCR. **C)** Fluoreszenzmikroskopie einer PanIN-Zelllinie (PanIN-SDF182), die aus dem Pankreas einer *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, Fra1^{lox/lox}*-Maus isoliert wurde, mit Expression des GFP-Reportergens. **D)** Überprüfung der exonspezifischen Deletion des *Fra1*-Genlokus mittels qPCR ($\Delta\Delta C_T$ -Methode). Relative *Fra1*-mRNA-Expression duktaler Zellen aus dem *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, Fra1^{lox/lox}*-Mausmodell (PanIN-SDF182) im Vergleich zu Kontrollzellen aus dem *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell (PanIN-SDF218). **E)** Fluoreszenzmikroskopie der *Ptf1a^{Cre}* induzierten Expression des GFP-Reportergens (grün) im gesamten Pankreas von *Ptf1a^{Cre/+}, Fra1^{lox/lox}*-Mäusen (links) bzw. in PanIN-Läsionen (durch Pfeile gekennzeichnet) und azinären Bereichen von *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, Fra1^{lox/lox}*-Mäusen (rechts). Gegenfärbung der Nuklei mit TO-PRO-3 (blau) und des Aktinfilaments mit Phalloidin (rot); (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m).

Zur Untersuchung *Kras^{G12D}* unabhängiger Effekte einer *Fra1*-Deletion im Pankreas *in vivo* wurden zunächst die Pankreasgewebe von 3 Monate alten *Ptf1a^{Cre/+}, Fra1^{lox/lox}*-Mäusen histologisch analysiert. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu Pankreata von Wildtyp-Mäusen gleichen Alters keine morphologischen Auffälligkeiten (Abb. 4-30A), was auf eine untergeordnete funktionale Rolle von *Fra1* in der Pankreasentwicklung schließen lässt. Im *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell führte die Deletion von *Fra1* im Pankreas 3 Monate alter Mäuse ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich für *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse kein Gendosis abhängiger Effekt der *Fra1*-Expression auf das prozentuale Pankreasgewicht erkennen (Abb. 4-30B). Die histologische Analyse der Pankreata von 3 Monate alten *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}, Fra1^{lox/lox}*-Mäusen ergab ein ähnliches Entwicklungsmuster der prämaligen Vorläuferläsionen mit vorwiegend niedrig gradigen Läsionen (Abb. 4-30C und D). In diesem frühen Stadium der *Kras^{G12D}* induzierten Tumorgenese des Pankreas ist somit kein Einfluss der *Fra1*-Expression im Pankreasepithel auf die PanIN-Progression erkennbar.

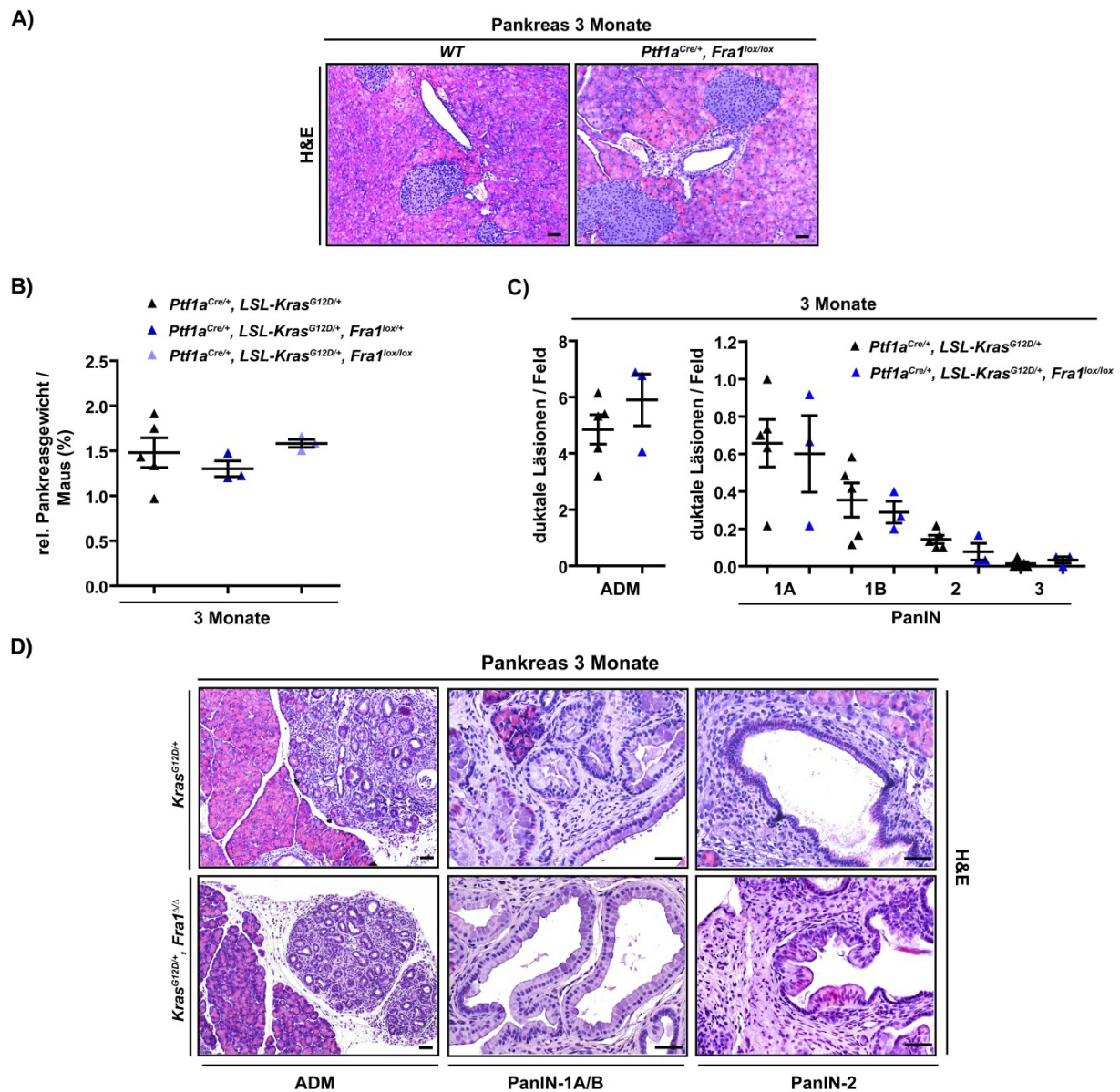


Abb. 4-30: Funktionale Analyse der Deletion von *Fra1* in der frühen Karzinogenese des Pankreas im *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mausmodell. A) H&E-Färbung von Paraffinschnitten des Pankreas 3 Monate alter *Ptf1a*^{Cre/+}, *Fra1*^{lox/lox}-Mäuse mit vergleichbarer Morphologie zu Wildtyp (*WT*)-Mäusen. **B)** Prozentuale Pankreasgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht von 3 Monate alten Mäusen der angezeigten Genotypen ($n=3-4$ pro Gruppe). **C)** Anzahl duktales Läsionen (ADM und PanIN) pro Gesichtsfeld (200-fache Vergrößerung) im Pankreas 3 Monate alter *Kras*^{G12D/+} ($n=5$) und *Kras*^{G12D/+}, *Fra1*^{ΔΔ}-Mäuse ($n=3$). Es wurden pro Maus jeweils 20 Gesichtsfelder von drei Paraffinschnitten des Pankreasgewebes ausgezählt. **D)** Die H&E-Färbung von Paraffinschnitten des Pankreas 3 Monate alter *Kras*^{G12D/+}- und *Kras*^{G12D/+}, *Fra1*^{ΔΔ}-Mäuse zeigt ein ähnliches Progressionsmuster prämaligener Vorläuferläsionen (ADM und PanIN-1 bis -2); (Alle Maßstabsbalken entsprechen 50 μm).

5. Diskussion

In den letzten Jahren wurden für das PDAC zahlreiche transgene Mausmodelle generiert, die wichtige Schritte der Tumorgenese über die Entstehung prämaligener PanIN-Läsionen bis zur Entwicklung metastasierender Karzinome analog zur humanen Erkrankung widerspiegeln (Hingorani *et al.*, 2003, 2005). Obwohl diese *in vivo* Modelle eindrucksvoll die Tumorentstehung durch aktivierende *Kras*-Mutationen demonstrieren, die in mehr als 90% der humanen PDACs auftreten (Jones *et al.*, 2008), sind die Signalwege von onkogenem *Kras* und dessen genetische Programme noch unzureichend verstanden. Aufgrund der Komplexität der *in vivo* Modelle wurde daher in dieser Arbeit ein zelluläres *ex vivo* Modellsystem etabliert und validiert.

5.1. Etablierung eines Tamoxifen induzierbaren primären Zellsystems des Pankreas zur Studie der Signaltransduktion von onkogenem *Kras*

Murine *in vivo* PDAC-Modelle haben bereits bedeutende Erkenntnisse über die Relevanz funktionaler genetischer Veränderungen und Signalwege für die Initiation, Progression und Aufrechterhaltung des PDACs erbracht (Aguirre *et al.*, 2003; Hingorani *et al.*, 2003, 2005; Bardeesy *et al.*, 2006; Mazur & Siveke, 2012; Eser *et al.*, 2013). Zu den Nachteilen dieser *in vivo* Modelle zählen jedoch ihre Heterogenität und Komplexität, die die Entschlüsselung genereller Mechanismen oft erschweren bzw. intensive Analysen über einen längeren Zeitraum erfordern. Die Untersuchung dynamischer Veränderungen ist in *in vivo* Modellen limitiert, da die Endpunktanalysen auf einen bestimmten Zeitpunkt festgelegt sind. Zudem ist die Generierung von Mausmodellen in der Regel von zeitintensiven Verkreuzungen und erhöhten Kosten geprägt. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von Surrogatmodellen, die optimal die pathologischen Veränderungen der *in vivo* Situation widerspiegeln sollten.

Das in dieser Studie etablierte zelluläre *ex vivo* Modellsystem ermöglicht mit Hilfe der Tamoxifen (4-OHT) induzierbaren Aktivität der *R26-Cre^{ERT2}*-Rekombinase eine einfache und effektive Aktivierung oder Inaktivierung von *loxP*-flankierten Genen im Kontext der onkogenen *Kras^{G12D}*-Signaltransduktion in primären duktalem Zellen des murinen Pankreas (PDCs).

Da eine hohe Cre-Rekombinase-Expression mit einer zellulären Toxizität aufgrund vermehrter Strangspaltungen der DNA einhergehen kann (Heidmann & Lehner, 2001; Takebayashi *et al.*, 2008), sind Cre-abhängige Effekte auf die Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen. Daher wurde im etablierten Modell die *Cre^{ERT2}*-Rekombinase heterozygot vom ubiquitären *Rosa26*-Promotor (Ventura *et al.*, 2007), einem in vielen Geweben schwachen Promotor, aus exprimiert. Die Expressionslevel der *Cre^{ERT2}*-Rekombinase waren hierbei ausreichend, um die untersuchten *loxP*-flankierten Genabschnitte mit beschriebenen 4-OHT-Konzentrationen im nanomolaren Bereich (Feil *et al.*, 1997) zu rekombinieren. Zytotoxische Effekte waren nach Aktivierung der Cre-Rekombinase nicht zu erkennen. Während die Tamoxifenbehandlung von kultivierten Nierengewebe aus *R26-Cre^{ERT2}*-Mäusen bereits nach 48h mit einer Konzentration von 500 nM eine 100%ige Rekombination des *LacZ*-Reportergens erreichte (Jokela & Vainio, 2007), zeigten primäre PDCs aus *R26-Cre^{ERT2}/R26^{mT/mG}*-Mäusen zu diesem Zeitpunkt jedoch erst eine 40%ige Rekombination des

mT/mG-Reportergergenlokus. Dies weist auf eine Abhängigkeit der Rekombinationseffizienz vom Zelltyp, dem modifizierten Genlokus oder der unterschiedlichen Aktivitäten des *R26*-Promotors in verschiedenen Geweben hin. Trotzdem ließ sich in dem hier etablierten zellulären Modellsystem nach 8 Tagen in über 90% der primären Zellen eine Rekombination nachweisen. Die Aktivierung der *R26-Cre^{ERT2}*-Rekombinase führte zudem zu einer effizienten Expression von onkogenem *Kras^{G12D}* und einer Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs.

Im Gegensatz zum eher statischen murinen *in vivo* Modell der Pankreaskarzinogenese, in dem die Relevanz genetischer Veränderungen anhand molekularbiologischer Analysen im Pankreasgewebe auf einen definierten Zeitpunkt beschränkt ist, ermöglicht das *ex vivo* Zellsystem reproduzierbare Analysen grundlegender Mechanismen über einen dynamischen Zeitraum in einem weniger komplexen, syngenen Kontext.

Die Relevanz dieses *ex vivo* Zellsystems für die Tumorgenese des Pankreas konnte durch kombinierte Inaktivierung weiterer Tumorsuppressorgene (*LSL-Trp53^{R172H}* und *Cdkn2a^{lox}*) in *Kras^{G12D}* induzierten PDCs demonstriert werden. Neben *KRAS* gehören Mutationen in diesen beiden Tumorsuppressorgenen zu den am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen im humanen PDAC (Jones *et al.*, 2008; Biankin *et al.*, 2012). *p16^{Ink4a}* ist der am häufigsten inaktivierte Tumorsuppressor in PDACs mit einem Funktionsverlust in bis zu 95% dieser Tumore, der durch Mutation, Deletion oder Promotormethylierung stattfinden kann (Hezel *et al.*, 2006; Delpu *et al.*, 2011). Der Tumorsuppressor *TP53* ist in mehr als 50% der humanen PDACs mutiert, bei denen es sich um sogenannte *missense*-Mutationen der DNA-Bindungsdomäne handelt (Rozenblum *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2008). Diese Mutationen treten in hochgradigen PanIN-Läsionen auf und gehen mit dem Verlust des verbleibenden Wildtyp-Allels einher (*loss of heterozygosity*, LOH) (Luttges *et al.*, 2001). Der Funktionsverlust dieser Tumorsuppressoren zählt zu den Schlüsselereignissen in der durch onkogenes *Kras* induzierten Karzinogenese des Pankreas, was bereits im etablierten murinen *Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}*-PDAC-Modell demonstriert wurde. In diesem *in vivo* Modell resultiert sowohl die Deletion beider *Cdkn2a*-Allele als auch die Expression eines *Trp53*-Allels mit einer *missense*-Mutation im Kodon 172 (*Trp53^{R172H}*) in der dramatisch beschleunigten Entwicklung invasiver und metastasierender PDACs (Aguirre *et al.*, 2003; Hingorani *et al.*, 2005). Entsprechend führte auch die Inaktivierung von *Cdkn2a* und *p53* in dem in dieser Arbeit etablierten zellulären Modell zur Transformation und Ausbildung duktaler Pankreaskarzinome nach orthotoper Implantation in immundefiziente NSG-Mäuse. Im Gegensatz hierzu war die alleinige Aktivierung von *Kras^{G12D}* insuffizient für die Transformation dieser primären Zellen. Dies ist übereinstimmend zu Daten die zeigen, dass duktale Zellen aus *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen mit intaktem *Trp53*- und *Cdkn2a*-Genlokus keine Karzinome in *SCID*-Mäusen bilden (Tzatsos *et al.*, 2013). Erst die shRNA vermittelte Inaktivierung von *Trp53* in PDCs aus 9 Wochen alten *Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen resultierte in der Bildung von invasiven PDACs (Corcoran *et al.*, 2011). Zusammen zeigen diese Daten, dass PDCs potentielle Vorläuferzellen des Pankreaskarzinoms enthalten, und dass es in diesen Zellen zur humanen Erkrankung analoge genetische Veränderungen zur Ausbildung invasiver PDACs bedarf. Somit stellt das in dieser Arbeit etablierte Modellsystem eine neue Plattform für unvoreingenommene genetische Screening-

Experimente, für funktionelle Validierungen humaner Daten und für die Identifikation relevanter Faktoren in der Signaltransduktion von onkogenem Kras dar.

5.2. Die duktale Pankreazelle – eine potentielle Ursprungszelle des PDAC?

Zur Identifizierung der sogenannten Ursprungszelle des PDAC wurden zahlreiche Mausmodelle generiert, in denen die Expression von onkogenem Kras unter verschiedenen Promotoren erfolgte. Die Cre-Rekombinase vermittelte *Kras*^{G12D}-Expression unter dem *Pdx1*- oder *Ptf1a/p48*-Promotor induziert das Onkogen in den gemeinsamen Vorläuferzellen aller Pankreazelltypen und führt zur Ausbildung von PanIN-Läsionen, die im Verlauf der Tumorgenese alle drei Stadien der humanen Vorläuferläsionen reflektieren und sich zu invasiven und metastasierenden PDACs entwickeln können (Hingorani *et al.*, 2003). Für die spezifische Expression von mutiertem Kras in zentroazinären Zellen wurde der Nestin-Promotor verwendet, unter dem die Expression von onkogenem Kras ebenfalls zur Entwicklung von PanIN-Läsionen und invasiven Pankreaskarzinomen führte (Carriere *et al.*, 2007). Die spezifische Kras-Aktivierung in azinären Zellen erfolgte mit dem Elastase-Promotor, was zur Ausbildung von präinvasiven pankreatischen Läsionen mit duktalem Phänotyp führte (Grippo *et al.*, 2003). Die Induktion von onkogenem Kras^{G12V} in reifen duktalem Zellen unter dem Cytokeratin 19 (CK19)-Promotor resultierte dagegen weder in der Entwicklung von PanIN-Läsionen noch in Pankreaskarzinomen (Brembeck *et al.*, 2003), was gegen einen von duktalem Zellen ausgehenden Ursprung des PDAC spricht. In einer ähnlichen Studie resultierte die Tamoxifen induzierte Aktivierung von onkogenem Kras in adulten *CK19*^{CreER}, *LSL-Kras*^{G12D}-Mäusen in der Ausbildung vereinzelter muzinöser Metaplasien, die morphologische und molekulare Merkmale früher PanINs aufwiesen (Ray *et al.*, 2011).

Im Pankreas *Kras*^{G12D} exprimierender Mäuse repräsentieren ADMs die potentiellen Vorläufer der PanIN-Entwicklung (Zhu *et al.*, 2007). Charakteristika von ADMs sind die Umwandlung azinärer Zellen in Zellen, die duktale Markergene wie *CK19* und Progenitormarkergene wie *Sox9* exprimieren (Morris *et al.*, 2010; Kopp *et al.*, 2012). Die Fragestellung, ob PanINs aus azinär abgeleiteten *Sox9* exprimierenden duktaktigen Zellen oder aus duktalem-/zentroazinären Zellen hervorgehen, die *Sox9* unter normalen Bedingungen exprimieren, wurde in einer Studie mit Tamoxifen induzierbaren *Ptf1a*^{CreER}, *LSL-Kras*^{G12D}- bzw. *Sox9*^{CreER}, *LSL-Kras*^{G12D}-Mäusen analysiert (Kopp *et al.*, 2012). Hierbei zeigte sich, dass onkogenes Kras zu einer raschen Induktion von prä malignen Läsionen aus adulten azinären Zellen des Pankreas führt, jedoch nicht aus duktalem- oder zentroazinären Zellen. In diesem Zusammenhang konnte auch für *Sox9* eine essentielle Funktion für die Kras induzierte prä maligne Reprogrammierung azinärer Zellen demonstriert werden (Kopp *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zu diesen Daten weisen die in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten primären murinen PDCs die Expression von duktalem Markergenen wie *CK7/19* und *Carboanhydrase 2* auf, was auf die Möglichkeit eines duktalem Ursprungs der sich in diesem Modell entwickelten PDACs hinweist. Jedoch werden von den PDCs auch bipotente Progenitormarkergene wie *Pdx1*, *Hes1*, *Hnf1b* und *Sox9* exprimiert. Im adulten Pankreas ist die *Sox9*-Expression in einer Subpopulation des duktalem Epithels aufrechterhalten, was auf

einen fakultativen Pool von duktalem Progenitorzellen hinweist (Pan & Wright, 2011). Am blinden Ende des pankreatischen Hauptganges konnten Zellen identifiziert werden, die Gene wie *Pdx1*, *Shh* und *Hes1* exprimieren, die nicht in normalen kubischen duktalem Zellen exprimiert werden, und die an der Formation pankreatischer intraepithelialer Neoplasien nach chronischer Epithelverletzung beteiligt waren (Strobel *et al.*, 2010; Cleveland *et al.*, 2012). Duktalem Progenitorzellen könnten somit als indirekte oder direkte Vorläuferzellen an der Entstehung von PanIN-Läsionen beteiligt sein (Reichert & Rustgi, 2011), aus denen sich PDACs entwickeln können. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass in dem in dieser Arbeit etablierten zellulären Modell eine Zellpopulation enthalten ist, charakterisiert durch die Expression von Progenitormarkergenen, die suszeptibel gegenüber einer $Kras^{G12D}$ -abhängigen malignen Transformation ist.

5.3. Relevanz des Tumorsuppressors $p27^{Kip1}$ in der Karzinogenese $Kras^{G12D}$ induzierter muriner Pankreaskarzinome

Die Deregulation von Kontrollmechanismen des Zellzyklus spielt eine wichtige Rolle im Prozess der malignen Transformation. Sie wird häufig gesteuert durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, welche die Proliferation und die von aktivierten Proto-Onkogenen induzierten Wachstumssignale unterdrücken (Hanahan & Weinberg, 2000). Der ursprünglich durch seine Bindung an Cyclin/CDK2-Komplexe identifizierte CKI $p27^{Kip1}$ nimmt hierbei sowohl in normalen als auch in neoplastischen Zellen eine zentrale Funktion in der Regulation des Zellzyklusübergangs von der G_1 - in die S-Phase ein, deren Deregulation in einem unkontrollierten Zellwachstum resultieren kann (DeSal *et al.*, 1996; Sherr, 1996). Die Expression von onkogenem Ras induzierte die G_1/S -Phasen-Transition in Fibroblasten von Nagern und resultierte in einer Reduktion der $p27^{Kip1}$ -Synthese und dessen Halbwertszeit (Kawada *et al.*, 1997; Takuwa & Takuwa, 1997). Entsprechend zeigte sich in dieser Arbeit eine reduzierte $p27^{Kip1}$ -Proteinexpression in $Kras^{G12D}$ induzierten primären PDCs, die mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert war. Um die Wertigkeit der in den PDCs beobachteten, durch onkogenes $Kras^{G12D}$ induzierten verminderten Expression von $p27^{Kip1}$ *in vivo* zu validieren, wurden $p27^{Kip1}$ -Knock-out-Mäuse verwendet (Fero *et al.*, 1996).

Die Entwicklung multipler Organhyperplasien und Tumore der Hirnanhangsdrüse in $p27^{Kip1}$ defizienten Mäusen verdeutlichen die tumorsuppressorische Rolle von $p27^{Kip1}$ *in vivo* (Fero *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Der Verlust von $p27^{Kip1}$ fördert zudem in diesen Mäusen die Ausbildung spontaner und durch Karzinogene oder Bestrahlung induzierter Tumore, wobei bereits die Deletion eines $p27^{Kip1}$ -Allels mit einer Akzeleration der Tumorentwicklung assoziiert ist (Fero *et al.*, 1996, 1998). In der $Kras^{G12D}$ induzierten Karzinogenese des murinen Pankreas konnte $p27^{Kip1}$ in dieser Arbeit ebenfalls als haploinsuffizienter Tumorsuppressor charakterisiert werden, was mit einer verkürzten Überlebenszeit und einer tendenziell erhöhten Metastasierungsrate von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen assoziiert war (Diersch *et al.*, 2013). Der CKI $p27^{Kip1}$ fungiert als Tumorsuppressor durch seine Fähigkeit, die Zellproliferation zu blockieren (Sherr & Roberts, 1999). Eine Korrelation zwischen der $p27^{Kip1}$ -Expression und der Zellproliferation konnte in Studien an humanen Tumoren der Lunge, des Hals-Kopf-Bereichs, des Kolorektums und des Ovars nach-

gewiesen werden (Chu *et al.*, 2008). In murinen Kras induzierten Lungentumoren ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und dem p27^{Kip1}-Status feststellen (Timmerbeul *et al.*, 2006). Auch im murinen Kras^{G12D} induzierten PDAC konnten weder in Tumorgeweben noch in isolierten primären PDAC-Zellen Effekte der verminderten p27^{Kip1}-Expression auf das Proliferationsverhalten der Zellen beobachtet werden, was auf einen von der Proliferationsblockade unabhängigen tumorsuppressiven p27^{Kip1}-Effekt in dieser Tumorentität hinweist. Proliferationsunabhängige tumorsuppressive Funktionen von p27^{Kip1} konnten bereits in anderen Studien gezeigt werden. So führte eine siRNA vermittelte Reduktion der p27^{Kip1}-Expression in murinen HCC-Zellen (Hepa1-6) zu keiner erhöhten Proliferation (Guo *et al.*, 2013). Guo und Kollegen demonstrierten jedoch in ihrer Studie, dass der Verlust von p27^{Kip1} die Karzinogen induzierte Entstehung und Progression von HCC durch eine Erhöhung inflammatorischer Cytokine und eine verstärkte Aktivierung des STAT3-Signalwegs in Tumorzellen und infiltrierenden inflammatorischen Zellen fördert. Da sowohl inflammatorische Cytokine als auch STAT3 die Tumorentstehung im Pankreas fördern (Corcoran *et al.*, 2011), könnte ein solcher p27^{Kip1} modulierter Mechanismus auch im PDAC eine Rolle spielen. Der Nachweis einer regulatorischen Rolle von p27^{Kip1} in der Induktion von Cytokinen und des STAT3-Signalwegs im PDAC bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Deletion beider p27^{Kip1}-Allele führte in dem in dieser Arbeit analysierten Mausmodell zu einer massiven Vergrößerung des Pankreas, die in der Beeinträchtigung der angrenzenden Organe bzw. einem Ileus resultierte, was die Überlebenszeit dieser Tiere dramatisch verkürzte. Die Pankreata von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, p27^{-/-}-Mäusen wiesen jedoch nur prämaligne, niedrig gradige PanIN-Läsionen mit desmoplastischen Reaktionen auf, während die Entwicklung eines PDAC ausblieb. Dabei ließ sich im Vergleich zu *Kras*^{G12D/+}-Mäusen mit p27^{Kip1}-Wildtypstatus in p27^{Kip1} defizienten Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an PanIN-1A-Läsionen detektieren, die mit einer signifikanten Reduktion von ADMs einherging. Aufgrund der Blockade der Karzinogenese in *Kras*^{G12D/+}, p27^{-/-}-Mäusen im Stadium der PanIN-1A-Läsionen, liegt die Vermutung nahe, dass p27^{Kip1} eine essentielle Funktion in der PDAC-Entwicklung ausübt. Ähnliche Beobachtungen wurden in murinen Tumormodellen der Brust und der Prostata beschrieben, in denen die Deletion nur eines p27^{Kip1}-Allels eine akzelerierte Karzinogenese bewirkte, während die Onkogen vermittelte Tumorphysion in der vollständigen Abwesenheit von p27^{Kip1} beeinträchtigt war (Muraoka *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004). Dies verdeutlicht einerseits den Tumorevolutionsvorteil einer erhöhten Cyclin/CDK-Aktivität durch verminderte p27^{Kip1}-Expressionslevel, weist aber zum anderen auf tumorrelevante Funktionen von p27^{Kip1} hin. Als Ursache für die stärkere Resistenz von p27^{Kip1} defizienten Brustepithelzellen gegenüber einer malignen Transformation konnte in diesem Zusammenhang eine eingeschränkte Cyclin D1/CDK4-Funktion nachgewiesen werden (Muraoka *et al.*, 2001). Cyclin D1 wird in der Brustdrüse für die Neu- oder Ras-induzierte Entwicklung von Brusttumoren benötigt (Yu *et al.*, 2001). Die Stabilität von Cyclin D1 ist in Abwesenheit von p27^{Kip1} reduziert (Cheng *et al.*, 1999), was bereits anhand reduzierter CDK4-assoziiierter und totaler Proteinmengen von Cyclin D1 in p21^{Cip1}/p27^{Kip1} defizienten MEFs (Doppel-Knock-out) nachgewiesen wurde, in denen eine ektopische Expression von p27^{Kip1} zur Stabilisierung von Cyclin D1 und dessen CDK4-Komplexen führte

(Sugimoto *et al.*, 2002). Entsprechend dieser Befunde zeigten die in dieser Arbeit analysierten $Kras^{G12D}$ induzierten $p27^{Kip1}$ defizienten murinen Pankreastumorzellen ebenfalls deutlich reduzierte Cyclin D1-Proteinmengen. Für Cyclin D1 wurde eine verstärkte Expression in mehr als 60% der PDACs und in 27% der PanIN-2- bzw. 57% der PanIN-3-Läsionen als intermediären Schritt in der Tumorprogression demonstriert (Gansauge *et al.*, 1997; Maitra *et al.*, 2003). Eine verminderte Cyclin D1-Expression könnte somit zur blockierten Tumorprogression in $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$, $p27^{-/-}$ -Mäusen beitragen. Die im Vergleich zu $p27^{Kip1}$ heterozygoten PDAC-Zellen deutlich erhöhte Expression von $p21^{Cip1}$ in $p27^{Kip1}$ defizienten Tumorzellen deutet auf einen kompensatorischen Effekt hin, der womöglich dazu dient, eine Restaktivität der Cyclin D1/CDK4-Komplexe aufrecht zu erhalten. Zudem wurde für $p21^{Cip1}$ eine die Seneszenz induzierende Funktion im murinen PDAC-Modell beschrieben (Morton *et al.*, 2010), so dass auch dieser Mechanismus zur Blockade der Karzinogenese in niedrig gradigen PanIN-Läsionen im $p27^{Kip1}$ defizienten Modell beitragen könnte.

Entgegengesetzte Funktionen von $p27^{Kip1}$ in der Tumorgenese – Tumorpromotor oder Tumorsuppressor – sind nicht nur vom Expressionsniveau abhängig, sondern stehen in Abhängigkeit seiner zellulären Lokalisation. So fungiert $p27^{Kip1}$ im Zytoplasma als Modulator der RhoA-Aktivität (Besson *et al.*, 2004b). Hierbei resultiert die Bindung von $p27^{Kip1}$ an RhoA in einem Stabilitätsverlust des Aktinzytoskeletts, was zu einer erhöhten Zellmotilität führt, einer Voraussetzung für invasives Wachstum und Metastasierung (Larrea *et al.*, 2009). Auch in Brustkrebszellen wird durch die $p27^{Kip1}$ vermittelte Inhibition der RhoA-Aktivität Motilität induziert (Wu *et al.*, 2006) und in hepatozellulären Karzinomzellen führte die Regulation der GTPase Rac durch zytoplasmatisches $p27^{Kip1}$ zu einer erhöhten Zellmotilität (McAllister *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Effekt wurde in Melanomzellen nachgewiesen, die nach der Überexpression einer $p27^{Kip1}$ -Mutante mit Lokalisation im Zytoplasma eine erhöhte Metastasierungsrate zeigten (Denicourt *et al.*, 2007). Murine PDAC-Zellen zeigten in dieser Arbeit auch eine vorwiegend zytoplasmatisch ausgeprägte Lokalisation von $p27^{Kip1}$. Die Beobachtung, dass RhoA aktivierte Gene in $p27^{Kip1}$ defizienten Zellen akkumulierten, deutet darauf hin, dass auch in PDAC-Zellen RhoA von zytoplasmatischem $p27^{Kip1}$ kontrolliert wird. Die Modulation der RhoA-Aktivität könnte somit auch PDAC-Zellen ein erhöhtes Migrationspotential verleihen, was die Metastasierung dieser Zellen in andere Organe begünstigt. Im murinen $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -PDAC-Modell ließ sich zudem ein Anstieg der Metastasierungsrate in $p27^{Kip1}$ heterozygoten Mäusen feststellen, für dessen Erklärung es jedoch weiterer Studien bedarf. Die Assoziation einer reduzierten $p27^{Kip1}$ -Expression mit der Entwicklung von Metastasen wurde bereits in anderen Tumoren, wie z.B. dem kolorektalen Adenokarzinom, beobachtet (Thomas *et al.*, 1998).

Neben einer Modulation des Metastasierungspotentials konnte für $p27^{Kip1}$ in einigen Studien eine Funktion in der Aufrechterhaltung von Progenitor- oder Stammzellen nachgewiesen werden (Fero *et al.*, 1996; Besson *et al.*, 2007). In einem $Kras$ gesteuerten Mausmodell für Lungentumore zeigten Mäuse mit einem $p27^{CK-}$ knock in, in denen $p27^{Kip1}$ keine Cyclin/CDK-Komplexe binden und inhibieren kann, sowohl eine erhöhte Tumoranzahl als auch eine höhere Aggressivität der Tumore im Vergleich zu $p27^{-/-}$ -Mäusen, was die pro-onkogenen Funktionen von $p27^{Kip1}$ demonstriert (Serres *et al.*, 2011). Die erhöhte Tumorgenese in der

Lunge assoziierte in diesem Modell zudem mit einer zytoplasmatischen Lokalisation von p27^{CK-} und der p27-abhängigen Aufrechterhaltung eines Stammzellpools (Besson *et al.*, 2007). Inwieweit ein p27^{Kip1} kontrollierter Stammzellpool zur Karzinogenese im Pankreas beiträgt und ob diese Funktion von p27^{Kip1} für die Blockade der Karzinogenese in PanIN-1A-Läsionen verantwortlich ist, bedarf weiterer genetischer Untersuchungen.

Für p27^{Kip1} wurde weiterhin eine relevante Funktion in der Regulation von Apoptose und Autophagie nachgewiesen. Liang und Kollegen demonstrierten in Brustkrebszelllinien (MCF-7), dass die *liver kinase B1* (LKB1)-*AMP-activated protein kinase* (AMPK)-Signalweg abhängige Phosphorylierung von p27^{Kip1} an T198 zu einer Stabilisierung von p27^{Kip1} führt, die es den Zellen erlaubt, unter Nährstoffdefiziten und metabolischem Stress durch Autophagie zu überleben, während die Depletion von p27^{Kip1} zur Apoptose der Zellen führte (Liang *et al.*, 2007). Die durch Phosphorylierung von p27^{Kip1} an Ser10 induzierte zytoplasmatische Translokation ermöglicht ebenfalls eine regulatorische Funktion von p27^{Kip1} in apoptotischen Prozessen (Kajihara *et al.*, 2010). Die Tumorumgebung, die besonders im PDAC als komplexes Stroma ausgebildet ist, hat häufig eine schlechte Blutzufuhr mit reduzierter Sauerstoffversorgung und Nährstoffzufuhr zur Folge. Daher könnte das Überleben von PDAC-Zellen abhängig von p27^{Kip1} sein, um ihre Viabilität durch Autophagie unter hypoxischen Bedingungen aufrechtzuerhalten (Liang *et al.*, 2007). Aufgrund der stark ausgeprägten Desmoplasien in Pankreagewebe von *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen, in denen die Tumorumgebung blockiert war, könnte dieser fehlende Schutzmechanismus relevant sein.

5.4. p27^{Kip1} – ein essentieller Tumorsuppressor im Epithel des Gallengangs

Die Deletion von p27^{Kip1} im *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mausmodell verdeutlichte die essentielle Funktion dieses Tumorsuppressors im extrahepatischen Gallengang (DHC). Marsh und Kollegen demonstrierten in einer aktuellen Studie, dass die alleinige Aktivierung von Kras im murinen Gallengangssystem insuffizient für die maligne Transformation ist (Marsh *et al.*, 2013). Diese Daten korrelieren mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, in der die Aktivierung von Kras^{G12D} im Gallengangsepithel nur zur Entwicklung vereinzelter niedrig gradiger Präneoplasien (BillNs) führte. Die Deletion von p27^{Kip1} akzelerierte diesen Phänotyp in einer Gendosis abhängigen Weise. So führte eine verminderte Expression von p27^{Kip1} in *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen zur Entwicklung hochgradiger BillNs im DHC und zu einer drastisch verkürzten Überlebenszeit der Tiere. In *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen zeigten sich bereits nach 3 Monaten invasive Gallengangskarzinome. Dies zeigt, dass im Gegensatz zum Pankreas, p27^{Kip1} im Gallengang eine überwiegend tumorsuppressive Funktion ausübt. Die Wertigkeit dieser tumorsuppressiven Funktion von p27^{Kip1} im Gallengangsepithel zeigt sich hierbei auch in einem Vergleich mit dem potenten Tumorsuppressor p53. Im Gegensatz zu *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen entwickeln *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *LSL-Trp53*^{R172H/+}-Mäuse nur sporadisch Hyperplasien und Papillomatosen des Gallengangs (Hingorani *et al.*, 2005). Die molekularen Determinanten der Gewebe- und Zellabhängigkeit der p27^{Kip1}-Funktion sind noch weitgehend unbekannt. Interessanterweise zeigte sich in p27^{Kip1} defizienten Pankreastumorzellen eine tendenziell erhöhte Aktivierung

des PI3K/AKT-Signalwegs, was auch durch das Vorhandensein von AKT regulierten Gensignaturen in diesen Zellen unterstützt wurde. Publierte Daten zeigen, dass die kombinierte Kras-Aktivierung mit einer Deletion von *PTEN*, einem Negativregulator des PI3K/AKT-Signalwegs, zu einer raschen Transformation des murinen biliären Epithels und der Entwicklung von Karzinomen führen (Marsh *et al.*, 2013). Postuliert man eine inhibitorische Wirkung von p27^{Kip1} auf den PI3K-Signalweg im Gallengangsepithel, so könnte dies eine Erklärung für die Entwicklung von Karzinomen im DHC von *Pdx1-Cre*, *LSL-Kras*^{G12D/+}, *p27*^{-/-}-Mäusen sein. Um den Einfluss des PI3K-Signalwegs auf die Karzinogenese des DHC auf genetischer Ebene zu zeigen, wurde dieser im Gallengangsepithel aktiviert. Die Expression einer onkogenen Mutante der katalytischen PI3K-Untereinheit (*PIK3CA*^{H1047R}) im Gallengangsepithel führte in *Pdx1-Cre*, *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}-Mäusen (Eser *et al.*, 2013) zur Entwicklung von Gallengangskarzinomen. Auch in diesem Modell ließ sich die Karzinogenese des DHC durch eine verminderte Expression von p27^{Kip1} akzelerieren, was zusätzlich die exponierte tumorsuppressive Funktion von p27^{Kip1} im Gallengangsepithel zeigt. Passend zu diesen genetischen Daten der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine deutlich verminderte Expression von p27^{Kip1} im humanen extrahepatischen Gallengangskarzinom (Jarnagin *et al.*, 2006). p27^{Kip1} wurde in diesen humanen Karzinomen als unabhängiger Parameter für eine schlechte Prognose identifiziert, was zusammen mit den hier erarbeiteten Daten auf die essentielle tumorsuppressive Funktion von p27^{Kip1} im Karzinom des DHC hinweist. Damit würde sich gerade in dieser Tumorentität eine die p27^{Kip1}-Expression wiederherstellende Therapiestrategie anbieten.

5.5. Das AP-1-Mitglied Fra1 als potentielle therapeutische Zielstruktur im PDAC

Da die klinische Entwicklung von Ras-Inhibitoren bisher erfolglos blieb, wurden zahlreiche Inhibitoren der nachgeschalteten Effektorinasen dieses Signalwegs entworfen. Der Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg zeichnet sich jedoch durch eine intrinsische Komplexität sowie durch Rückkopplungsschleifen und Interaktionen mit anderen Signalkaskaden, wie dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg aus, was für eine mögliche Resistenzentwicklung bedeutend ist (Mendoza *et al.*, 2011).

Das in dieser Arbeit etablierte primäre *ex vivo* Zellsystem sollte auch dazu dienen, potentielle Ras gekoppelte therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Expressionsprofile *Kras*^{G12D} induzierter primärer muriner PDCs zeigten hierbei eine signifikante Aktivierung des zur AP-1-Familie gehörenden Transkriptionsfaktors Fra1. Unter den mehr als 2000 Transkriptionsfaktoren, die vom humanen Genom kodiert werden, ist nur ein limitierter Satz an Transkriptionsfaktoren in humanen Tumoren verstärkt aktiviert (Darnell, 2002). Diese meist onkogenen Transkriptionsfaktoren könnten als direkte Zielstrukturen in der Tumorthherapie dienen, da deren erhöhte Aktivität für das Überleben, das uneingeschränkte Wachstum und das Metastasierungsverhalten von Karzinomen essentiell ist.

Eine verstärkte AP-1-Aktivität kann in zahlreichen Tumorentitäten verzeichnet werden, deren Ursache in einer erhöhten Aktivierung der MAPK-Signalwege sowie in einer verstärkten Expression bzw. Stabilität der AP-1-Proteine liegt (Eferl & Wagner, 2003). AP-1-Mutationen oder Deletionen wurden dagegen in humanen Tumoren nicht detektiert (Vogt, 2002).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass AP-1-Mitglieder in die zelluläre Proliferation, Transformation und den Zelltod involviert sind, wobei für Fra1 eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung bekannt ist (Wisdom & Verma, 1993; Shaulian & Karin, 2002; Belguise *et al.*, 2005). So konnte für Fra1 eine regulatorische Funktion in der Motilität und Invasion von Mesotheliom- und Hirntumorzellen sowie von Mamma-, Lungen- und Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden (Belguise *et al.*, 2005; Debinski & Gibo, 2005; Adisheshaiah *et al.*, 2007; Ramos-Nino *et al.*, 2007; Andreolas *et al.*, 2008). In humanen PDAC-Zelllinien wurde von Shin und Kollegen eine hohe basale AP-1-Aktivität festgestellt. In diesem Zusammenhang ließ sich für das AP-1-Mitglied c-Jun eine essentielle Rolle für die Zellproliferation nachweisen (Shin *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine erhöhte Fra1-Expression in *Kras*^{G12D} induzierten murinen PDAC-Zellen und -Geweben detektiert werden, die auch in PDAC-Zellen mit einer homozygoten Deletion des *Trp53*-Gens bzw. mit einer Koexpression eines mutierten *Trp53*^{R172H}-Allels stabil nachweisbar war. Dies lässt auf eine wichtige Funktion von Fra1 in der Tumoraufrechterhaltung des PDAC schließen. Anhand einer deutlichen Fra1-Expression in 70% der in dieser Arbeit analysierten humanen PDAC-Gewebe, kann auch in der humanen Erkrankung von einer relevanten Funktion des Fra1-Proteins für die Tumoraufrechterhaltung ausgegangen werden. Aufgrund der verstärkten Fra1-Expression in metastasierenden humanen Mammakarzinomen untersuchten Desmet und Kollegen die prognostische Relevanz Fra1 kontrollierter genetischer Programme in Metastasen des Mammakarzinoms, um potentielle Fra1 abhängige Zielstrukturen zu identifizieren (Desmet *et al.*, 2013). In dieser Studie konnte anhand metastatischer Tumorzellsysteme die essentielle Rolle von Fra1 für die Entwicklung von Metastasen *in vivo* demonstriert werden. Des Weiteren konnte für Antagonisten des Adenosinrezeptors A_{2B} (ADORA2B) eine vorrangige Toxizität in Fra1 exprimierenden Brustkrebszellen festgestellt werden, so dass Fra1 als prognostischer Faktor für das Ansprechen auf die Inhibierung bestimmter pharmakologischer Zielstrukturen in Betracht gezogen werden kann. Die in humanen Brusttumorzellen nachgewiesene Bindung von Fra1 an regulatorische Elemente des Promotors und des ersten Introns des *ADORA2B*-Gens (Desmet *et al.*, 2013) verdeutlicht zudem das therapeutische Potential von Fra1 regulierten Effektorproteinen. Ob sich Fra1-positive und -negative humane PDACs hinsichtlich ihres Ansprechens auf konventionelle und zielgerichtete Therapien unterscheiden, ist unklar. Hier bedarf es weiterer Studien, um Fra1 als therapeutischen Marker im PDAC zu etablieren.

5.6. Effekte der *Fra1*-Depletion in murinen PDAC-Zellen

Die Reduktion der *Fra1*-Expression in Tumorzellen resultierte in zahlreichen Studien in einem verminderten tumorigenen Potential. In Mesotheliomen führte die siRNA vermittelte Depletion von *Fra1* zu einer unterdrückten Expression von cd44 und c-met, die eine kritische Rolle für das Wachstum und die Invasivität von Tumoren spielen (Ramos-Nino *et al.*, 2003). Die siRNA vermittelte Reduktion der *Fra1*-Expression in kolorektalen Karzinomzellen resultierte im Verlust deren Zellmotilität und Invasivität (Vial & Marshall, 2003). Die Fra1-Expression ist zudem essentiell für die Proliferation und das Überleben von Ras

transformierten Schilddrüsenzellen durch die Fra1 abhängige Regulation des *Cyclin A*-Promotors (Casalino *et al.*, 2007). Die Fra1-Inhibierung führte in diesen Zellen zur Apoptose. Die Regulation des Cyclin A-Promotors kann durch spezifische AP-1-Heterodimere erfolgen und ist abhängig vom zellulären Kontext (Casalino *et al.*, 2007). In murinen PDAC-Zellen resultierte die siRNA vermittelte Depletion von *Fra1* in einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität, die jedoch weder mit einer veränderten Cyclin A-Expression noch mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert war. Dies zeigt die Kontextabhängigkeit der molekularen Fra1-Wirkung. Expressionsstudien dieser Zellen ergaben jedoch eine signifikante Aktivierung des inflammatorischen Transkriptoms. AP-1-Konsensussequenzen sind in den Promotorbereichen vieler inflammatorischer Gene wie *IL6*, *IL12*, *TNF α* und der induzierbaren NO-Synthase enthalten (Novotny *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001; Baccam *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2003). In vielen Studien wurde für AP-1 hierbei eine negative regulatorische Funktion nachgewiesen. So unterdrückt c-Fos in Mäusen die LPS-induzierte Immunantwort (Ray *et al.*, 2006), während *c-Fos* defiziente Mäuse eine erhöhte TLR stimulierte Produktion pro-inflammatorischer Cytokine wie *TNF α* zeigten (Maruyama *et al.*, 2007). Die Beeinträchtigung inflammatorischer Reaktionen durch Fra1 wurde zudem anhand verminderter Expressionsraten pro-inflammatorischer Mediatoren wie *TNF α* , *IL6* und *Cox-2* in Mäusen mit ektopischer Fra1-Expression nachgewiesen (Yamaguchi *et al.*, 2009). Passend zu dieser repressiven Funktion von Fra1 auf pro-inflammatorische Cytokine zeigte sich nach *Kras*^{G12D} bedingter Induktion der Fra1-Expression eine signifikant reduzierte *TNF α* -mRNA-Expression in murinen PDCs, während die Depletion von *Fra1* mittels RNAi in murinen PDAC-Zellen eine verstärkte *TNF α* -mRNA-Expression bewirkte. Eine molekulare Erklärung für diese Beobachtung könnte die negative Wirkung von Fra1 auf die synergistische Aktivierung von inflammatorischen Cytokinen durch AP-1/cFos und NF κ B/p65 sein. So hat man für den *IL8*-Promotor zeigen können, dass die *IL1* induzierte Aktivierung dieses Promotors, die von cFos und p65 abhängt, durch Fra1 verhindert wird (Hoffmann *et al.*, 2005). Mechanistisch für die Fra1-abhängige Repression der *IL8*-Expression war hierbei die Interaktion mit der Histondeacetylase HDAC1. Analysen der Genexpressionsprofile *Fra1*-siRNA transfizierter muriner PDAC-Zellen ergaben NF κ B-Signaturen, was einen für den *IL8*-Promotor beschriebenen Mechanismus der Fra1-Wirkung nahe legt. Ob jedoch ein Fra1/HDAC1-Komplex ein genereller Repressor der AP-1/cFos und NF κ B/p65 abhängigen Aktivierung pro-inflammatorischer Cytokine in PDAC-Modellen ist, bedarf detaillierter Promotoranalysen. Obwohl die erarbeiteten Daten Fra1 als Repressor pro-inflammatorischer Cytokine etabliert haben, bleibt die tumorbiologische Relevanz dieser Beobachtung bisher unklar. Ein im PDAC relevanter, tumorsuppressiver Mechanismus ist die Seneszenz (Caldwell *et al.*, 2012), die mit der Sekretion zahlreicher pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine einhergeht, dem *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) (Kuilman *et al.*, 2010). Ob jedoch die hier nachgewiesene erhöhte Expression von Cytokinen und Chemokinen Ausdruck einer Seneszenz in *Fra1*-siRNA transfizierten PDAC-Zellen ist und somit die verminderte Zellviabilität erklärt, bedarf weiterer Analysen.

Die in dieser Arbeit in murinen PDAC-Zellen gezeigte Korrelation einer Depletion von *Fra1* mit einer Induktion von Genen des NF κ B-Signalwegs weist zudem auf eine Wechselwirkung beider Signalwege in der untersuchten Tumorentität hin. Diese Wechselwirkung von NF κ B-

und AP-1-Signalen wurde bereits in vielen soliden Tumoren nachgewiesen (Liu *et al.*, 2008; Ndlovu *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Nottingham *et al.*, 2013). In der Studie von Nottingham und Kollegen konnte zudem in Hals-/Kopf-Tumoren (HNSCCs) neben der verstärkten Expression von IKK α und IKK β eine kooperative Aktivierung von NF κ B/REL-Mitgliedern und des EGFR/AP-1-Signalwegs demonstriert werden, die mit einer erhöhten Proliferation und Migration korrelierten (Nottingham *et al.*, 2013). Die siRNA vermittelte Depletion von IKKs und AP-1-Mitgliedern resultierte in HNSCC-Zellen in einer negativen Regulation von teilweise überlappenden Gengruppen (Nottingham *et al.*, 2013). Interessanterweise führte die Depletion von *Fra1* mittels RNAi in HNSCC-Zellen, entgegen der Beobachtungen dieser Arbeit, zu einer reduzierten Produktion pro-inflammatorischer Cytokine wie IL8 und CXCL1. Dies zeigt die Abhängigkeit der *Fra1*-Wirkung von zellspezifischen Genexpressionsprogrammen und verdeutlicht eindrucksvoll, die molekulare Wirkweise von potentiellen therapeutischen Zielstrukturen tumorentitätsspezifisch zu analysieren. Die Determinanten dieser Kontextabhängigkeit der *Fra1*-Wirkung sind bisher unklar.

Neben Effekten einer reduzierten *Fra1*-Expression auf essentielle Prozesse für die Tumoraufrechterhaltung, ist *Fra1* auch in die Wirksamkeit von Chemotherapeutika involviert. So resultierte die siRNA vermittelte *Fra1*-Depletion in Glioblastomzellen in einer verminderten Cisplatin induzierten Apoptoserate, was mit einem reduzierten S-Phase-Arrest durch Modulation des CHK1-CDK2-Signalwegs erklärt werden konnte (Hamdi *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie mit Gliomzellen konnte jedoch ein schützender Effekt von *Fra1* gegenüber der Induktion von Apoptose durch das Chemotherapeutikum Nimustine (ACNU) festgestellt werden, was *Fra1* als möglichen Resistenzfaktor in der Tumorthherapie darstellt (Meise *et al.*, 2012). Diese Daten zeigen, dass die Modulation der Therapieantwort durch *Fra1* ebenfalls kontextabhängig ist. Ob *Fra1* die Therapieantwort in PDAC-Zellen moduliert und für welches Therapeutikum dies relevant ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.7. Hinweise auf eine Stroma assoziierte Funktion von *Fra1* in der Tumorgenese des murinen PDAC

Eine besondere Charakteristik des PDAC ist dessen ausgeprägte Tumordesmoplasie, eine außergewöhnlich starke Ausbildung des Bindegewebes (Stroma), das die Neoplasien infiltriert und umhüllt und bis zu 90% des Tumorumfangs umfassen kann (Mollenhauer *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 2007). Das desmoplastische Stroma ist eine komplexe Struktur, die sich aus einer extrazellulären Matrix (ECM), pankreatischen Stellatzellen (PSCs), Fibroblasten, Makrophagen, Perizyten, aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen, inflammatorischen Zellen sowie Blutgefäßen und Proteinen, wie Cytokinen, zusammensetzt (Feig *et al.*, 2012). Zahlreiche Studien belegen zudem die symbiotische Beziehung zwischen pankreatischen Tumorzellen und PSCs, die in einer erhöhten Wachstumsrate des Tumors resultiert (Apte *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2004; Bachem *et al.*, 2005). In der *Kras*^{G12D} induzierten Karzinogenese des murinen Pankreas zeigte sich in dieser Arbeit eine deutliche Induktion der *Fra1*-Expression in Stromabereichen, während die PanIN-Läsionen *Fra1*-negativ waren. Dies korrelierte mit den niedrigen *Fra1*-Expressionsraten von PanIN-Zelllinien, die aus 3 bis 7 Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäusen isoliert wurden, was

zunächst auf eine untergeordnete Rolle von Fra1 in der PanIN-Progression hindeutet. Die pankreasspezifische Deletion der für die Funktion von Fra1 relevanten Exons 3 und 4 zeigte in 3 Monate alten Mäusen mit einer $Kras^{G12D}$ -Aktivierung ebenfalls keine phänotypischen Veränderungen der PanIN-Läsionen und des Pankreasgewebes, was auf eine eher Stroma assoziierte Funktion von Fra1 in der frühen Karzinogenese des PDAC hinweist.

Eine Subpopulation der Fra1-positiven Stromazellen exprimierte α -Sma, das als Marker für aktivierte Fibroblasten und PSCs dient. PSCs sind fibroblastenartige Zellen, die im gesunden Pankreas nur 4% der Zellen ausmachen und eine periazinäre Verteilung zeigen (Bachem *et al.*, 1998). PSCs fördern die Proliferation von Pankreastumorzellen durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren (Erkan *et al.*, 2012) und spielen eine Rolle in Metastasierungsprozessen von Tumorzellen durch Ko-Migration (Xu *et al.*, 2010). Aktivierte PSCs exprimieren neben α -Sma auch Collagen Typ 1, was diese Zellen als Ursprung der erhöhten Fibrose in chronischer Pankreatitis und im PDAC identifizieren ließ (Haber *et al.*, 1999; Apte *et al.*, 2004). Anhand verschiedener Studien konnten bereits zahlreiche Signalwege identifiziert werden, die an der Regulation der PSC-Aktivierung beteiligt sind. Zu den relevanten Signalwegen zählen neben der MAPK-Kaskade der PI3K-, der Rho Kinase- und der JAK/STAT-Signalweg, sowie AP-1-, NF κ B- und TGF β /SMAD-Signalwege (Haber *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2004; Kikuta *et al.*, 2006; Omary *et al.*, 2007). Eine Subpopulation von Fibroblasten, die sogenannten tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), stellen einen Hauptteil des reaktiven Tumorstromas dar und wurden als Schlüsselfaktoren der malignen Tumorprogression identifiziert (Mueller & Fusenig, 2004). Eine extensive Proliferationsrate von intratumoralen Fibroblasten korreliert zudem mit einer schlechteren Prognose von PDAC-Patienten (Watanabe *et al.*, 2003). Die Infiltration des Tumor umgebenden Stromas mit inflammatorischen Zellen trägt essentiell zur Progression und Metastasierung des Tumors bei (Coussens & Werb, 2002). Als Hauptkomponente der inflammatorischen Zellen des Stromas vieler Tumore fördern tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) wichtige Prozesse wie Tumorentstehung, Wachstum, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Suppression der adaptiven Immunität (Pollard, 2004; Sica *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Für zahlreiche Mitglieder der AP-1-Familie konnte bereits eine Relevanz in Fibrose assoziierten inflammatorischen und proliferativen Prozessen nachgewiesen werden. Für das zu Fra1 nah verwandte AP-1-Mitglied Fra2 konnte von Eferl und Kollegen die Ausbildung von Fibrosen in der Lunge in Mäusen demonstriert werden, in denen Fra2 transgen exprimiert wurde (Eferl *et al.*, 2008). In Mäusen mit einer ektopischen Fra1-Expression konnte die spontane Entwicklung biliärer Fibrosen mit erhöhten hepatischen Collagenmengen beobachtet werden, die mit einer gesteigerten Expression pro-fibrotischer Gene wie *TGF β 1*, *MMP2*, *MMP9* und *TIMP1* einhergingen (Kireva *et al.*, 2011). Das und Kollegen demonstrierten, dass Fra1 an der Proliferation und Differenzierung endometrialer Stromazellen beteiligt ist, die aus fibroblastenartigen Zellen des Endometriums hervorgehen (Das *et al.*, 2012). Zusammen mit den Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit deutet dies darauf hin, dass Fra1 eine wichtige Rolle in der desmoplastischen Reaktion in der Karzinogenese des Pankreas übernehmen könnte. Der definitive Nachweis einer solchen Fra1-Funktion bedarf jedoch komplexer genetischer Modelle, die eine gleichzeitige genetische Manipulation des Stromas und des epithelialen Kompartiments erlauben.

Auch für die Induktion von Fra1 in Zellen des Stromas konnten bereits erste Hinweise erbracht werden. In pulmonalen Fibroblasten der Ratte wird Fra1 durch den *fibroblast growth factor* (FGF2) induziert (Rich *et al.*, 1999). 4T1 Mammakarzinomzellen stimulieren die *de novo* Expression von Fra1 in RAW264.7 Makrophagen, in denen Fra1 durch Bindung an den *IL6*-Promotor die Expression dieses Cytokins induziert (Wang *et al.*, 2010). Über einen autokrinen Mechanismus fördert IL6 die zelluläre Differenzierung dieser Makrophagen zu M2d Makrophagen (TAMs).

Untersuchungen haben zudem aufgezeigt, dass die Tumorzellen nach einer Differenzierung durch das Programm der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT), selbst einen Teil des zellulären Stromas bilden (Petersen *et al.*, 2003). Da sowohl Tumorzellen als auch Zellen des Stromas in murinen PDACs eine starke Fra1-Expression aufwiesen und die Überlappung von Markern für aktivierte Fibroblasten mit der Fra1-Expression nur partiell war, könnte Fra1 auch im PDAC eine relevante Funktion in Prozessen wie EMT und Metastasierung ausüben. Passend hierzu zeigten sich in humanen prä-malignen Brustkrebszellen die AP-1-Mitglieder c-Jun, JunB, c-Fos und Fra1 als essentielle Faktoren der TGF β induzierten Invasion. In diesem Zusammenhang konnte außerdem die AP-1 vermittelte Ko-Regulation zahlreicher mesenchymaler und invasionsassoziiierter Gene nachgewiesen werden, die durch TGF β induziert werden, sowie eine Komplexbildung zwischen Smad2/3 und Fra1 (Sundqvist *et al.*, 2013). Die Interaktion von AP-1-Mitgliedern mit Smad-Proteinen moduliert die TGF β vermittelte Signaltransduktion, deren veränderte Regulation in zahlreiche pathologische Prozesse, wie Karzinogenese, vaskuläre Veränderungen und Fibrose involviert ist (ten Dijke & Arthur, 2007; Massague, 2008). Der Nachweis, dass ein Teil der Fra1-positiven Zellen im Stroma von PDACs epithelialen Ursprungs sind und Fra1-abhängig den Prozess der EMT durchlaufen haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.8. Ausblick

Der Mechanismus, auf dem das durch Desmoplasie geförderte Tumorwachstum beruht, ist komplex und nur zum Teil verstanden. Eine wichtige Funktion der Desmoplasie ist die Förderung des Überlebens und die Verhinderung der Apoptose von Tumorzellen durch die direkte Wirkung von extrazellulären Matrix (ECM)-Proteinen auf die Tumorzellen. Ein wachsendes Verständnis des PDAC assoziierten Stromas könnte in therapeutische Strategien einbezogen werden. Hierbei konnten bereits erste Erfolge erzielt werden anhand der Inhibierung des Hedgehog-Signalwegs, der in Myofibroblasten aktiviert ist (Olive *et al.*, 2009; Hidalgo & Von Hoff, 2012). Um relevante Funktionen von Fra1 in speziellen Zelltypen des Stromas zu identifizieren, könnte ein duales Mausmodell eingesetzt werden, in dem die Induktion von onkogenem *Kras*^{G12D} pankreasspezifisch mit einem *Flp/rtt*-System erfolgt in Kombination einer *Fra1*-Deletion mit der entsprechenden zelltypspezifischen Cre-Rekombinase. Dieses duale Mausmodell könnte zudem in Kombination mit einer Tamoxifen induzierbaren *Cre*^{ERT2}-Rekombinase eingesetzt werden, um die Inaktivierung des *Fra1*-Gens in etablierten Karzinomen zu ermöglichen. Somit könnte Fra1 auf genetischer Ebene als therapeutische Zielstruktur im PDAC validiert werden.

Die Identifizierung von Fra1 regulierten Genen und Signalwegen, die für eine potentielle pharmakologische Inhibierung geeignet sind, könnten in neuen Therapiestrategien des PDAC eingesetzt werden. Hinweise auf diese Zielstrukturen könnten vergleichende Transkriptomanalysen primärer PDCs aus *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*- und *R26-Cre^{ERT2/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Fra1^{lox/lox}*-Mäusen nach 4-OHT Induktion liefern. Eine direkte Bindung von Fra1 an potentielle AP-1-Bindestellen in den relevanten Fra1-Zielgenen kann durch die Methode der quantitativen Chromatin-Immunpräzipitation (qChIP) bzw. durch eine gekoppelte Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) genomweit analysiert werden.

Das in dieser Arbeit etablierte zellbasierte Modellsystem könnte weiterhin zur Identifizierung genetischer Veränderungen beitragen, die an der Entstehung von PDACs beteiligt sind und das Tumorwachstum fördern. Besonders interessant erscheinen hier shRNA basierte Screeninganalysen in primären PDCs. Ein solcher Ansatz könnte zur Unterscheidung von sogenannten genetischen „*Driver*-Läsionen“, die essentiell für die maligne Transformation sind, und funktionell weniger relevanten „*Passanger*-Läsionen“ dienen.

Anhand zahlreicher Studien über die klinische Relevanz von zytoplasmatischem p27^{Kip1} ließ sich im Zusammenhang mit dieser Delokalisation eine generelle Assoziation zu einem hohen Tumorgrad oder einer Metastasierung in vielen humanen Tumoren nachweisen (Liang *et al.*, 2002; Besson *et al.*, 2004a; Denicourt *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008; Duncan *et al.*, 2010). Auch in Patienten mit PDAC resultierte die nukleäre Expression von p27^{Kip1} in einer besseren Überlebensprognose (Fukumoto *et al.*, 2004).

Die gute Charakterisierung der posttranslationalen Mechanismen, welche die Expression und Lokalisation von p27^{Kip1} kontrollieren, machen diese interessant als therapeutische Zielstrukturen. Ein erst kürzlich identifizierter spezifischer Skp2-Inhibitor induzierte in Prostatakarzinomzellen die endogene p27^{Kip1}-Proteinexpression und führte gleichzeitig in diesen Zellen zu einer Suppression der Ubiquitinierungs-abhängigen Aktivierung von AKT, was in einer deutlichen Hemmung der Tumorprogression resultierte (Chan *et al.*, 2013). Anhand muriner PDAC-Modelle ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Assoziation der p27^{Kip1}-Expression zum PI3K-Signalweg feststellen, deren Mechanismen es zu entschlüsseln gilt. Des Weiteren konnte eine Relevanz der PI3K-p27^{Kip1}-Achse für das extrahepatische Gallengangskarzinom demonstriert werden. Besonders hier, auch aufgrund der humanen Daten (Jarnagin *et al.*, 2006), würde sich eine therapeutische Strategie anbieten, die eine Stabilisierung von p27^{Kip1} beinhaltet. Die Stabilisierung von p27^{Kip1} könnte zudem das Ansprechen von Tumorzellen auf zielgerichtete Therapeutika verbessern, was bereits anhand der Abhängigkeit der Sensitivität von murinen PDAC-Zellen gegenüber dem dualen PI3K-mTor-Inhibitor Bez235 demonstriert werden konnte (Diersch *et al.*, 2013).

6. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) repräsentiert mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 6% eine der tödlichsten Krebserkrankungen der westlichen Welt. In mehr als 90% dieser Karzinome können aktivierende Mutationen des Protoonkogens *KRAS* nachgewiesen werden, die eine essentielle Funktion in der Initiierung und Aufrechterhaltung des PDAC ausüben.

In dieser Arbeit wurde ein primäres zellbasiertes *ex vivo* Modellsystem etabliert, das zur Aufklärung der bisher nur wenig verstandenen Signaltransduktion von onkogenem *Kras* und dessen Integration in verschiedene genetische Netzwerke dienen soll. Hierfür wurden primäre duktales Zellen aus dem Pankreas (PDCs) von *R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen isoliert, in denen sich die Expression von onkogenem *Kras^{G12D}* durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induzieren lässt. Die Behandlung dieser PDCs mit 4-OHT resultierte in einer effizienten Aktivierung des kanonischen Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs.

Die Relevanz dieses zellulären Modellsystems für die Pankreaskarzinogenese wurde durch kombinierte Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *Trp53* und *Cdkn2a* in *Kras^{G12D}* induzierten PDCs demonstriert. Hierbei führte die orthotope Transplantation von *Kras^{G12D}* induzierten PDCs mit einer kombinierten Inaktivierung des *Cdkn2a*-Genlocus oder der homozygoten Expression von mutiertem *Trp53^{R172H}* im Pankreas immundefizienter NSG-Mäuse zur Ausbildung metastasierender PDACs, während die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* allein insuffizient für die maligne Transformation von PDCs war.

Die Aktivierung von onkogenem *Kras^{G12D}* führte in PDCs außerdem zu einer gesteigerten Proliferation, die mit einer reduzierten Expression des Zellzyklusregulators *p27^{Kip1}* korrelierte. Zur Studie der genetischen Relevanz von *p27^{Kip1}* *in vivo*, wurden *p27^{Kip1}* Knock-out-Mäuse in etablierte murine PDAC-Modelle gekreuzt, in denen die Expression von onkogenem *Kras^{G12D}* unter der Kontrolle pankreasspezifischer Promotoren erfolgt. In *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen konnte *p27^{Kip1}* als haploinsuffizienter Tumorsuppressor charakterisiert werden, da die Deletion von bereits einem *p27^{Kip1}*-Allel in diesem Mausmodell mit einer verkürzten Überlebenszeit und einer tendenziell erhöhten Metastasierungsrate assoziiert war. Die verminderte *p27^{Kip1}*-Expression zeigte jedoch keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der PDACs und der aus ihnen isolierten Tumorzellen. Murine PDAC-Zellen zeigten in dieser Studie außerdem eine vorwiegend zytoplasmatisch ausgeprägte Lokalisation von *p27^{Kip1}*, die im Zusammenhang mit onkogenen Eigenschaften von *p27^{Kip1}* steht. Die homozygote Deletion von *p27^{Kip1}* führte im *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell zu einer massiven Vergrößerung des Pankreas, was in einer Beeinträchtigung der angrenzenden Organe resultierte und die Überlebenszeit dieser Tiere dramatisch verkürzte. Im *Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell resultierte die Deletion von *p27^{Kip1}* in einer Verschiebung der Relevanz der tumorsuppressorischen Funktion von *p27^{Kip1}* vom Pankreas zum extrahepatischen Gallengang (DHC). Während die *Pdx1-Cre*-Rekombinase vermittelte Aktivierung von *Kras^{G12D}* im DHC nur zur Entwicklung vereinzelter niedrig gradiger prämaligener Läsionen (BillNs) führte, akzelerierte die verminderte Expression von *p27^{Kip1}* diesen Phänotyp Gendosis abhängig, was in einer verstärkten Hyperplasie des DHC resultierte. Die

homozygote Deletion von $p27^{Kip1}$ führte in der $Kras^{G12D}$ induzierten Tumorgenese des DHC, im Gegensatz zum Pankreas, zur Ausbildung von Karzinomen.

Mit Hilfe des $Pdx1-Cre$, $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ -Mausmodells konnten Hinweise auf den Einfluss einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs auf die Karzinogenese des DHC erarbeitet werden. In diesem Modell ließ sich ebenfalls eine Akzeleration der Karzinogenese des DHC durch eine verminderte $p27^{Kip1}$ -Expression feststellen, was eine essentielle Funktion dieses Tumorsuppressor im Epithel des Gallengangs verdeutlicht.

Das primäre zelluläre Modellsystem diene weiterhin zur Identifizierung neuer potentieller Zielstrukturen. Hierbei ergaben Transkriptomanalysen $Kras^{G12D}$ induzierter PDCs eine deutliche Aktivierung von AP-1-Zielgenen. Eine robuste $Kras^{G12D}$ induzierte Expression auf mRNA- und Proteinebene konnte für das AP-1-Mitglied *Fra1* in PDCs nachgewiesen werden. Eine kontinuierlich ansteigende Expression dieses Transkriptionsfaktors zeigte sich auch im Verlauf der Karzinogenese des Pankreas von $Ptf1a^{Cre/+}$, $LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen. Die Induktion der *Fra1*-Expression beschränkte sich hierbei auf ADMs und Stromabereiche, während PanIN-Läsionen in der Regel *Fra1*-negativ waren. Eine starke *Fra1*-Expression ließ sich in murinen PDAC-Geweben und isolierten PDAC-Zellen detektieren. Zudem wiesen 70% der in dieser Arbeit analysierten humanen PDAC-Gewebe eine deutliche *Fra1*-Expression auf, was auf dessen Relevanz in der humanen Erkrankung schließen lässt. Die siRNA vermittelte Depletion von *Fra1* resultierte in murinen PDAC-Zellen in einer deutlich verminderten Zellviabilität, die mit einer Aktivierung des inflammatorischen Transkriptoms assoziiert war. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von *Fra1* für die desmoplastischen Reaktionen und die Tumoraufrechterhaltung von PDACs hin.

7. Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the leading causes of cancer-related death in the Western world with a 5-year survival rate below 6%. Activating mutations in the proto-oncogene *KRAS* play a critical role in both initiation and maintenance of PDAC, as they can be observed in more than 90% of all PDACs.

In this work, a primary cell-based *ex vivo* model system was established to elucidate the signal transduction of oncogenic *Kras* and its integration into different genetic networks, which is poorly understood so far. Primary ductal cells of the pancreas (PDCs) of *R26-Cre^{ERT2/+}, LSL-Kras^{G12D/+}*-mice were isolated, in which the expression of oncogenic *Kras^{G12D}* can be induced by the addition of 4-hydroxytamoxifen. This resulted in an efficient activation of the canonical Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway.

The relevance of this cellular model system for pancreatic carcinogenesis was demonstrated in *Kras^{G12D}*-induced PDCs with combined inactivation of the tumor suppressor genes *Trp53* and *Cdkn2a*. Orthotopic transplantation of *Kras^{G12D}*-induced PDCs with combined inactivation of the *Cdkn2a* gene locus or homozygous expression of mutated *Trp53^{R172H}* led to the formation of metastatic PDACs in the pancreas of immunodeficient NSG mice, while activation of oncogenic *Kras^{G12D}* alone was insufficient for the malignant transformation of PDCs. The activation of oncogenic *Kras^{G12D}* in PDCs also resulted in an increased proliferation, which correlated with reduced expression level of the cell cycle regulator *p27^{Kip1}*. To gain further insight into the genetic relevance of *p27^{Kip1}* *in vivo*, *p27^{Kip1}* knockout mice were crossed into established murine PDAC models in which the expression of oncogenic *Kras^{G12D}* occurs under the control of pancreas-specific promoters. In *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}* mice, *p27^{Kip1}* could be characterized as haploinsufficient tumor suppressor, since the deletion of one allele of *p27^{Kip1}* resulted in shortened survival time and a trend towards increased rate of metastasis. However, reduced expression level of *p27^{Kip1}* had no effect on proliferation of PDACs and isolated tumor cells. In this study, murine PDAC cells also showed a predominantly cytoplasmic localization of *p27^{Kip1}* which is associated with oncogenic properties of *p27^{Kip1}*. In the *Ptf1a^{Cre/+}, LSL-Kras^{G12D/+}* model, homozygous deletion of *p27^{Kip1}* led to a massive enlargement of the pancreas resulting in the impairment of the adjacent organs and dramatically shortened survival time of these animals. In the *Pdx1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}* model deletion of *p27^{Kip1}* caused a shift of the relevance of the tumor suppressor function of *p27^{Kip1}* from pancreas to biliary tract (DHC). While *Pdx1-Cre* recombination-mediated activation of *Kras^{G12D}* only led to the development of low-grade preneoplastic lesions in the DHC, the reduced expression of *p27^{Kip1}* accelerated this phenotype in a gene dose-dependent manner resulting in an increased hyperplasia of the DHC. In contrast to the pancreas, homozygous deletion of *p27^{Kip1}* in *Kras^{G12D}*-induced tumorigenesis of the DHC led to development of carcinomas.

To investigate effects of a constitutive activation of the PI3K signaling pathway on the carcinogenesis of the DHC, the murine *Pdx1-Cre, LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* model was used. This showed an acceleration of the carcinogenesis of the DHC caused by reduced *p27^{Kip1}* expression level, demonstrating an essential function of this tumor suppressor in the biliary epithelium.

The primary cellular model system also served to identify new potential targets. In this context, mRNA gene expression profiles of *Kras*^{G12D}-induced PDCs showed a significant activation of AP-1 target genes. A robust *Kras*^{G12D}-induced expression at the mRNA- and protein levels could be detected for the AP-1 member *Fra1* in PDCs. A continuous increase in expression of this transcription factor was also evident during carcinogenesis of the pancreas in *Ptf1a*^{Cre/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+} mice. The induction of the *Fra1* expression was restricted to ADMs and areas of the stroma, while PanIN lesions were usually *Fra1* negative. A strong expression of *Fra1* could be detected in murine PDAC tissues and isolated PDAC cells. In addition, there was a significant expression shown for *Fra1* in 70% of the analyzed human PDAC tissues in this study, suggesting its relevance in human disease. The siRNA mediated knock down of *Fra1* resulted in a marked reduction in viability of murine PDAC cells, which was associated with an activation of the inflammatory transcriptome. In summary, these results suggest an important role of *Fra1* for desmoplastic reactions and tumor maintenance of PDACs.

8. Literaturverzeichnis

- Adisheshaiah P, Lindner DJ, Kalvakolanu DV, and Reddy SP (2007). FRA-1 proto-oncogene induces lung epithelial cell invasion and anchorage-independent growth in vitro, but is insufficient to promote tumor growth in vivo. *Cancer research* **67**: 6204-6211.
- Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA *et al.* (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* **17**: 3112-3126.
- Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, and Pintzas A (2008). Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **122**: 1745-1756.
- Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D *et al.* (2004). Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* **29**: 179-187.
- Baccam M, Woo SY, Vinson C, and Bishop GA (2003). CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP. *Journal of immunology* **170**: 3099-3108.
- Bachem MG, Schneider E, Gross H, Weidenbach H, Schmid RM *et al.* (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* **115**: 421-432.
- Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H *et al.* (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* **128**: 907-921.
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV *et al.* (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5947-5952.
- Bardeesy N, and DePinho RA (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature reviews Cancer* **2**: 897-909.
- Belguise K, Kersual N, Galtier F, and Chalbos D (2005). FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene* **24**: 1434-1444.
- Benjamini Y, and Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**: 289-300.
- Berenjeno IM, Nunez F, and Bustelo XR (2007). Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene* **26**: 4295-4305.
- Bergers G, Graninger P, Braselmann S, Wrighton C, and Busslinger M (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Molecular and cellular biology* **15**: 3748-3758.
- Besson A, Assoian RK, and Roberts JM (2004a). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nature reviews Cancer* **4**: 948-955.
- Besson A, Dowdy SF, and Roberts JM (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell* **14**: 159-169.

- Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, and Roberts JM (2004b). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & development* **18**: 862-876.
- Besson A, Hwang HC, Cicero S, Donovan SL, Gurian-West M *et al.* (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes & development* **21**: 1731-1746.
- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB *et al.* (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**: 399-405.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brembeck FH, Schreiber FS, Deramandt TB, Craig L, Rhoades B *et al.* (2003). The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer research* **63**: 2005-2009.
- Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML *et al.* (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **15**: 2403-2413.
- Caldas C, and Kern SE (1995). K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **18**: 1-6.
- Caldwell ME, DeNicola GM, Martins CP, Jacobetz MA, Maitra A *et al.* (2012). Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* **31**: 1599-1608.
- Carriere C, Seeley ES, Goetze T, Longnecker DS, and Korc M (2007). The Nestin progenitor lineage is the compartment of origin for pancreatic intraepithelial neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4437-4442.
- Casalino L, Bakiri L, Talotta F, Weitzman JB, Fusco A *et al.* (2007). Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin A transcription. *The EMBO journal* **26**: 1878-1890.
- Casalino L, De Cesare D, and Verde P (2003). Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Molecular and cellular biology* **23**: 4401-4415.
- Chan CH, Morrow JK, Li CF, Gao Y, Jin G *et al.* (2013). Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression. *Cell* **154**: 556-568.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF *et al.* (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal* **18**: 1571-1583.
- Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, and DePinho RA (2007). Stromal biology of pancreatic cancer. *Journal of cellular biochemistry* **101**: 887-907.

- Chu IM, Hengst L, and Slingerland JM (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature reviews Cancer* **8**: 253-267.
- Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, and Leach SD (2012). Exocrine ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Seminars in cell & developmental biology* **23**: 711-719.
- Cohen DR, Ferreira PC, Gentz R, Franza BR, Jr., and Curran T (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes & development* **3**: 173-184.
- Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R *et al.* (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Molecular biology of the cell* **14**: 201-213.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R *et al.* (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* **364**: 1817-1825.
- Corcoran RB, Contino G, Deshpande V, Tzatsos A, Conrad C *et al.* (2011). STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer research* **71**: 5020-5029.
- Coussens LM, and Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.
- Cowley MJ, Chang DK, Pajic M, Johns AL, Waddell N *et al.* (2013). Understanding pancreatic cancer genomes. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* 2013 May 10. [Epub ahead of print].
- Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, and Leach SD (2002). Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *The Journal of clinical investigation* **109**: 1437-1444.
- Darnell JE, Jr. (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **2**: 740-749.
- Das A, Li Q, Laws MJ, Kaya H, Bagchi MK *et al.* (2012). Estrogen-induced expression of Fos-related antigen 1 (FRA-1) regulates uterine stromal differentiation and remodeling. *The Journal of biological chemistry* **287**: 19622-19630.
- Debinski W, and Gibo DM (2005). Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells. *Molecular cancer research : MCR* **3**: 237-249.
- Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J *et al.* (2011). Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current genomics* **12**: 15-24.
- DeSal G, Loda M, and Pagano M (1996). Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Critical reviews in oncogenesis* **7**: 127-142.
- Denicourt C, and Dowdy SF (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes & development* **18**: 851-855.
- Denicourt C, Saenz CC, Datnow B, Cui XS, and Dowdy SF (2007). Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer research* **67**: 9238-9243.

- Desmet CJ, Gallenne T, Prieur A, Reyal F, Visser NL *et al.* (2013). Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 5139-5144.
- Diersch S, Wenzel P, Szameitat M, Eser P, Paul MC *et al.* (2013). Efemp1 and p27(Kip1) modulate responsiveness of pancreatic cancer cells towards a dual PI3K/mTOR inhibitor in preclinical models. *Oncotarget* **4**: 277-288.
- Ding X, Pan H, Li J, Zhong Q, Chen X *et al.* (2013). Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis. *Science signaling* **6**: ra28 21-13, S20-15.
- Duncan TJ, Al-Attar A, Rolland P, Harper S, Spendlove I *et al.* (2010). Cytoplasmic p27 expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **29**: 8-18.
- Edlund H (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature reviews Genetics* **3**: 524-532.
- Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R *et al.* (2008). Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10525-10530.
- Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F *et al.* (2004). The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *The EMBO journal* **23**: 2789-2799.
- Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP *et al.* (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* **112**: 181-192.
- Eferl R, and Wagner EF (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* **3**: 859-868.
- Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kong B, Esposito I *et al.* (2012). The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Current molecular medicine* **12**: 288-303.
- Eser S, Reiff N, Messer M, Seidler B, Gottschalk K *et al.* (2013). Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell* **23**: 406-420.
- Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N *et al.* (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 4266-4276.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D *et al.* (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10887-10890.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, and Chambon P (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications* **237**: 752-757.
- Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, and Maitra A (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* **14**: 224-232.
- Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, and Kemp CJ (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**: 177-180.

- Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**: 733-744.
- Fukumoto A, Ikeda N, Sho M, Tomoda K, Kanehiro H *et al.* (2004). Prognostic significance of localized p27Kip1 and potential role of Jab1/CSN5 in pancreatic cancer. *Oncology reports* **11**: 277-284.
- Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B *et al.* (1997). Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer research* **57**: 1634-1637.
- Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky W, Borowsky AD, Lin Y *et al.* (2004). A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17204-17209.
- Gittes GK (2009). Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Developmental biology* **326**: 4-35.
- Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL *et al.* (1996). Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer research* **56**: 5360-5364.
- Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, and Sandgren EP (2003). Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer research* **63**: 2016-2019.
- Grivennikov SI, Greten FR, and Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883-899.
- Guo J, Ma Q, Zhou X, Fan P, Shan T *et al.* (2013). Inactivation of p27kip1 promotes chemical hepatocarcinogenesis through enhancing inflammatory cytokine secretion and STAT3 signaling activation. *Journal of cellular physiology* **228**: 1967-1976.
- Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL *et al.* (1999). Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *The American journal of pathology* **155**: 1087-1095.
- Haberland J, Wolf U, Benjamin B, Bertz J, Dahm S *et al.* (2012) Kurzfristige Prognosen der Krebsmortalität in Deutschland bis 2015. *UMID*, Vol. 3, pp. 16-23.
- Hamdi M, Popeijus HE, Carlotti F, Janssen JM, van der Burgt C *et al.* (2008). ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. *DNA repair* **7**: 487-496.
- Hanahan D, and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Heidmann D, and Lehner CF (2001). Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating Drosophila cells by estrogen-dependent activity regulation. *Development genes and evolution* **211**: 458-465.
- Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, and Reed SI (1994). A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5291-5295.
- Hess J, Angel P, and Schorpp-Kistner M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science* **117**: 5965-5973.

- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, and Depinho RA (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* **20**: 1218-1249.
- Hidalgo M (2010). Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* **362**: 1605-1617.
- Hidalgo M, and Von Hoff DD (2012). Translational therapeutic opportunities in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 4249-4256.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C *et al.* (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* **4**: 437-450.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB *et al.* (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer cell* **7**: 469-483.
- Hoffmann E, Thiefes A, Buhrow D, Dittrich-Breiholz O, Schneider H *et al.* (2005). MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *The Journal of biological chemistry* **280**: 9706-9718.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES *et al.* (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology* **25**: 579-586.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, and Kern SE (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**: 2969-2972.
- Hruban RH, Maitra A, and Goggins M (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical and experimental pathology* **1**: 306-316.
- Hruban RH, Maitra A, Kern SE, and Goggins M (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterology clinics of North America* **36**: 831-849, vi.
- Ishida N, Kitagawa M, Hatakeyama S, and Nakayama K (2000). Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *The Journal of biological chemistry* **275**: 25146-25154.
- Jakel H, Peschel I, Kunze C, Weinl C, and Hengst L (2012). Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell cycle* **11**: 1910-1917.
- James MK, Ray A, Leznova D, and Blain SW (2008). Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Molecular and cellular biology* **28**: 498-510.
- Jarnagin WR, Klimstra DS, Hezel M, Gonen M, Fong Y *et al.* (2006). Differential cell cycle-regulatory protein expression in biliary tract adenocarcinoma: correlation with anatomic site, pathologic variables, and clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**: 1152-1160.
- Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H, Jr. *et al.* (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nature medicine* **6**: 980-984.
- Jochum W, Passegue E, and Wagner EF (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**: 2401-2412.

- Jokela T, and Vainio S (2007). Conditional tamoxifen Cre induced mutagenesis in the embryonic kidney in organ culture. *Genesis* **45**: 757-761.
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**: 1801-1806.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, and Edlund H (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**: 606-609.
- Kajihara R, Fukushige S, Shioda N, Tanabe K, Fukunaga K *et al.* (2010). CaMKII phosphorylates serine 10 of p27 and confers apoptosis resistance to HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications* **401**: 350-355.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F *et al.* (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nature cell biology* **6**: 1229-1235.
- Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, Suzuki K, Mizuno S *et al.* (1997). Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* **15**: 629-637.
- Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherck C *et al.* (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *Journal of molecular biology* **285**: 175-182.
- Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Satoh K *et al.* (2006). Hydrogen peroxide activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in pancreatic stellate cells. *Molecular and cellular biochemistry* **291**: 11-20.
- Kim SK, and Hebrok M (2001). Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes & development* **15**: 111-127.
- Kireva T, Erhardt A, Tiegs G, Tilg H, Denk H *et al.* (2011). Transcription factor Fra-1 induces cholangitis and liver fibrosis. *Hepatology* **53**: 1259-1269.
- Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu FF, Dubois CL *et al.* (2012). Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell* **22**: 737-750.
- Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmuller U *et al.* (1999). Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* **18**: 3742-3753.
- Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C *et al.* (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development* **12**: 3752-3763.
- Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, and Berns A (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* **413**: 83-86.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, and Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes & development* **24**: 2463-2479.
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C *et al.* (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & development* **11**: 847-862.
- Larrea MD, Hong F, Wander SA, da Silva TG, Helfman D *et al.* (2009). RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9268-9273.
- Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P *et al.* (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and cellular neurosciences* **22**: 430-440.
- Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z *et al.* (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology* **9**: 218-224.
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine* **8**: 1153-1160.
- Liu B, Xia X, Zhu F, Park E, Carbajal S *et al.* (2008). IKKalpha is required to maintain skin homeostasis and prevent skin cancer. *Cancer cell* **14**: 212-225.
- Liu G, McDonnell TJ, Montes de Oca Luna R, Kapoor M, Mims B *et al.* (2000). High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4174-4179.
- Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M *et al.* (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature medicine* **3**: 231-234.
- Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, and Luttges J (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* **7**: 17-23.
- Lu Z, and Hunter T (2010). Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell cycle* **9**: 2342-2352.
- Luttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D *et al.* (2001). Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *The American journal of pathology* **158**: 1677-1683.
- Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A *et al.* (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **16**: 902-912.
- Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, Rahman A, Yeo CJ *et al.* (2002). Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging. *American journal of clinical pathology* **118**: 194-201.
- Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, and Negri E (2013). European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **24**: 792-800.
- Marsh V, Davies EJ, Williams GT, and Clarke AR (2013). PTEN loss and KRAS activation cooperate in murine biliary tract malignancies. *The Journal of pathology* **230**: 165-173.
- Maruyama K, Sano G, Ray N, Takada Y, and Matsuo K (2007). c-Fos-deficient mice are susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infection and immunity* **75**: 1520-1523.

- Massague J (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**: 215-230.
- Mazur PK, and Siveke JT (2012). Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**: 1488-1500.
- McAllister SS, Becker-Hapak M, Pintucci G, Pagano M, and Dowdy SF (2003). Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Molecular and cellular biology* **23**: 216-228.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Montalto G *et al.* (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* **3**: 954-987.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW *et al.* (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1263-1284.
- Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, and Yaniv M (1997). Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* **14**: 837-847.
- Meise R, Tomicic MT, Kaina B, and Christmann M (2012). The chloroethylating anticancer drug ACNU induces FRA1 that is involved in drug resistance of glioma cells. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1199-1207.
- Mendoza MC, Er EE, and Blenis J (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* **36**: 320-328.
- Mollenhauer J, Roether I, and Kern HF (1987). Distribution of extracellular matrix proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and its influence on tumor cell proliferation in vitro. *Pancreas* **2**: 14-24.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR *et al.* (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 1960-1966.
- Morgan DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134.
- Morris JPt, Cano DA, Sekine S, Wang SC, and Hebrok M (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**: 508-520.
- Morton JP, Jamieson NB, Karim SA, Athineos D, Ridgway RA *et al.* (2010). LKB1 haploinsufficiency cooperates with Kras to promote pancreatic cancer through suppression of p21-dependent growth arrest. *Gastroenterology* **139**: 586-597, 597 e581-586.
- Mueller MM, and Fusenig NE (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* **4**: 839-849.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273.
- Muraoka RS, Lenferink AE, Law B, Hamilton E, Brantley DM *et al.* (2002). ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient

- mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Molecular and cellular biology* **22**: 2204-2219.
- Muraoka RS, Lenferink AE, Simpson J, Brantley DM, Roebuck LR *et al.* (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is required for mouse mammary gland morphogenesis and function. *The Journal of cell biology* **153**: 917-932.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, and Luo L (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45**: 593-605.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T *et al.* (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**: 707-720.
- Nakayama KI, and Nakayama K (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature reviews Cancer* **6**: 369-381.
- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F *et al.* (2007). Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* **134**: 1151-1160.
- Narumiya S, Tanji M, and Ishizaki T (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer metastasis reviews* **28**: 65-76.
- Ndlovu MN, Van Lint C, Van Wesemael K, Callebert P, Chalbos D *et al.* (2009). Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells. *Molecular and cellular biology* **29**: 5488-5504.
- Nickeleit I, Zender S, Kossatz U, and Malek NP (2007). p27kip1: a target for tumor therapies? *Cell division* **2**: 13.
- Nickeleit I, Zender S, Sasse F, Geffers R, Brandes G *et al.* (2008). Argyrin A reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer cell* **14**: 23-35.
- Nottingham LK, Yan CH, Yang X, Si H, Coupar J *et al.* (2013). Aberrant IKKalpha and IKKbeta cooperatively activate NF-kappaB and induce EGFR/AP1 signaling to promote survival and migration of head and neck cancer. *Oncogene* 2013 Mar 4. [Epub ahead of print].
- Novotny V, Prieschl EE, Csonga R, Fabjani G, and Baumruker T (1998). Nrf1 in a complex with fosB, c-jun, junD and ATF2 forms the AP1 component at the TNF alpha promoter in stimulated mast cells. *Nucleic acids research* **26**: 5480-5485.
- Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J *et al.* (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **297**: 267-277.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW *et al.* (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* **122**: 983-995.
- Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K *et al.* (2004). Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *The Journal of biological chemistry* **279**: 8873-8878.

- Okada S, Obata S, Hatano M, and Tokuhiya T (2003). Dominant-negative effect of the c-fos family gene products on inducible NO synthase expression in macrophages. *International immunology* **15**: 1275-1282.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**: 1457-1461.
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA *et al.* (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**: 847-860.
- Omary MB, Lugea A, Lowe AW, and Pandol SJ (2007). The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *The Journal of clinical investigation* **117**: 50-59.
- Pan FC, and Wright C (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **240**: 530-565.
- Park E, Liu B, Xia X, Zhu F, Jami WB *et al.* (2011). Role of IKKalpha in skin squamous cell carcinomas. *Future oncology* **7**: 123-134.
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F *et al.* (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American journal of pathology* **162**: 391-402.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45.
- Philipp-Staheli J, Payne SR, and Kemp CJ (2001). p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Experimental cell research* **264**: 148-168.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, and Rutter WJ (1972). An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Developmental biology* **29**: 436-467.
- Pollard JW (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* **4**: 71-78.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J *et al.* (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & development* **8**: 9-22.
- Ramos-Nino ME, Blumen SR, Pass H, and Mossman BT (2007). Fra-1 governs cell migration via modulation of CD44 expression in human mesotheliomas. *Molecular cancer* **6**: 81.
- Ramos-Nino ME, Scapoli L, Martinelli M, Land S, and Mossman BT (2003). Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma. *Cancer research* **63**: 3539-3545.
- Ray KC, Bell KM, Yan J, Gu G, Chung CH *et al.* (2011). Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras(G12D)-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PLoS one* **6**: e16786.
- Ray N, Kuwahara M, Takada Y, Maruyama K, Kawaguchi T *et al.* (2006). c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. *International immunology* **18**: 671-677.

- Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L *et al.* (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer research* **54**: 3025-3033.
- Reichert M, and Rustgi AK (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *The Journal of clinical investigation* **121**: 4572-4578.
- Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M, and Foster JA (1999). Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an AP1/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. *The Journal of biological chemistry* **274**: 33433-33439.
- Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, Kopelovich L, Petersen GM *et al.* (2012). ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer discovery* **2**: 41-46.
- Rodolosse A, Chaux E, Adell T, Hagege H, Skoudy A *et al.* (2004). PTF1alpha/p48 transcription factor couples proliferation and differentiation in the exocrine pancreas [corrected]. *Gastroenterology* **127**: 937-949.
- Roskoski R, Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **66**: 105-143.
- Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S *et al.* (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research* **57**: 1731-1734.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, and Pavletich NP (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**: 325-331.
- Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F *et al.* (2009). EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *European journal of cancer* **45**: 931-991.
- Sauer B, and Henderson N (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 5166-5170.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A *et al.* (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**: 333-338.
- Schreiber FS, Deramaudt TB, Brunner TB, Boretti MI, Gooch KJ *et al.* (2004). Successful growth and characterization of mouse pancreatic ductal cells: functional properties of the Ki-RAS(G12V) oncogene. *Gastroenterology* **127**: 250-260.
- Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C *et al.* (2000). Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* **127**: 4937-4948.
- Schubert S, Shannon K, and Bollag G (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews Cancer* **7**: 295-308.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE *et al.* (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**: 3533-3542.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, and Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602.

- Serres MP, Zlotek-Zlotkiewicz E, Concha C, Gurian-West M, Daburon V *et al.* (2011). Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both in vivo and in vitro. *Oncogene* **30**: 2846-2858.
- Shaulian E, and Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* **4**: E131-136.
- Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677.
- Sherr CJ, and Roberts JM (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development* **9**: 1149-1163.
- Sherr CJ, and Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**: 1501-1512.
- Shin S, Asano T, Yao Y, Zhang R, Claret FX *et al.* (2009). Activator protein-1 has an essential role in pancreatic cancer cells and is regulated by a novel Akt-mediated mechanism. *Molecular cancer research : MCR* **7**: 745-754.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, and Allavena P (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer* **42**: 717-727.
- Siegel R, Naishadham D, and Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**: 10-29.
- Slack JM (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**: 1569-1580.
- Slingerland J, and Pagano M (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of cellular physiology* **183**: 10-17.
- Starostina NG, and Kipreos ET (2012). Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends in cell biology* **22**: 33-41.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE *et al.* (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**: 189-218.
- Strobel O, Rosow DE, Rakhlin EY, Lauwers GY, Trainor AG *et al.* (2010). Pancreatic duct glands are distinct ductal compartments that react to chronic injury and mediate Shh-induced metaplasia. *Gastroenterology* **138**: 1166-1177.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15545-15550.
- Sugimoto M, Martin N, Wilks DP, Tamai K, Huot TJ *et al.* (2002). Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene* **21**: 8067-8074.
- Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Soderberg O *et al.* (2013). Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFbeta-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* **32**: 3606-3615.
- Takebayashi H, Usui N, Ono K, and Ikenaka K (2008). Tamoxifen modulates apoptosis in multiple modes of action in CreER mice. *Genesis* **46**: 775-781.

- Takuwa N, and Takuwa Y (1997). Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and cellular biology* **17**: 5348-5358.
- Tam WL, Lu H, Buikhuisen J, Soh BS, Lim E *et al.* (2013). Protein kinase C alpha is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. *Cancer cell* **24**: 347-364.
- Tanno S, Yanagawa N, Habiro A, Koizumi K, Nakano Y *et al.* (2004). Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer research* **64**: 3486-3490.
- ten Dijke P, and Arthur HM (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 857-869.
- Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M *et al.* (1998). Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *The American journal of pathology* **153**: 681-687.
- Timmerbeul I, Garrett-Engel CM, Kossatz U, Chen X, Firpo E *et al.* (2006). Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14009-14014.
- Tiwari G, Sakaue H, Pollack JR, and Roth RA (2003). Gene expression profiling in prostate cancer cells with Akt activation reveals Fra-1 as an Akt-inducible gene. *Molecular cancer research : MCR* **1**: 475-484.
- Trimarchi JM, and Lees JA (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 11-20.
- Tsuchiya H, Fujii M, Niki T, Tokuhara M, Matsui M *et al.* (1993). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax activates transcription of the human fra-1 gene through multiple cis elements responsive to transmembrane signals. *Journal of virology* **67**: 7001-7007.
- Tzatsos A, Paskaleva P, Ferrari F, Deshpande V, Stoykova S *et al.* (2013). KDM2B promotes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and -independent transcriptional programs. *The Journal of clinical investigation* **123**: 727-739.
- Vallone D, Battista S, Pierantoni GM, Fedele M, Casalino L *et al.* (1997). Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *The EMBO journal* **16**: 5310-5321.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J *et al.* (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**: 661-665.
- Verde P, Casalino L, Talotta F, Yaniv M, and Weitzman JB (2007). Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-1 ternizing on target promoters. *Cell cycle* **6**: 2633-2639.
- Vial E, and Marshall CJ (2003). Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *Journal of cell science* **116**: 4957-4963.
- Vogt PK (2002). Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nature reviews Cancer* **2**: 465-469.
- Wandzioch E, and Zaret KS (2009). Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science* **324**: 1707-1710.

- Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R *et al.* (2010). Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell research* **20**: 701-712.
- Watanabe I, Hasebe T, Sasaki S, Konishi M, Inoue K *et al.* (2003). Advanced pancreatic ductal cancer: fibrotic focus and beta-catenin expression correlate with outcome. *Pancreas* **26**: 326-333.
- Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, Brandl M, Jaeckel S *et al.* (2011). A simple and cost-effective method to transfect small interfering RNAs into pancreatic cancer cell lines using polyethylenimine. *Pancreas* **40**: 144-150.
- Wisdom R, and Verma IM (1993). Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. *Molecular and cellular biology* **13**: 2635-2643.
- Wu FY, Wang SE, Sanders ME, Shin I, Rojo F *et al.* (2006). Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer research* **66**: 2162-2172.
- Xu J, Gao M, Fan S, Meng Q, Goldberg ID *et al.* (2007). Effect of Akt inhibition on scatter factor-regulated gene expression in DU-145 human prostate cancer cells. *Oncogene* **26**: 2925-2938.
- Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X *et al.* (2010). Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *The American journal of pathology* **177**: 2585-2596.
- Yamaguchi T, Takada Y, Maruyama K, Shimoda K, Arai Y *et al.* (2009). Fra-1/AP-1 impairs inflammatory responses and chondrogenesis in fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **24**: 2056-2065.
- Yoon S, and Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* **24**: 21-44.
- Yoshida S, Yokota T, Ujiki M, Ding XZ, Pelham C *et al.* (2004). Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **323**: 1241-1245.
- Young MR, and Colburn NH (2006). Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene* **379**: 1-11.
- Yu Q, Geng Y, and Sicinski P (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**: 1017-1021.
- Zhang B, Wang J, Gao J, Guo Y, Chen X *et al.* (2009). Alternatively activated RAW264.7 macrophages enhance tumor lymphangiogenesis in mouse lung adenocarcinoma. *Journal of cellular biochemistry* **107**: 134-143.
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA *et al.* (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Developmental cell* **13**: 103-114.
- Zhu C, Gagnidze K, Gemberling JH, and Plevy SE (2001). Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-12 p40 promoter. Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. *The Journal of biological chemistry* **276**: 18519-18528.

Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, and Konieczny SF (2007). Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American journal of pathology* **171**: 263-273.

9. Eigene Veröffentlichungen

- Diersch S, Wenzel P, Szameitat M, Eser P, Paul MC *et al.* (2013). Efemp1 and p27(Kip1) modulate responsiveness of pancreatic cancer cells towards a dual PI3K/mTOR inhibitor in preclinical models. *Oncotarget* **4**: 277-288.
- Schüler S, Diersch S, Hamacher R, Schmid RM, Saur D, and Schneider G. (2011). SKP2 confers resistance of pancreatic cancer cells towards TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology* **38**: 219-225.
- Schüler S, Fritsche P, Diersch S, Arlt A, Schmid RM *et al.* (2010). HDAC2 attenuates TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* **9**: 80.
- Hamacher R, Diersch S, Scheibel M, Eckel F, Mayer M *et al.* (2009). Interleukin 1 beta gene promoter SNPs are associated with risk of pancreatic cancer. *Cytokine* **46**:182-186.

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Günter Schneider bedanken für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des spannenden Themas und die motivierende und diskussionsfreudige Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Küster für die Übernahme der Betreuung und des Erstgutachtens der Doktorarbeit am Wissenschaftszentrum Weihenstephan.

Bei Dr. Maximilian Reichert möchte ich mich ganz besonders herzlich für die Einführung in die Techniken der primären duktaalen Pankreaszellen im Labor von Prof. A. Rustgi an der Universität von Pennsylvania, in Philadelphia bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung im Laboralltag und die hilfreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank geht hierbei an Petra Fritsche, Annika Henrich, Sabine Klein, Mariel Paul, Patrick Wenzel und Matthias Wirth, die jeder auf seine Art maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Dieter Saur für die Bereitstellung der zahlreichen Mauslinien und die Unterstützung der tierexperimentellen Arbeiten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Ulrich Keller von der III. Med. Klinik für die Bereitstellung der *p27^{ko}*-Mäuse und bei Prof. Dr. Erwin Wagner für den Transfer der *Fra1^{lox}*-Mauslinie vom CNIO, Spanien nach München bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an die Tierpfleger für ihre Fürsorge und die tolle Zusammenarbeit.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für ihre immerwährende liebevolle Fürsorge, die Motivation und den Glaube an mich und meine Arbeit. Mein tiefster Dank geht an Dich Holger, für die endlose Unterstützung und Geduld der vergangenen Jahre - ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!