

Technische Universität München

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar

Molekulare Analyse des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs

Marita Lisa Fabritius

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dieter Saur

2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 05.02.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.11.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis.....	II
--------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis	V
------------------------------------	----------

1. Einleitung.....	1
1.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	1
1.2. Karzinogenese	1
1.3. Das <i>Kras</i> Onkogen.....	3
1.4. Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K) Signalweg.....	4
1.5. Interaktionen des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs.....	6
1.6. Inhibitoren des Raf/MAP/ERK- und PI3K-Signalwegs.....	7
1.7. Modelle zur Analyse der Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	8
1.8. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Technische Ausstattung und Geräte	11
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3. Reagenzien und Enzyme	14
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	16
2.1.5. Kits	17
2.1.6. Antikörper für Western Blot	17
2.1.7. PCR-Primer.....	19
2.1.8. Programme (PC)	19
2.1.9. Statistische Analysen	20
2.1.10.Zelllinien	20
2.2. Methoden	22
2.2.1. Zellkultur.....	22
2.2.2. Isolation und Genotypisierung von MEFs.....	22
2.2.3. Adenovirale Infektion in vitro	23
2.2.4. DNA-Extraktion und Purifikation.....	25
2.2.5. PCR und Gelelektrophorese	26
2.2.6. Ganzzellextrakte	27
2.2.7. Proteinkonzentrationsbestimmung	27
2.2.8. Western Blot.....	28
2.2.9. RNA-Extraktion und -Purifikation.....	29
2.2.10. Microarrays	30
2.2.11. SA- β -Galactosidase-Färbung.....	32
2.2.12. Hoechst Färbung.....	32

2.2.13.Proliferationsversuche.....	33
2.2.14.Inhibitionsversuche	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Die Behandlung von MEFs mit AdCre-Viren führt zu Rekombinationsraten von über 95%	35
3.2. Die Rekombination von <i>LSL-PIK3CA^{H1047R}</i> führt zu einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs in MEFs.....	38
3.3. Eine isolierte <i>Kras^{G12D}</i> -Mutation bei MEFs führt nicht zu einer Phosphorylierung von Proteinen des PI3K-Signalwegs	40
3.4. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu Morphologie-Veränderung der MEFs.....	42
3.5. Die Induktion des PI3K-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die Apoptose in MEFs	43
3.6. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu reduzierter Seneszenz in MEFs <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+}</i>	44
3.7. MEFs <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> und <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}</i> weisen ebenfalls eine reduzierte Seneszenz auf	45
3.8. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu vermehrter Proliferation von MEFs.....	46
3.8.1. Abhängigkeit der Proliferation von rekombinierten MEFs von der Passage	48
3.9. MEFs <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+}</i> , <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> und <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}</i> zeigen ähnliche Proliferationsverhalten	48
3.10. Die Blockade des PI3K-Signalwegs vermindert die Proliferation von MEFs	50
3.10.1.PI3K-Inhibitor GDC-0941	52
3.10.2.AKT-Inihibitor MK-2206.....	53
3.11. Die Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206 führen zu einer Dephosphorylierung von PI3K-Substraten	53
3.12. Rekombination aktiviert in MEFs Gen-Gruppen von Zellteilung, Metabolismus und Karzinomen	54
4. Diskussion.....	62
4.1. Adenovirale Cre-Rekombinase zeigt hohe Rekombinationsraten in MEFs	62
4.2. Aktivierung des PI3K-Signalwegs und Raf/MAP/ERK-Signalwegs in MEFs	63
4.3. PI3K-Aktivierung führt zu Morphologie-Veränderungen und Seneszenz-Hemmung in MEFs	65
4.4. Rekombinierte MEFs zeigen Proliferations-Phänotyp	67
4.5. Proliferationshemmung durch Inhibitoren.....	68
4.6. Rekombinierte MEFs aktivieren Gen-Gruppen von Zellteilung, Metabolismus und Karzinomen	71

4.7. MEFs als Modellorganismen für die Analyse der Pankreaskarzinom- Entwicklung	72
4.8. Ausblicke.....	74
5. Zusammenfassung	76
6. Abbildungsverzeichnis	78
7. Tabellenverzeichnis	79
8. Literaturverzeichnis	80
9. Curriculum vitae	86
10. Danksagung.....	87
11. Erklärung	88

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AdCre	Adenovirale Cre-Rekombinase
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	Komplementäre RNA
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleid acid
DNase	Desoxyribonuklease
dsRed	Discosoma sp. red fluorescent protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	et alii (und andere)
ERK	extrazellulär-signalregulierte Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm (ng, µg, mg)
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
h	Stunde(n)
kD	Kilodalton
l	Liter (µl, ml)
LSL	lox-Stop-lox
M	Molar (µM, mM)
m	Meter (nm, µm, cm, mm)
MAP	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
MEK1	mitogenaktivierte Proteinkinase1
MOI	multiplicity of infection (pfu/cell)

Abkürzung	Bezeichnung
mRNA	messenger-RNA
p.	Passage
P/S	Penicillin/Streptomycin
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdk1	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1
PFA	Para-Formaldehyd
pfu	plaque forming units
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
RNA	Ribonucleid Acid
RNase	Ribonuclease
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomal Ribonucleid Acid
s	Sekunden
SA-β-gal	Seneszez assoziierte-β-Galaktosidasen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celcius

1. Einleitung

1.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Tumorerkrankungen stellen in Europa und Nordamerika nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache dar. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas steht mit einer jährlichen Inzidenz von 10 pro 100.000 Einwohner auf Platz 10 der führenden Tumorerkrankungen (Siegel et al., 2012). Es ist mit über 85% die häufigste maligne Neoplasie des Pankreas und tritt vorwiegend ab einem Alter von 65 Jahren auf. Aufgrund der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung sowie der spät einsetzenden Beschwerdesymptomatik gelten 85-90% der Pankreaskarzinome bei Diagnosestellung als nicht resektabel (Ahrendt & Pitt, 2002). In diesem Stadium beträgt die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung weniger als 6 Monate (Bardeesy & DePinho, 2002). Auch nach Tumorresektion beläuft sich die Fünfjahresüberlebensrate infolge von Rezidiven bei Mikrometastasen auf nur 15-20%, sodass die Gesamt-Fünfjahresüberlebensrate bei unter 1% liegt (Carpelan-Holmström et al., 2005; Li et al., 2004). Ein entscheidender Grund hierfür ist das reduzierte Ansprechen von Pankreaskarzinomen auf adjuvant beziehungsweise palliativ eingesetzte Chemotherapeutika (Bardeesy & DePinho, 2002). Im Rahmen tumorassoziierter Todesursachen steht das Pankreaskarzinom somit an vierter Stelle (Hezel et al., 2006). Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines profunderen Verständnisses der molekularen Mechanismen, die für die Entstehung, Progression und Therapieresistenz des duktales Pankreaskarzinoms verantwortlich sind, mit dem Ziel neue diagnostische und therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.2. Karzinogenese

Die Pathogenese des duktales Pankreaskarzinoms stellt einen schrittweisen Prozess dar, in dem epitheliale Zellen des exokrinen Pankreas genetische sowie morphologische Veränderungen erfahren. Ein invasives Karzinom kann aus verschiedenen Vorläuferläsionen entstehen. Es wird angenommen, dass sich die Mehrzahl der invasiven Pankreaskarzinome aus sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) entwickelt, die aus dysplastisch veränderten

Epithelzellen des Pankreasgangsystems bestehen. Die Entstehung von PanINs ist ebenfalls über eine azinär-duktales Metaplasie (ADM) ausgehend von azinären Zellen des Pankreas möglich (Aichler et al., 2012). Zudem können sich invasive Pankreaskarzinome aus anderen Läsionen des Pankreas, wie intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN), muzinösen zystischen Neoplasien (MCN) oder atypischen flachen Läsionen (AFLs) entwickeln (Eser et al., 2014; Morris et al., 2010). PanINs sind die am intensivsten erforschten Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms. Sie werden histologisch anhand zunehmender Zell- und Kernveränderungen in drei Stadien eingeteilt (PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 und PanIN-3) (Abbildung 1). Die Tumorprogression wird hierbei durch eine Akkumulation verschiedener Genmutationen, die schon in den präneoplastischen Läsionen nachweisbar sind, verursacht (Hruban, et al., 2000). Eine zentrale Rolle spielt die initiale Mutation des *Kras* Onkogens, die sich in nahezu allen Pankreaskarzinomen nachweisen lässt, sowie nachfolgende Mutationen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A/p16/INK4A*, *TP53*, *SMAD4/DPC4/MADH4* und *BRCA2* (Schneider et al., 2005). Auf zellulärer Ebene bewirken diese Veränderungen eine Dysregulation des Zellzyklus, einen erhöhten Proliferationsindex sowie die Aktivierung spezifischer Signalwege. Das gesteigerte Zellwachstum mit Entwicklung von Resistenzen gegenüber Wachstumsinhibitoren und Apoptoseinduktoren sowie die erworbene Fähigkeit zur Angiogenese und Metastasierung führen letztendlich zur Entstehung eines invasiven Karzinoms (Hanahan & Weinberg, 2000)

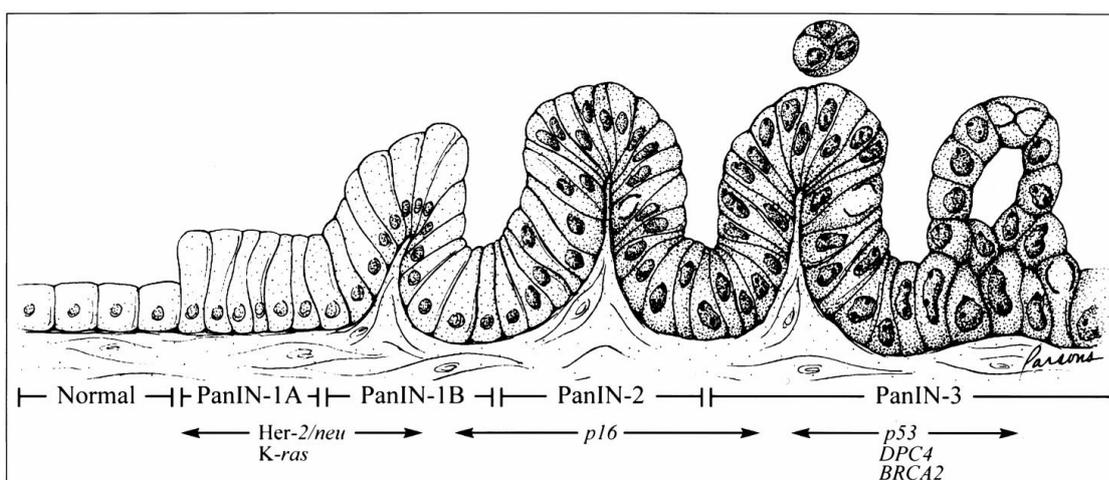


Abbildung 1: Progressionsmodell für das duktales Pankreaskarzinom

Die Entwicklung eines invasiven Karzinoms erfolgt über schrittweise genetische und morphologische Veränderungen in präneoplastischen Läsionen. Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) gehen einher mit einer Akkumulation von Mutationen im Onkogen *Kras* und den Tumorsuppressorgenen *CDKN2A/p16/INK4A*, *TP53*, *SMAD4/DPC4/MADH4*, *BRCA2*. Abbildung aus "Progression Model for Pancreatic Cancer" (Hruban et al., 2000)

1.3. Das *Kras* Onkogen

Als entscheidende genetische Veränderung im Laufe der Pankreaskarzinom-Entstehung wurde die Mutation des *Kras* Onkogens identifiziert. Diese findet sich in über 90% aller Pankreaskarzinome und lässt sich auch schon in den präneoplastischen PanINs zu 36-87% (PanIN-1A bis PanIN-2-3) nachweisen (Löhr et al., 2005; Schneider & Schmid, 2005; Steelman et al., 2011).

Das Produkt des *Kras* Onkogens gehört zur Familie der GTP-bindenden Proteine, die unter anderem für die Steuerung von Differenzierung und Proliferation sowie Regulation des Zelltods verantwortlich sind. Im physiologischen Kontext wird *Kras* durch seine intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität von seiner aktiven GTP-gebundenen Form in die inaktive GDP-gebundene Form überführt. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und GTP-Austauschfaktoren (GEFs) regulieren diesen Prozess und somit die Aktivität des *Kras* Proteins. Im aktiven Zustand stimuliert *Kras* verschiedene Effektor-Kaskaden, wie den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (Pdk1) / Proteinkinase B (AKT)-Signalweg (PI3K-Signalweg), den Raf / mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP) / extrazellulär-signalregulierte Kinase (ERK)-Signalweg (Raf/MAP/ERK-Signalweg) und den Ral Guanin Nukleotid-Austauschfaktor (RalGDS) / p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK)-Signalweg (RalGDS/p38MAPK-Signalweg). Zudem wird *Kras* die Regulation weiterer Effektoren zugeschrieben, unter anderem des Ras-assoziierte-Domäne-enhaltenden Proteins 1 (Rassf1), des Proteins Neurofibromin 1 (NF1) sowie verschiedener Rho- und Rac-Proteine (Castellano & Downward, 2011; Gysin et al., 2011; Pylayeva-Gupta et al., 2011; Zondag et al., 2000).

Im Pankreaskarzinom zeigt sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine Punktmutation in Codon 12, 13 oder 61 des *Kras*-Gens (Feldmann et al., 2007). Die häufigste Punktmutation in Codon 12 (Glycin zu Aspartat, G12D) führt dazu, dass *Kras* seine intrinsische GTPase-Aktivität verliert und resistent gegenüber GAPs wird. *Kras* ist somit unabhängig von externen Wachstumsfaktoren konstitutiv aktiv (Hezel, et al., 2006). Dies hat zur Folge, dass die oben genannten Signalkaskaden aktiviert werden, die über Zellproliferation, Veränderungen des Metabolismus, Resistenz gegenüber externen Signalen und Apoptose-Hemmung zur Tumorentstehung führen. Im Falle des Pankreaskarzinoms wird vermutet, dass onkogenes *Kras* vor allem über

die Aktivierung dreier Hauptsignalkaskaden wirkt, des Raf/MAP/ERK-, des PI3K- sowie des RalGDS/p38MAPK-Signalwegs (Eser, et al., 2014).

1.4. Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K) Signalweg

Eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung spielt der Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Signalweg, der maßgeblich an der Regulation von Zellproliferation, Metabolismus und Apoptose beteiligt ist. Der PI3K-Signalweg zeigt in einer Vielzahl von Karzinomen des Menschen eine aberrante Aktivierung und gehört somit zu den am häufigsten mutierten Signalwegen (Engelman et al., 2006). Eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs findet sich auch in ca. 60% der Pankreaskarzinome (Schneider et al., 2008). Schon in frühen Stadien der Pankreaskarzinom-Entwicklung zeigt sich eine erhöhte Aktivität des PI3K-Signalwegs. Dies konnte sowohl in spezifischen Mausmodellen als auch in menschlichen Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden (Eser et al., 2013; Jimeno et al., 2008). Die Ursache der Aktivierung des PI3K-Signalwegs in der Mehrheit der Pankreaskarzinome ist noch unklar. Einerseits kann es zu Veränderungen im Genlokus der PI3-Kinasen selbst kommen. Aktivierende Punktmutationen finden sich häufig in der katalytischen Untereinheit p110 α (PIK3CA), genauer in der helikalen Domäne (E542K und E545K) und der katalytischen Domäne (H1047R) (Engelman, et al., 2006; Eser, et al., 2013; Yuan et al., 2013). Diese Mutationen wurden für eine Vielzahl von Tumoren des Menschen, unter anderem pulmonale und gynäkologische Neoplasien dokumentiert (Liu et al., 2009). Andererseits wurde nachgewiesen, dass der Verlust oder die Reduktion der Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN)-Expression zu einer Aktivierung des Signalwegs führt (Asano et al., 2004). Ebenso die Aktivierung von Rezeptorthyrosinkinasen. Zudem wurde das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS-1) als Aktivator des PI3K-Signalwegs identifiziert (Asano et al., 2005). Auch der Transkriptionsfaktor High-Mobility Group Protein 1 (HMGA1), der in Pankreaskarzinomzellen überexprimiert wird, ist mit einer Aktivierung des Signalwegs assoziiert (Liau et al., 2007).

Eine direkte Aktivierung des PI3K-Signalwegs erfolgt im physiologischen Kontext über Kras, Rezeptorthyrosinkinasen oder G-proteingekoppelte Rezeptoren (Abbildung 2). PI3-Kinasen werden in drei Klassen (I-III) unterteilt, wobei Klasse I nachweislich bei der Entstehung von Tumoren beteiligt ist. Klasse IA PI3-Kinasen sind

heterodimere Proteine, bestehend aus je einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit, die in verschiedenen Isoformen vorliegen können (Engelman, et al., 2006). Sie katalysieren die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Dieses wirkt als Modulator bei der zellmembrangebundenen Aktivierung von AKT (PKB, Protein-Kinase B) durch die mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Riktor Kinase und Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1) (Engelman, et al., 2006; Eser, et al., 2013; Fresno Vara et al., 2004). Die Proteinkinase AKT phosphoryliert wiederum verschiedene Substrate, die im Zellzyklus und der Apoptoseregulation eine Rolle spielen, wie Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β), Forkhead Box Protein (FOXO), BCL-2 Antagonist of Cell Death (BAD), Tuberöse Sklerose Protein (TSC2) und Murine Double Minute 2 Homolog (MDM2) (Dumble et al., 2014; Engelman, et al., 2006). Entscheidende Effektoren von AKT sind unter anderem ribosomales Protein S6 (S6), ribosomales Protein S6 Kinase (p70S6K), eukaryotischer Initiationsfaktor 4E (eIF-4E)-Bindungsprotein 1 (4E-BP1), p53, Cyclin D1, Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1B (CDKN1B/ p27Kip1) sowie nukleärer Faktor-kappa B (NF- κ B) und Myelozytomatose virales Onkogen (c-Myc). Der Tumorsuppressor PTEN fungiert als Antagonist der PI3-Kinasen und überführt PIP₃ durch Dephosphorylierung wieder in PI-4,5-P₂ (Asano, et al., 2004; Engelman, et al., 2006; She et al., 2010; Steelman, et al., 2011).

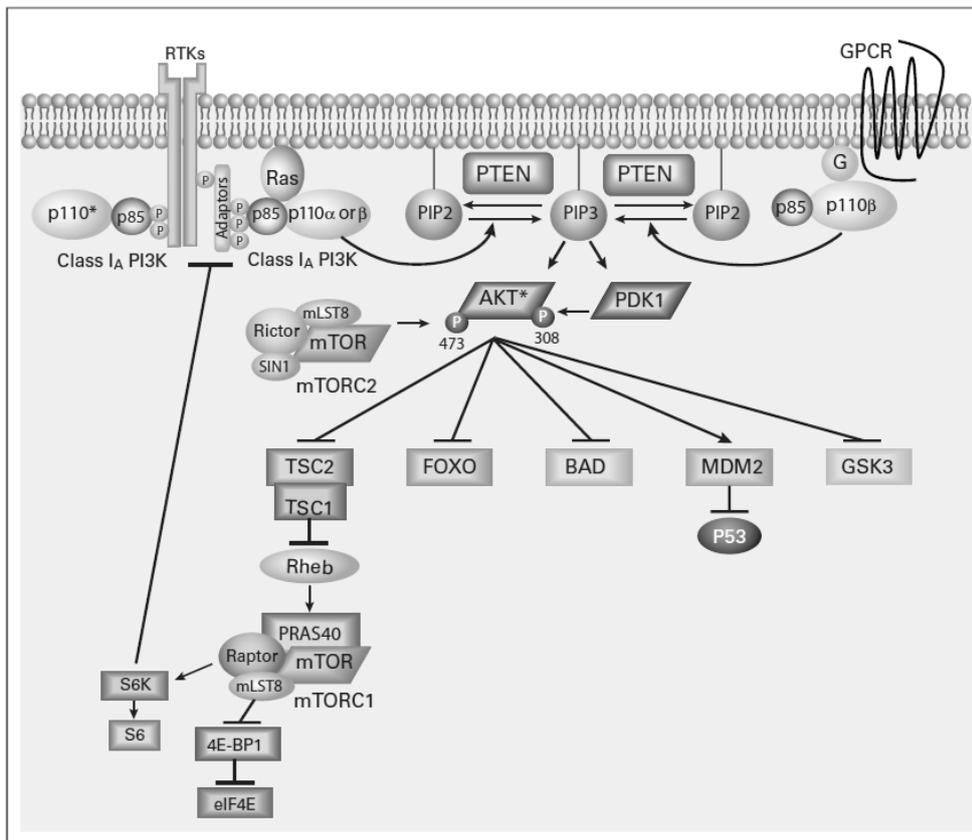


Abbildung 2: PI3K-Signalweg

Eine Aktivierung der PI3-Kinasen erfolgt über Kras, Rezeptortyrosinkinasen oder G-proteingekoppelte Rezeptoren. Pfeile markieren eine Aktivierung nachfolgender Substrate, Balken eine Inhibition. GPCR: G-proteingekoppeltre Rezeptor; RTKs: Rezeptortyrosinkinasen; G: G-Protein; P: Phosphat
 Abbildung aus „The PI3K Pathway as Drug Target in Human Cancer“ (Courtney et al., 2010)

1.5. Interaktionen des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs

In einer großen Anzahl von Tumoren findet sich trotz verschiedener Mutationen eine simultane Aktivierung des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs (Dumble, et al., 2014; Liu, et al., 2009; Zhong et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen *Kras*-mutierten Tumormodellen unterschiedliche Proteine beider Signalwege zur Initiierung der Tumorentstehung unerlässlich waren. So stellte sich im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Craf als Schlüsseffektor für die *Kras*-induzierte Karzinogenese heraus, wohingegen im Pankreaskarzinom der PI3K-Signalweg mit einer Aktivierung via PDK1 essentiell für die Tumorentstehung war (Eser, et al., 2013). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es eine gewebsspezifische Aktivierung der *Kras*-Effektoren geben muss. Die Erforschung dieser Tumor-assoziierten Schlüsseffektoren stellt wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung diagnostischer und therapeutischer Strategien bereit.

Über verschiedene Kaskaden aktivieren beide Signalwege gemeinsame Zielproteine, z.B. BAD, p70S6K, S6 und 4E-BP1 und konvergieren somit teilweise in ihrer Funktion (She, et al., 2010). Als Integrator beider Signalkaskaden wurde der Translationsrepressor 4E-BP1 identifiziert, der in seiner Funktion durch Phosphorylierung im Rahmen der aktiven Signalkaskaden gehemmt wird. Hohe Expressionslevel von phosphoryliertem (inaktivem) 4E-BP1 sind mit einer schlechten Prognose in verschiedenen Tumorarten assoziiert. Genaue Quervernetzungs- und Feedback-Mechanismen durch 4E-BP1 sind jedoch noch unklar (She, et al., 2010). Daneben konnte eine weitere Interaktion der beiden Signalwege über die mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MEK1), ein Substrat von Raf, nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass MEK1 ein wichtiger Bestandteil des aktiven MAGI1/MEK1/PTEN-Komplexes ist. Dieser fungiert als negativer Regulator des PI3K-Signalwegs (Zmajkovicova et al., 2013). Eine Inhibition des Raf/MAP/ERK-Signalwegs und damit auch von MEK1 führt zur Hemmung des Tumorsuppressors PTEN. Infolgedessen kann es zu einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs kommen (Eser, et al., 2014). Mithilfe von Mausmodellen konnte bestätigt werden, dass der Verlust von PTEN über eine Stimulation des PI3K-Signalwegs die Entwicklung von Pankreaskarzinomen fördert (Ying et al., 2011).

1.6. Inhibitoren des Raf/MAP/ERK- und PI3K-Signalwegs

Viele Tumorarten besitzen eine aktivierende Mutation des *Kras* Onkogens. Nach jahrzehntelanger Forschung konnte jedoch noch kein direkter und effektiver *Kras*-Inhibitor entwickelt werden, der in klinischen Studien eine Wirksamkeit im Rahmen der Tumorthherapie zeigte (Cox et al., 2014). Da der PI3K- und der Raf/MAP/ERK-Signalweg bedeutende Effektorkaskaden des *Kras* Onkogens sind und ihre Aktivierung in *Kras*-mutierten Tumoren nachgewiesen werden konnte, stellt die Hemmung dieser beiden Signalwege eine interessante therapeutische Strategie dar (Courtney, et al., 2010; She, et al., 2010). Zur Verfügung stehen mittlerweile mehr als 20 Raf/MAP/ERK- und mehr als 40 PI3K/AKT-Inhibitoren, die sich aktuell in klinischen Studien befinden (Eser, et al., 2014). Unter anderem der Klasse I PI3K-Inhibitor GDC 0941, der PDK1-Inhibitor BX 912, der MEK-Inhibitor AZD 6244 und der AKT-Inhibitor MK-2206. Für den PI3K-Inhibitor GDC 0941 konnte eine effiziente Hemmung von Tumorwachstum im Pankreaskarzinom anhand von Mausmodellen

und menschlichen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Collisson et al., 2012; Eser, et al., 2013). Es wurden auch Versuche zur gleichzeitigen Inhibition des PI3K- und Raf/MAP/ERK-Signalwegs durch Kombination verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Bei simultaner Verwendung des PI3K-Inhibitors GDC 0941 und des MEK-Inhibitors AZD 6244 konnten sogar synergistische Effekte auf Hemmung des Zellwachstums und Initiierung von Apoptose in Zellmodellen von Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden (Zhong, et al., 2013). Ebenso bei der Kombination des MEK-Inhibitors GSK1120212 mit dem AKT-Inhibitor GSK 690693 (Collisson, et al., 2012). Auch in anderen Tumorzelllinien wie beispielsweise dem Mammakarzinom konnte die synergistische Wirkung des PI3K-Inhibitors GDC 0941 mit dem MEK-Inhibitor PD0325901 bestätigt werden (Hoeflich et al., 2009).

1.7. Modelle zur Analyse der Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Die Entwicklung eines duktales Pankreaskarzinoms aus vitalen Zellen über spezifische Vorläuferläsionen ist ein komplexer Vorgang, der eine Vielzahl an genetischen und molekularen Veränderungen beinhaltet. Um diese Veränderungen während der Karzinogenese zu analysieren, wurden verschiedene Mausmodelle generiert. Das erste Mausmodell, das die stufenweise Entstehung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas über PanINs, entsprechend der Karzinogenese beim Menschen, abbilden konnte, wurde von Tuveson und Kollegen entwickelt (Hingorani et al., 2003). Der Prozess der Tumorentstehung konnte durch endogene Expression von $Kras^{G12D}$ in Vorläuferzellen des murinen Pankreas angestoßen werden. Initial erfolgte die Insertion der Punktmutation G12D in den physiologischen *Kras*-Lokus. Nach Transkription und Translation des *Kras*^{G12D}-Allels entsteht so ein konstitutiv aktives *Kras*-Protein. Um die *Kras*^{G12D}-Expression selektiv induzieren zu können, wurde vor dem *Kras*^{G12D}-Lokus ein *lox-Stop-lox* (*LSL*)-Element in die DNA eingefügt. Nach Entfernung dieser Stop-Kassette zwischen den *lox*-Signalen durch eine Cre-Rekombinase erfolgt eine Aktivierung des *Kras*^{G12D}-Allels (Jackson et al., 2001). Um eine *Kras*^{G12D}-Expression ausschließlich im Pankreas zu erhalten, wurden *Kras*^{G12D/+}-Mäuse mit Mäusen verpaart, die ein Cre-Knock-In im Genlokus der pankreasspezifischen Transkriptionsfaktoren Pancreatic and Duodenal Homeobox 1

(Pdx-1) oder Pancreatic Transcription Factor 1a (Ptf1a) aufweisen (Hingorani, et al., 2003; Kawaguchi et al., 2002). Die Mauslinien *Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}* und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* konnten verwendet werden, um essentielle Daten zur Histopathologie und Molekulargenetik von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien zu erheben. Zur Entstehung eines duktales Pankreaskarzinoms in Mausmodellen waren jedoch weitere genetische Veränderungen erforderlich. Aguirre und Kollegen entwickelten ein Mausmodell, das infolge einer Cre-vermittelten *Kras^{G12D}*-Expression in Kombination mit einer Deletion des Tumorsuppressors *INK4A/ARF* eine rasche Progression von PanINs zu invasiven, metastasierenden Pankreaskarzinomen zeigte (Aguirre et al., 2003). Dies konnte auch in Mausmodellen mit pankreasspezifischer Punktmutation im Tumorsuppressorgen *p53* und zusätzlicher *Kras^{G12D}*-Mutation (*LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre*) nachgewiesen werden (Hingorani et al., 2005). Die genetisch veränderten Mausmodelle entwickelten sich zu unverzichtbaren Hilfsmitteln in der Erforschung des Pankreaskarzinoms des Menschen, da einzelne pathophysiologische und genetische Schritte im Verlauf der humanen Karzinogenese in den Mausmodellen nachempfunden werden konnten.

Um die Konsequenzen genetischer Modifikation auf zellulärer Ebene im Rahmen der Tumorentstehung zu analysieren, etablierten sich Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) als geeignete Modellorganismen. Tuveson und Kollegen konnten bei *Kras^{G12D}*-exprimierenden MEFs Veränderungen nachweisen, die charakteristisch für die zellulären Prozesse im Rahmen der Karzinogenese des Pankreas sind. MEFs mit *Kras^{G12D}*-Mutation zeigten einen gesteigerten Proliferationsindex, ein reduziertes Seneszenz-Verhalten sowie eine Aktivierung von Signalwegen und Proteinen, die auch während der Tumorentstehung des Menschen eine entscheidende Rolle spielen (Tuveson et al., 2004). Interessanterweise waren für diese Transformation der Zellen bei *Kras^{G12D/+}*-MEFs keine zusätzlichen Genmutationen notwendig.

1.8. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs gilt als ein entscheidender Schritt in der Karzinogenese des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (Kennedy et al., 2011; Reichert & Rustgi, 2011; Schneider, et al., 2008). Zur genauen Untersuchung des PI3K-Signalwegs hinsichtlich der Tumorentstehung im Pankreas wurde ein

Mausmodell mit dem Knock-In *LSL-PIK3CA^{H1047R}* generiert. Durch die gezielte Induktion des mutierten PI3K-Gens wurde ermöglicht, den PI3K-Signalweg isoliert, ohne Aktivierung anderer zur Tumorentstehung führender Signalkaskaden, zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die selektive Aktivierung des PI3K-Signalwegs ausreicht, um klassische duktale Pankreaskarzinome in vivo zu induzieren (Eser, et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde der PI3K-Signalweg unter Verwendung von isolierten Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) des genannten Mausmodells analysiert. MEFs stellen ein sehr gut etabliertes und validiertes zelluläres System dar, anhand dessen basale Mechanismen onkogener Signalkaskaden in vitro untersucht werden (Guerra et al., 2003; Tuveson, et al., 2004). Es sollte mit Hilfe eines sauberen genetischen Systems, das die selektive Aktivierung eines Signalwegs erlaubt, analysiert werden, welche Genexpressions- und Signalkaskadenveränderungen nach Onkogenaktivierung nachgewiesen werden können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war der Vergleich von MEFs mit dem Genotyp *PIK3CA^{H1047R/+}*, dem Genotyp *Kras^{G12D/+}* sowie dem Genotyp *PIK3CA^{H1047R/+};Kras^{G12D/+}*. Hierbei sollten die Auswirkungen einer isolierten oder kombinierten Aktivierung des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs analysiert werden. Neben Proliferation, Apoptose, Seneszenz und Wachstumsinhibition in den genannten Zellmodellen wurden auch die Expressionslevel verschiedener Gen-Gruppen untersucht, die eine Rolle bei der Karzinogenese spielen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Technische Ausstattung und Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Analysewaage A 120 S	Sartorius AG, Göttingen
Analysewaage PT 600	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Brutschrank Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	SANYO Oceania Pty Limited, LSW, Australia
Dewar Transport-Gefäße, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Elektrophoreseapparaturen	Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA
Elektrophoresis Power Supply Power Pac 300 und Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Experion™ Automated Elektrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Folienschweißgerät Folio FS 3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Wetzlar
Gefrierschrank Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss
Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Imagemaster QuantityOne	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer Sunrise	Biometra GmbH, Göttingen
Kühlschrank KT16RA21	Siemens AG, München
Magnetrührer IKAMAG® RCT	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroplattenphotometer Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Minizentrifuge Capsulefuge Tomy PMC-060	Tomy Tech U.S.A., INC.

Gerät	Bezugsquelle
Minizentrifuge Galaxy Mini	Merck KGaA, Darmstadt
Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multiple Gel Caster	Hofer, Inc., Holliston, MA, USA
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
pH-Meter pH 720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipetten Reference® und Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler ROTAMAX 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Power Supply EV202, EV243, E143, E425	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Semi-Dry-Blottingapparatur	Kreutz, Reiskirchen
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stickstofftank LS 6000	Taylor-Warthon Germany GmbH, Mildstedt
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen
ThermoStat Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühlschrank HERAfreeze -86°C	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Transferpipette® S-8	BRAND GmbH & Co.KG, Wertheim
UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Vacuu Hand Conrol	Vacuubrand GmbH & Co.KG, Wertheim
Vakuumpumpe Typ N0351.2.AN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad 1083	GLF Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wippschüttler POLIMAX 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Zählkammer Neubauer Improved	BRAND GmbH & Co.KG, Wertheim
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Rotina 46R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
COMBITIPS® PLUS 10 ml Biopur	Eppendorf AG, Hamburg
Cryo Pure Tubes 1,6 ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Deckgläser für Haemocytometer 20 x 26 mm	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Einmalkanülen Sterican® 26G, 27G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Omnifix®-F 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Feather Disposable Scalpel No.11, No.22	Feather Safety Razar Co., LTD, Osaka, Japan
Microplates 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR Tube Strips 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips® professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen sterile	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
QIAshredder™ (250)	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes 1,0 ml und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht
Transfermembran Immobilon-FL	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen Cellstar® 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten Multiwell™ 6 Well, 12 Well	Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NY, USA
Zellkulturschalen 60 x 15 mm, 100 x 20 mm, 150 x 25 mm	Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NY, USA
Zellschaber S 24 cm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Whatman-Papier	Biometra GmbH, Göttingen

2.1.3. Reagenzien und Enzyme

Reagenz/Enzym	Bezugsquelle
Acrylamidstammlösung mit 2% Bisacrylamid (19:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Albumin Bovine Fraction V, pH 7.0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Aqua B. Braun Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bradford reagent 5x	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Collagenase Typ 2, Typ 4	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NY, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMF (N,N-Dimethylformamide)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol Rotipuran® >99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst-Reagenz H33342	EMD Biosciences, San Diego, CA, USA
Isofluran Forene® 100%	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammoniumsulfat)	Merck KGaA, Darmstadt

Reagenz/Enzym	Bezugsquelle
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Acetat	Merck KGaA, Darmstadt
NP40 (Nonidet P40)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Odyssey Blocking Buffer®	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Phosphatase Inhibitor Mix I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Proteinase K, recombinant, PCR grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RLT Lysis Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio; USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
TMED (N,N,N',N',- Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β- Galaktopyranosid)	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3.1. Reagenzien für Zellkultur

Reagenz	Bezugsquelle
GIBCO® Trypsin-EDTA(1x) 0,05%	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium [D-MEM] with L-glutamine, 4,5 g/L D-Glucose	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
GIBCO® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [PBS]	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
GIBCO® Opti-MEM® I(1x) + GlutaMAX™-I	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
GIBCO® PenStrep [P/S] (10000 Units/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
GIBCO® Fetal Bovine Serum [FBS]	Life Technology Corporation, Grand Island, NY, USA
Dimethylsulfoxid [DMSO]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Para-Formaldehyd [PFA]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.3.2. Medien und Färbelösungen für Zellkultur

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Medium für MEF-Zelllinien	D-MEM + 10% FBS + 1%P/S
Freezing-Medium	70% D-MEM, 20% FBS, 10% DMSO
Medium für Hoechst-Färbung	D-MEM + 10% FBS + 1% P/S + 2% Hoechst Reagenz H33342 (2 mM Stock, Verdünnung 1:100)
SA-β-Galaktosidase-Färbelösung	1 ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid) 20 mg/ml in DMF + 4 ml 40 mM Zitronensäure/Na ₂ HPO ₄ (36,85 ml 0,1 M Zitronensäure + 63,15 ml Na ₂ HPO ₄) pH 6,0 + 1 ml 100 mM K ₃ Fe(CN) ₆ + 1 ml 100 mM K ₄ Fe(CN) ₆ + 0,6 ml 5 M NaCl + 40 µl 1 M MgCl ₂ + 12,36 ml Aqua dest.

2.1.4. Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8
Laufpuffer (10fach)	35 mM SDS, 0,25 M TRIS/HCl, 2 M Glycin
Transferpuffer	39 mM Glycin, 48 mM TRIS/HCl, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol, pH 8,3
PBS (10fach)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 40 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Laemmli-Puffer (5fach)	0,35 M SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,3 M TRIS/HCl, 0,7 mM Bromphenolblau Na-Salz, 5% (w/v) Mercaptoethanol, pH 6,8
IP-Puffer	50 mM HEPES (pH 7,9), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) Glycerol
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail, 1 ml ddH ₂ O
Waschpuffer	1 x PBS, 0,1% (v/v) NP40
Stripping-Puffer (Odyssey)	25 mM Glycin, 1-2% (w/v) SDS, pH 2
Soriano Lysis Puffer	Soriano Lysis Puffer Stammlösung, 2% (v/v) Proteinase K

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer (50fach)	2 M TRIS, 100 mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure (100%), pH 8,5
Gitschier's Puffer (10fach)	670 mM TRIS pH 8,8, 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 67 mM MgCl ₂ , MilliPore H ₂ O
Soriano Lysis Puffer Stammlösung	10% Gitschier's Puffer (10fach), 0,5% Triton X-100, 1% β-Mercaptoethanol, MilliPore H ₂ O

2.1.5. Kits

Kit	Bezugsquelle
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Ambion® WT Expression Kit	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
Affymetrix® Gene Chip® WT Terminal Labeling Kit	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
Experion™ RNA StdSens Analysis Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

2.1.6. Antikörper für Western Blot

Antikörper	Bezugsquelle	Wirt	Verdünnung
4E-BP1	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
AKT (pan)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Anti-Mouse IgG (680)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Ziege	1:2000
Anti-Mouse IgG (800)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Ziege	1:2000
Anti-Rabbit IgG (680)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Ziege	1:2000
Anti-Rabbit IgG (800)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Ziege	1:2000
c-Myc	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000

Antikörper	Bezugsquelle	Wirt	Verdünnung
Cyclin A	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Hase	1:1000
Cyclin D1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Maus	1:1000
E2F-1 (C-20): sc-193	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Hase	1:1000
GSK-3 β	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
MEK1/2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Maus	1:1000
p16 (M-156): sc-1207	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA	Hase	1:1000
p44/42 MAP Kinase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Maus	1:2000
P70 S6 Kinase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-4E-BP1	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:2000
Phospho-AKT (Thr308)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-GSK-3 β (Ser9)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:2000
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:1000
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Hase	1:2000
S6 Ribosomal Protein	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Maus	1:1000
β -Actin	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	Maus	1:1000

2.1.7. PCR-Primer

Primer-Name	Primer-Aufbau
pGL3-pA-pause4645-UP	5'- TGAATAGTTAATTGGAGCGGCCGCAATA - 3'
PI3K-genotype-RevPr	5' - AAATAGCCGCAGGTCACAAAGTCT - 3'
R26-Tva-GT-UP	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT- 3'
R26-Tva-GT-WT-LP	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG - 3'
R26-td-E-mutLP	5' - TCAATGGGCGGGGGTTCGTT - 3'
Cre-neu-LP	5'- CAGGGTGTTATAAGCAATCCC - 3'
CAGS-sc-UP4 (218)	5'- GTTCGGCTTCTGGCGTGT - 3'
Kras-WT-UP1	5'- CACCAGCTTCGGCTTCCTATT - 3'
Kras-URP-LP1	5'- AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA - 3'
Kras ^{G12D} mut-UP	5'- CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC - 3'

2.1.8. Programme (PC)

Programm	Bezugsquelle
Canvas Version 7.0	Daneba Sytems, Inc., jetzt ACD Systems of America, Inc., Miami, FL, USA
Experion™ Automated Elektrophoresis System Software	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
GraphPad Prism® Version 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
GSEA Version 2.0	Broad Institute, Cambridge, MA, USA
Microsoft® Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000 Version 3.70	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Odyssey Infrared Imaging System Software	LI-COR Bioscences, Lincoln, NE, USA
Step One™ Version 2.2.2	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA

2.1.9. Statistische Analysen

Die statistische Analyse und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit der GraphPad Prism® Software (Version 5.01, La Jolla, CA, USA). Die Signifikanz verglichener Datensätze wurde mithilfe eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests bestimmt. Als statistisch signifikant wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ oder weniger gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$).

Die Ergebnisse der Microarrays wurden mithilfe der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ausgewertet. Bei dem Vergleich zweier Datensätze wurde jeder Gen-Gruppe ein Enrichment Score (ES) zugeordnet, entsprechend einem gewichteten Kolmogorow-Smirnov-Test, und anschließend normalisiert (Normalized Enrichment Score, NES). Die statistische Signifikanz (Nominal p-value, NOM p-val) des ES wurde unter Verwendung eines Phenotyp-basierten Permutationstests berechnet. Ein falsch positiver Anteil (False Discovery Rate, FDR q-val), korrespondierend zu jedem NES, von $< 0,25$ wurde als signifikant festgelegt.

2.1.10. Zelllinien

Bei unten genannten Experimentalmethoden wurden ausschließlich Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) verwendet. Diese wurden in DMEM unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem Fetal Bovine Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert.

Die verwendeten Zelllinien beinhalten zwei verschiedene Knock-Ins: Das Allel *PIK3CA*^{H1047R}, kodierend für p110α^{H1047R}, und das Allel *Kras*^{G12D}. Es wurden MEFs mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}, mit dem Genotyp *LSL-Kras*^{G12D/+} und mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} verwendet.

Der in Abbildung 3 dargestellte R26-Lokus ermöglicht dank seines Aufbaus (Cre/loxP-System) eine gezielte Rekombination, die durch eine Cre-Rekombinase vermittelt wird. Nach Entfernung der Stop-Kassette zwischen den loxP-Signalen durch die Cre-Rekombinase erfolgt eine permanente Expression des nachfolgenden Gens, hier *PIK3CA*^{H1047R}, die auch nach Zellteilung erhalten bleibt (Jackson, et al., 2001). Somit konnten gezielt rekombinierte MEFs und Kontroll-MEFs der gleichen Zelllinie in Versuchsreihen gegenübergestellt werden.

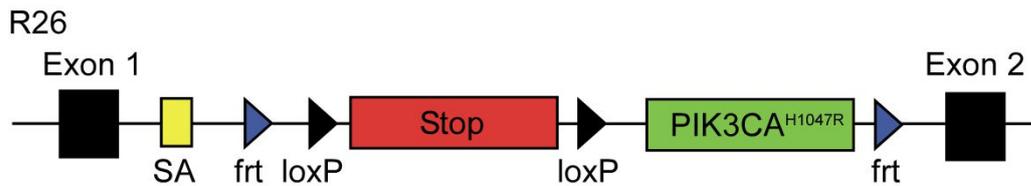


Abbildung 3: Rosa26-Lokus mit $PIK3CA^{H1047R}$ -Knock-In
Möglichkeit der gezielten Expressierung des $PIK3CA^{H1047R}$ -Allels mittels Cre/loxP-System

Um die erfolgte Rekombination nicht nur mithilfe einer PCR nachzuweisen wurden zudem MEFs mit dem Genotyp $R26^{mT-mG/+}$ verwendet (Abbildung 4). Diese fluoreszieren aufgrund der Expressierung eines membrangebundenen tandem dimeren Tomato Proteins (tdTomato) unter UV-Licht der Wellenlänge 489 nm rot. Nach Entfernung der loxP-flankierten tdTomato-Sequenz durch eine Cre-Rekombinase lässt sich unter UV-Licht bei 558 nm eine ausschließlich grüne Fluoreszenz der einzelnen Zellen nachweisen, die auf der nun konstitutiven Expression von enhanced green fluorescent Protein (EGFP) beruht (Muzumdar et al., 2007; Patterson et al., 2001).

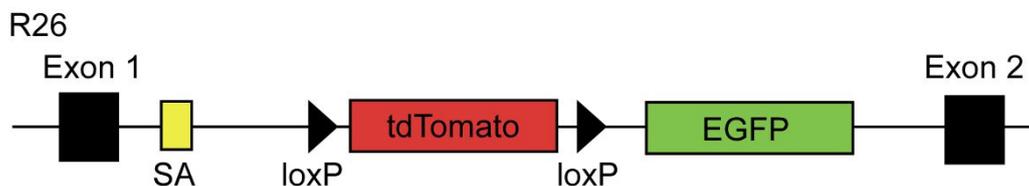


Abbildung 4: Rosa26-Lokus mit $mT-mG$ -Knock-In
Möglichkeit der gezielten Expressierung des EGFP-Allels mittels Cre/loxP-System

Mauslinien mit dem mutierten $PI3K$ -Allel ($LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$) wurden in der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, mittels Knock-In hergestellt (Eser, et al., 2013). Mauslinien mit dem mutierten $Kras$ -Allel ($LSL-Kras^{G12D/+}$) wurden bezogen von Dr. Tyler Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA). Mauslinien mit dem Genotyp $R26^{mT-mG/+}$ wurden bezogen von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Alle Tierstudien wurden durchgeführt gemäß den europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren und wurden genehmigt von der Technischen Universität München und der Regierung von Oberbayern.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Verarbeitung der Zellen erfolgte mit angegebenen Kulturmedien unter aseptischen Bedingungen an Sterilwerkbänken. Die Zellen wurden unter regelmäßiger Erneuerung des Kulturmediums in Brutschränken kultiviert.

Zur Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je nach Größe des Kulturgefäßes mit einem bestimmten Volumen an Trypsin für ca. 5-10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach mikroskopisch kontrollierter Ablösung der Zellen wurden die Zellen in DMEM resuspendiert und je nach Bedarf auf verschiedene, mit DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) gefüllte, Kulturgefäße verteilt. Die genaue Anzahl der schon trypsinisierten und resuspendierten Zellen wurde mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern bestimmt.

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Kulturgefäßen abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und in einem 50 ml Falcon für 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des flüssigen Überstandes wurde das Zellpellet in 4°C kaltem Freezing-Medium gelöst und Dauerkulturröhrchen mit je 1 ml der Zellsuspension gefüllt. Die Kulturröhrchen wurden sofort bei -80°C gelagert und nach 24-72 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Dauerkulturen wurden die Kulturröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und die Zellen in einem mit DMEM gefüllten Kulturgefäß ausgesät. Das Medium der frisch aufgetauten Zellen wurde nach mindestens 24 Stunden gewechselt, um Rückstände des Freezing-Mediums und abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.2.2. Isolation und Genotypisierung von MEFs

Zur Isolation der MEFs wurden gemäß dem Protokoll „Culturing Mouse Embryonic Fibroblasts“ (Fero, 2006) murine Embryonen im Alter von 11,5-12,5 Tagen benötigt. Die für die Verpaarung eingesetzten Mäuse wurden gemäß den Standardbedingungen des Zentrums für präklinische Forschung gehalten. Weibliche Tiere wurden in einem Alter von drei bis sechs Monaten, männliche Tiere in einem Alter von bis zu 1,5 Jahren verpaart. Am Tag der Zellisolation wurde das schwangere

Tier nach Isofluran-Betäubung zervikal disloziert. Unter sterilen Bedingungen wurde der Unterleib des Tieres geöffnet, der Uterus am oberen Vaginaltrakt abgesetzt und in eine Kulturschale mit PBS transferiert. Der Uterus wurde in Untereinheiten mit je einem Embryo zerteilt. Anschließend erfolgte die Trennung des Embryos vom Uterus. Nach Säuberung des Embryos wurde das hämatopoetische Gewebe mitsamt des tubulären Intestinums und der Nabelschnur entfernt. Das zentrale Nervensystem wurde nach Dissektion des Kopfes oberhalb des Mundraumes zur DNA-Extraktion für die nachfolgende Genotypisierung isoliert. Der Embryo wurden in einer Trypsin-gefüllten Kulturschale mithilfe eines Skalpell in maximal 2 mm große Untereinheiten zerteilt und 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml DMEM erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension. Der Überstand wurde entfernt und das Zell-Pellet in einer Kulturschale mit 10 ml DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) resuspendiert. Konfluieren die Zellen nach ca. 1-3 Tagen konnte eine weitere Verarbeitung stattfinden.

Zur Wachstumsmaximierung der primären MEFs wurde die Passagierung nach dem 3T3-Protokoll (Nilausen & Green, 1965) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen, auch bei niedriger Wachstumsrate, alle drei Tage in genannter Weise trypsiniert, resuspendiert und nach Zählung ausgesät. Die frühe Entwicklung von Zell-Seneszenz konnte somit verhindert werden. Es wurde eine schnelle Wachstumsperiode (Passage p.1-5) induziert, gefolgt von einer langsameren Wachstumsperiode (p. 5-10) mit anschließender Seneszenz (p. 10-25).

2.2.3. Adenovirale Infektion in vitro

Eine gezielte Rekombination der verwendeten Zellen zur konstitutiven Aktivierung des gewünschten Gens erfolgte mittels adenoviraler Cre-Rekombinase (AdCre) (Anton & Graham, 1995; Wang et al., 1995). Die Arbeiten mit Adenoviren wurden ausschließlich im S2-Labor unter obligaten Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt.

2.2.3.1. Virusproduktion mit Hilfe von HEK293-Zellen

Zur Amplifikation des Adenoviren-Stocks wurden Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293-Zellen) benötigt (L. Chen et al., 1996), die in DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden. Die Zellen wurden

bezogen bei ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA; USA) (LGC Promochem, Wesel, Deutschland).

Einen Tag vor der adenoviralen Infektion wurden je $4-5 \times 10^6$ HEK293-Zellen in vier 15 cm-Kulturschalen ausgesät. Konnte am Folgetag eine 80-90%ige Konfluenz der Zellen beobachtet werden, wurde die Behandlung mit Adenoviren begonnen. Ein Reaktionsgefäß mit 500 μ l des Adenoviren-Stocks (10^8 pfu/ml) wurde auf Eis aufgetaut und aliquotiert, um zwei verschiedenen Verdünnungen herzustellen. Zuerst wurden 400 μ l des Adenoviren-Stocks in 3600 μ l Opti-MEM pipettiert, entsprechend einer Verdünnung von 1 zu 10, anschließend 40 μ l des Adenoviren-Stocks in 3960 μ l Opti-MEM (Verdünnung von 1 zu 100). Das Medium der HEK293-Zellen wurde vollständig entfernt und wie folgt ersetzt. Zwei der 15 cm-Kulturschalen erhielten je 2 ml der 1 zu 10 Verdünnung (MOI 10), die anderen beiden 15 cm-Kulturschalen je 2 ml der 1 zu 100 Verdünnung (MOI 1). Danach wurden die Kulturschalen für 30 min im Brutschrank bei 37°C sowie 5% CO₂ inkubiert und dabei alle 3-5 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Mit Ende der Inkubationszeit wurden jeder Kulturschale 15 ml DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) hinzugefügt. Nach 2-3 tägiger Inkubation im Brutschrank zeigten sich 80-90% der Zellen abgerundet und teilweise losgelöst von dem Schalenboden. Dies stellt ein indirektes Zeichen für die Beladung der HEK293-Zellen mit adenoviralen Partikeln dar. Die infizierten Zellen wurden in ein 50 ml Falcon transferiert und 30 min bei -80°C gelagert. Anschließend wurden sie 15 min in einem 37°C Wasserbad wiedererwärmt. Dieser Prozess des Einfrierens und Auftauens wurde zweimal wiederholt. Danach wurde die Zellsuspension bei 3000 rpm und Raumtemperatur 15 min zentrifugiert. Der, die Viruspartikel enthaltende, Überstand wurde zu je 1 ml in Safe-Lock-Tubes aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2. Virusinfektion der MEF-Zelllinien

Die für die Infektion mit Adenoviren vorgesehenen Zellen wurden in je vier 10 cm-Kulturschalen oder vier 175 cm²-Kulturflaschen bis zum Erreichen einer 50-70%igen Konfluenz kultiviert. Zu Beginn wurde ein Reaktionsgefäß des Adenoviren-Stocks (10^8 pfu) auf Eis aufgetaut und unter Verwendung von Opti-MEM und drei 2 ml-Reaktionsgefäßen wie folgt verdünnt. Ein Reaktionsgefäß wurde mit 1998 μ l Opti-MEM und 2 μ l des Adenoviren-Stocks gefüllt, entsprechend einer Verdünnung von 1 zu 1000 (Virusgehalt: 10^5 pfu). Das zweite Reaktionsgefäß mit 1980 μ l Opti-MEM

und 20 µl des Adenoviren-Stocks (Verdünnung 1 zu 100, Virusgehalt: 10^6 pfu) und das Dritte mit 1800 µl Opti-MEM und 200 µl des Adenoviren-Stocks (Verdünnung 1 zu 10, Virusgehalt: 10^7 pfu).

Das Medium der vier Kulturschalen wurde entfernt und die Zellen mit DMEM gewaschen. Nach Absaugen des DMEM wurden die drei verschiedenen Suspensionen aus Adenoviren-Stock und Opti-MEM auf je eine Kulturschale gegeben. Die vierte Kulturschale erhielt 2 ml Opti-MEM ohne Viren-Zusatz, um als Kontrolle zu fungieren. Daraufhin wurden die Zellen eine Stunde im Brutschrank inkubiert und dabei im Abstand von jeweils 10 min bewegt, um eine Austrocknung zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturschalen mit 8 ml DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) aufgefüllt. Am Folgetag wurde das Medium zweimal im Abstand von 4-6 Stunden entsorgt und durch neues DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) ersetzt.

2.2.4. DNA-Extraktion und Purifikation

Für die DNA-Extraktion wurde eine 6 cm-Kulturschale verwendet, in die $2-50 \times 10^4$ Zellen ausgesät wurden. Nachdem die Zellen 80-90% konfluent geworden waren, konnte das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Anschließend wurden 200 µl PBS hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und in ein 1 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Nach Zentrifugation des Reaktionsgefäßes bei 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand sofort verworfen und das Zellpellet bei -80°C gelagert.

Die Purifikation und Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kit. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS mit 20 µl Proteinase K gelöst. Nach Zugabe von 200 µl AL Puffer wurde die Probe 15 s mittels Vortexer gemischt und anschließend 10 min bei 56°C inkubiert. Die Suspension wurde nach Hinzufügen von 200 µl 96%igem Ethanol in eine QIAamp Mini spin column überführt und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die DNA zunächst mit 500 µl AW1 Puffer (8000 rpm für 1 min) und anschließend mit 500 µl AW2 Puffer (14.000 rpm für 3 min) gewaschen. Danach wurden 60 µl AE Puffer hinzugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 8000 rpm enthielt das Filtrat die purifizierte DNA. Eine Konzentrations-

bestimmung der DNA erfolgte photometrisch. Für weitere Versuche wurden die DNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.5. PCR und Gelelektrophorese

PCR (Polymerase Kettenreaktion) wurde durchgeführt zur Genotypisierung nach Isolation primärer MEFs, zum Nachweis der erfolgten Rekombination nach adenoviraler Infektion (mit Cre-Rekombinase) und im Rahmen von Microarrays. Hierbei wurden gewünschte DNA-Abschnitte in mehreren Schritten vervielfältigt, um sie mittels Gelelektrophorese als gefärbte Banden sichtbar zu machen.

Zunächst wurden die isolierten murinen embryonalen ZNS-Zellen bzw. die Zell-Pellets der MEFs 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 µl Soriano Lysis Puffer pro Zellsuspension folgte die Erhitzung auf 55°C für 1,5 h und anschließend 95°C für 15 min, um die DNA von Zellresten zu trennen. Im Anschluss an die Lyse wurden die Proben gemischt und für 10 min hochtourig abzentrifugiert. Der, die DNA enthaltende, Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Es wurde ein Master Mix angesetzt, der je nach der zu vervielfältigenden Nukleinsäuresequenz eine bestimmte Menge Ready MixTM und spezifische Primer enthielt. Je 2 µl DNA-Probe und 24 µl Master Mix wurden in PCR-Reaktionsgefäßen gemischt und nach Protokoll in einzelnen Stufen erhitzt.

Anschließend wurde ein 1,5-2%iges Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurde die gewünschte Menge Agarose mit 1000 ml H₂O, 20 ml TAE-Puffer und 20 µl Ethidiumbromid erhitzt und in eine Form gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde dieses in eine, mit 1000 ml H₂O, 20 ml TAE-Puffer und 200 µl Ethidiumbromid gefüllte, Gelelektrophorese-Laufkammer gelegt. Es wurden je 20 µl der PCR-Proben und des Gene-Rulers aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung bei 120 V für 60 min. In einem Geldokumentationsgerät konnten die einzelnen DNA-Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Tabelle 1: Standard-PCR-Bedingungen

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1
95°C	45 s	40
Primer-abhängig (55 - 64°C)	1 min	
72°C	90 s	

2.2.6. Ganzzellextrakte

Zur Vorbereitung der Isolation von Ganzzellextrakten wurden ca. $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen der gewünschten Zelllinie in eine 10 cm-Kulturschale ausgesät. Mit Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz der Zellen wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen und auf Eis zwischengelagert. Nach gründlichem Absaugen des PBS wurden pro Kulturschale 120 μ l des vorbereiteten, auf Eis gekühlten IP-Puffers (mit 1:100 verdünntem Phosphatase Inhibitor Mix I und 1:25 verdünntem Protease Inhibitor Cocktail) hinzugefügt und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1 ml Reaktionsgefäß gefüllt und sofort bei -80°C gelagert.

Für die Weiterverarbeitung der Proteine wurde das Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und anschließend 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und während des Arbeitsprozesses stets auf Eis gelagert.

2.2.7. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der einzelnen Ganzzellextrakte wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Hierfür wurde Bradford-Reagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt und je 300 μ l davon in ein Well einer Mikrotiterplatte gefüllt. Zur quantitativen Beurteilbarkeit der Proteinmengen wurde eine Standardreihe mit BSA in definierten Konzentrationen erstellt. Zu den restlichen Wells wurde je 1 μ l der Ganzzellextrakte hinzugefügt. Anschließend erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Mikroplattenphotometers Anthos 2001. Hierbei wurde die Absorption der unterschiedlich stark gefärbten Proben bei einer

Wellenlänge von 595 nm gemessen und die genaue Proteinkonzentration in Korrelation zur Standardreihe errechnet. Die Ganzzellextrakte wurden unter Zugabe von IP-Puffer (mit 1:100 verdünntem Phosphatase Inhibitor Mix I und 1:25 verdünntem Protease Inhibitor Cocktail) auf einheitliche Proteinkonzentrationen verdünnt und in Laemmli-Puffer überführt. Nach Zentrifugation wurden die Proben 5 min bei 95°C aufgeköcht und bis zur Weiterverarbeitung im Western Blot bei -20°C gelagert.

2.2.8. Western Blot

Western Blots wurden mit dem Ziel angefertigt, das Vorkommen spezifischer Proteine in den untersuchten Zellen nachzuweisen und deren Quantität abzuschätzen. Die einzelnen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese je nach Ladung und Größe aufgetrennt.

Zunächst erfolgte die Anfertigung des Trenngels, je nach Molekulargewicht der Proteine mit 10-15% Acrylamid. Zur Polymerisation wurde das Trenngel in einen Multiple Gel Caster gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min wurde das Isopropanol entfernt und das hergestellte Sammelgel auf das verfestigte Trenngel pipettiert. Mittels Probenkamm wurden Taschen geformt, die jeweils 90 µl Flüssigkeit fassten. Zwischenzeitlich wurden die vorbereiteten Ganzzellextrakte für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach endgültiger Polymerisation beider Gele wurden die Taschen mit Laufpuffer gereinigt und anschließend mit identischen Proteinmengen der Ganzzellextrakte befüllt. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine in einer Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 100-160 V.

Im nachfolgenden Blot wurden die gefärbten Proteinbanden auf eine Immobilon-FL Transfermembran übertragen. Diese wurde zuvor in MetOH aktiviert und in ddH₂O eingelegt, um sie hydrophil zu machen. Das Blotten erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Blot-Apparatur bei 400 mA für 2 Stunden.

Nach Abschluss diesen Vorgangs wurde die Membran 30-40 min in Odyssey® Blocking Buffer gewaschen und anschließend mit dem ersten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die für die Detektion der einzelnen Proteinbanden benötigten Primär- und Sekundärantikörper wurden in 4 ml PBS (mit 0,1% (v/v) Tween® und 5% (w/v) BSA) in angegebener Weise verdünnt. Am nächsten Tag

wurde die Membran 3 x 15 min in PBS (mit 0,1% (v/v) Tween®) gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Nach einem erneuten, wie oben beschriebenen, jedoch lichtgeschützten, Waschvorgang wurde die Membran mit dem Odyssey® Infrared Imaging System eingescannt. Hier zeigte sich je nach verwendetem Sekundärantikörper fluoreszierende Banden bei Wellenlängen von 700 oder 800 nm.

Im Anschluss konnte erneut eine Inkubation mit einem Primärantikörper begonnen werden.

2.2.9. RNA-Extraktion und -Purifikation

Für die RNA-Extraktion wurde analog zur Herstellung von Ganzzellextrakten (vgl. 2.2.6) eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm vorbereitet. Sobald eine 80-90%ige Konfluenz der Zellen beobachtet werden konnte, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden 600 µl vorbereiteter RLT Puffer (mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT Puffer) in die Kulturschale gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Anschließend wurde die Suspension in ein RNase freies 1ml Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur weiteren RNA-Isolation wurde die Zellsuspension analog des RNeasy Mini Kits in eine QiaShredder Spin Column gefüllt und 2 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat in der Collection Tube mit 600 µl 70%igem Ethanol homogenisiert und in einer RNeasy Mini Column 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss im Collection Tube wurde verworfen und der letzte Zentrifugationsvorgang wiederholt. Anschließend wurde die, auf der Membran der RNeasy Mini Column enthaltene, RNA in mehreren Schritten gewaschen, wobei der dabei entstehende Durchfluss jedesmal verworfen wurde. Zunächst wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Membran pipettiert und 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Ansetzen eines DNase Incubation Mix (10 µl DNase I Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer) wurden 80 µl davon auf die Membran gegeben. Um eine ausreichende Entfernung von DNA-Sequenzen zu gewährleisten, wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit RW1-Puffer in oben genannter Weise gewaschen. Danach folgten zwei Waschvorgänge mit 500 µl RPE-Puffer bei 14.000 rpm für 15 s beziehungsweise 2

min. Um den kompletten Überstand zu entfernen, wurde erneut 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der RNA, indem nach Zugabe von 30 µl RNase-freiem ddH₂O und kurzer Inkubation 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Die RNeasy Mini Column wurde verworfen und der Durchfluss in einem RNase freiem Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert.

2.2.10. Microarrays

Die Anfertigung von Microarrays diente der Genexpressionsanalyse. Erhobene Daten verschiedener Zelllinien wurden mithilfe der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Software verglichen (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005).

Die Microarrays wurden nach Protokollen des Ambion® WT Expression Kits und des Affymetrix® Gene Chip® WT Terminal Labeling Kits durchgeführt.

Vorbereitung der RNA. Zu Beginn wurde RNA von behandelten und unbehandelten Zellen wie oben beschrieben extrahiert und aufgereinigt. Es folgte die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA-Probe mittels Spektrophotometer, um eine Kontamination der Proben mit Proteinen, DNA, Phenol, Ethanol oder Salzen vor Versuchsbeginn nachzuweisen. War dies der Fall, wurde eine RNA-Fällung durchgeführt. Die RNA-Probe wurde mit 10% (w/v) Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2) und 2,5% (v/v) Ethanol (100%) homogenisiert und bei -80°C über Nacht gelagert. Anschließend wurde die Suspension bei 14.000 rpm und 4°C für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl Ethanol (70%) hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C für 15 s wurde der Überstand erneut verworfen. Es folgte eine kurze Lufttrocknung der RNA, die daraufhin in 20 µl ddH₂O resuspendiert wurde.

Zudem wurde die Integrität der RNA gelelektrophoretisch überprüft, wobei ein 0,8%iges Agarose-Gel verwendet wurde (0,8 g Agarose, 1000 ml H₂O, 100 ml TAE-Puffer 40fach). Eine hohe Qualität der RNA einer Probe war gegeben, wenn die 28S und 18S rRNA-Bande als zwei diskrete Banden ohne signifikante Verunreinigungen zur Darstellung kamen. Zudem sollte die Intensität der 28S rRNA-Bande dem Doppeltem der 18S rRNA Bande entsprechen (Abbildung 5).

Eine zusätzliche Qualitätskontrolle erfolgte mithilfe des Experion™ RNA StdSens Analysis Kits. Hierbei wurde ein RNA-Gel nach Herstellerangaben gefertigt und unter Verwendung des Experion™ Automated Elektrophoresis System dargestellt.

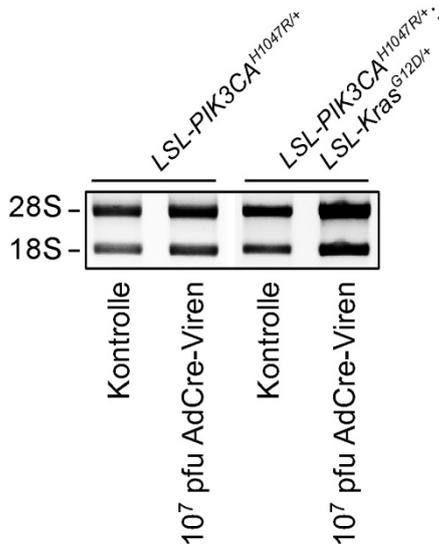


Abbildung 5: RNA-Gel zur Qualitätskontrolle

Nach RNA-Extraktion aus MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* und MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* ohne (Kontrolle) und nach Rekombination (10^7 pfu AdCre-Viren) erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung unter Verwendung eines 0,8%igen Agarose-Gels.

Synthese der cDNA. Unter Verwendung der Reagenzien des Ambion® WT Expression Kits wurde nach Anleitung des beigefügten Protokolls aus der vorbereiteten RNA zunächst eine Einzelstrang-, danach eine Doppelstrang-cDNA synthetisiert. Diese wurde mittels in vitro Transkription in cRNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung und Konzentrationsmessung der gewonnenen cRNA. Im nächsten Schritt diente diese als Vorlage für eine reverse Transkription zur Herstellung einer Einzelstrang-cDNA, die eine definierte Mischung aus dUTP und dTTP enthielt.

Fragmentierung und Markierung der cDNA. Nach Purifikation der gewonnenen cDNA erfolgte die Fragmentierung und Markierung unter Verwendung des Affymetrix® Gene Chip® WT Terminal Labeling Kits. Die Fragmentierung wurde aufgrund enthaltenem dUTP mit Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und apurinisch/apyrimidinischer Endonuklease 1 (APE1) durchgeführt. Im Anschluss wurden die entstandenen cDNA-Abschnitte durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase mit Biotin markiert und auf den Affymetrix® Mouse Gene Chip 1.0 ST hybridisiert. Dieser wurde nach Standardprotokoll gescannt. Zuletzt erfolgte eine Normalisierung der gewonnenen Daten.

Auswertung der Daten. Die Expressionslevel der untersuchten Gene wurden mittels der vom Broad Institute zur Verfügung gestellten Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Software Version 2.0 ausgewertet. Um eine Gruppierung der Gene

durchzuführen wurde die KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY Datenbank verwendet. Diese beinhaltet eine Vielzahl von Signalwegen, die im Rahmen von Zellmetabolismus, intrinsischer und extrinsischer Informationsverarbeitung, zellulären Prozessen, Organsystemen und Erkrankungen des Menschen von Bedeutung sind.

2.2.11. SA- β -Galactosidase-Färbung

Die SA- β -Galactosidase-Färbung beruht darauf, dass Seneszenz-assoziierte Galaktosidasen zugegebenes X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktopyranosid) unter einer sichtbaren Blaufärbung hydrolysieren. Somit können seneszente Zellen lichtmikroskopisch detektiert werden. Das lichtempfindliche Substrat X-Gal wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in DMF (N,N-Dimethylformamide) gelöst und bei -20°C sowie Dunkelheit gelagert. Die Herstellung der Färbelösung erfolgte erst unmittelbar vor Behandlung der Zellen in beschriebener Zusammensetzung.

Für die Versuchsreihe wurden je 10⁵ Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gesät. 24 Stunden später wurde das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und 5 min mit 4% PFA (4% PFA in PBS pH 7,4) bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 2 ml der angesetzten Färbelösung in jedes Well gegeben. Nach Versiegelung der Wells mit Parafilm erfolgte die Inkubation bei 37°C und Dunkelheit ohne CO₂. Erst 48 Stunden später zeigte sich eine suffiziente Blaufärbung der MEFs. Die Färbelösung wurde entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Unter einem Mikroskops konnte nun die Anfärbung seneszenter Zellen beurteilt werden. Zur Objektivierung wurden seneszente Zellen in je 15 Gesichtsfeldern pro Well gezählt und ein Durchschnitt errechnet. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt.

2.2.12. Hoechst Färbung

Um Apoptose zu detektieren, kann kondensiertes Chromatin, ein typisches Zeichen apoptotischer Zellen, nach Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar

gemacht werden. Zur Färbung wurde eine 2 mM Stammlösung Hoechst Reagenz H33342 in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

Einen Tag vor Beginn der Färbung wurde eine 96-Well-Platte vorbereitet, wobei jeweils 5.000 Zellen, die in 200 µl DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) gelöst waren, in ein Well ausgesät wurden. Am Folgetag wurde das Medium entfernt und pro Well je 100 µl DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) und 2 µl Hoechst Reagenz H33342 hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine optimale Anreicherung des Farbstoffes in den MEFs zu erreichen. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten apoptotische Zellen mit blau-fluoreszierendem Chromatin unter einem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm gezählt und ins Verhältnis zu den übrigen Zellen gesetzt werden. Um Fehler zu vermeiden und eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Versuche als Triplikate durchgeführt.

2.2.13. Proliferationsversuche

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens einzelner Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen (z.B. Zellen vor und nach adenoviraler Infektion) wurde eine Methode zur Erfassung der Zellproliferation etabliert. Hierfür wurden die Zellen nach exakter Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe von Neubauer-Zählkammern in 6-Well-Platten ausgesät, sodass jedes Well, abhängig vom Versuchsansatz, je 1×10^5 oder 2×10^5 Zellen in 3 ml DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) enthielt. 24 Stunden nach der Aussaat konnten die Zellen der ersten Wells gezählt werden. Das Medium wurde vollständig entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. In jedes Well wurden 300 µl Trypsin pipettiert und die Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da sich möglichst alle Zellen ablösen sollten, betrug die Inkubationszeit im Durchschnitt 15-20 min. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml DMEM resuspendiert und für 5 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach erwarteter Zelldichte in 100-1200 µl DMEM gelöst und die genaue Zellzahl anhand von Neubauer-Zählkammern festgestellt. Die Zellen der übrigen Wells wurden je nach Bedarf mit frischem DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) versorgt. Der beschriebene Vorgang zur Bestimmung der Zellzahl wurde am zweiten, dritten und vierten Tag nach der Aussaat wiederholt und die Ergebnisse in einer Proliferationskurve mithilfe

der Software GraphPad Prism® Version 5.01 analysiert und graphisch dargestellt. Die Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt.

2.2.14. Inhibitionsversuche

Im Rahmen der Inhibitionsversuche wurden der PI3K-Inhibitor GDC-0941 und der AKT-Inhibitor MK-2206 verwendet. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst. Die zu untersuchenden Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben ausgesät. Einen Tag später erfolgte eine 1:5000 Verdünnung der jeweiligen Inhibitoren-Lösung mit DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S), die anstatt des vorherigen DMEM auf die einzelnen Wells verteilt wurde. Als Kontrolle wurde die gleiche Zelllinie mit einer 1:5000 Verdünnung von DMSO in DMEM (mit 10% FBS und 1% P/S) behandelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte an Tag 1, 2, 3 und 4 nach Beginn der Inkubation mit den Inhibitoren gemäß der Beschreibung in Abschnitt 2.2.13. Die Zellen wurden jeden Tag mit einer frischen Inhibitoren/Medium-Mischung beziehungsweise DMSO/Medium-Mischung versorgt. Die Versuche wurden als Triplikate durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Program GraphPad Prism® Versin 5.01 analysiert und graphisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Behandlung von MEFs mit AdCre-Viren führt zu Rekombinationsraten von über 95%

Um grundlegende Informationen über die Funktionen des PI3K-Signalwegs, der eine wichtige Rolle im Pankreaskarzinom spielt, zu sammeln, wurden MEFs als Modellzellen verwendet und *in vitro* untersucht. Ziel war der Vergleich zwischen Kontroll-MEFs und MEFs mit konstitutiver Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Da die Auswirkungen einer isolierten Aktivierung des PI3K-Signalwegs ohne Interaktionen anderer Signalkaskaden von Interesse war, wurden Zellen verwendet, deren Genom einen modifizierten R26-Lokus beinhalten (siehe Abbildung 3, unter 2.1.10). Dieser R26-Lokus enthält je nach Zelllinie z.B. das Gen *PIK3CA*^{H1047R} und ermöglicht dank seines Aufbaus (Cre/loxP-System) eine gezielte Rekombination. Nach Entfernung der Stop-Kassette zwischen den loxP-Signalen durch eine Cre-Rekombinase erfolgt eine konstitutive Aktivierung des nachfolgenden Gens, hier *PIK3CA*^{H1047R}, die auch nach Zellteilung erhalten bleibt.

In dieser Arbeit wurden für die Exzision Cre-Rekombinase enthaltende Adenoviren (AdCre-Viren) eingesetzt (Anton & Graham, 1995; Wang, et al., 1995). Die Versuche erfolgten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Adenoviren (10^7 pfu, 10^6 pfu und 10^5 pfu), um MEFs mit teilweiser oder annähernd vollständiger Rekombination vergleichen zu können (siehe 2.2.3.2). Eine Rekombinationskontrolle nach adenoviraler Inkubation der MEFs erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und unter Verwendung einer PCR.

Für den mikroskopischen Nachweis wurden MEFs mit dem Reporter gen *mT-mG* eingesetzt, die mithilfe eines membrangebundenen tandem dimeren Tomato Proteins (tdTomato) unter UV-Licht der Wellenlänge 489 nm rot fluoreszieren. Nach selektiver Zugabe der adenoviralen Cre-Rekombinase wurde der Rosa26-Lokus mit *mT-mG*-Knock-In durch die Entfernung der loxP-flankierten tdTomato-Sequenz verändert.

Anschließend ließ sich unter UV-Licht bei 558 nm eine ausschließlich grüne Fluoreszenz der einzelnen Zellen nachweisen, die auf der nun konstitutiven Expression von enhanced green fluorescent Protein (EGFP) beruhte (vergleiche 2.1.10). Die Zellen wurden an verschiedenen Tagen nach Infektion mit AdCre-Viren unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenz-Mikroskops fotografiert und quantifiziert.

Hierbei konnte vier Tage nach Infektion mit Adenoviren einer Konzentration von 10^7 pfu eine Rekombinationsrate von über 95% nachgewiesen werden. Eine AdCre-Viren-Konzentration bei Versuchsbeginn von 10^6 pfu führte zu einer Rekombination von 57-60% nach vier Tagen. Bei einer AdCre-Viren-Konzentration von 10^5 pfu konnten Rekombinationsraten von ca. 35-40% nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen zeigte sich nach nur einem Tag Inkubation in den Versuchsgruppen mit niedrigen Viren-Konzentrationen nur geringe Rekombinationsraten (siehe Abbildung 7).

Für alle nachfolgenden Experimente wurden demzufolge die selektierten Zelllinien vor Versuchsbeginn in drei Populationen unterteilt und jeweils vier Tage mit 10^7 pfu AdCre-Viren, 10^5 pfu AdCre-Viren oder in Medium ohne Viren (Kontrolle) inkubiert. Bei der mit 10^7 pfu Adenoviren behandelten Population wurde aufgrund der genannten Ergebnisse von einer annähernd vollständigen Rekombination ausgegangen.

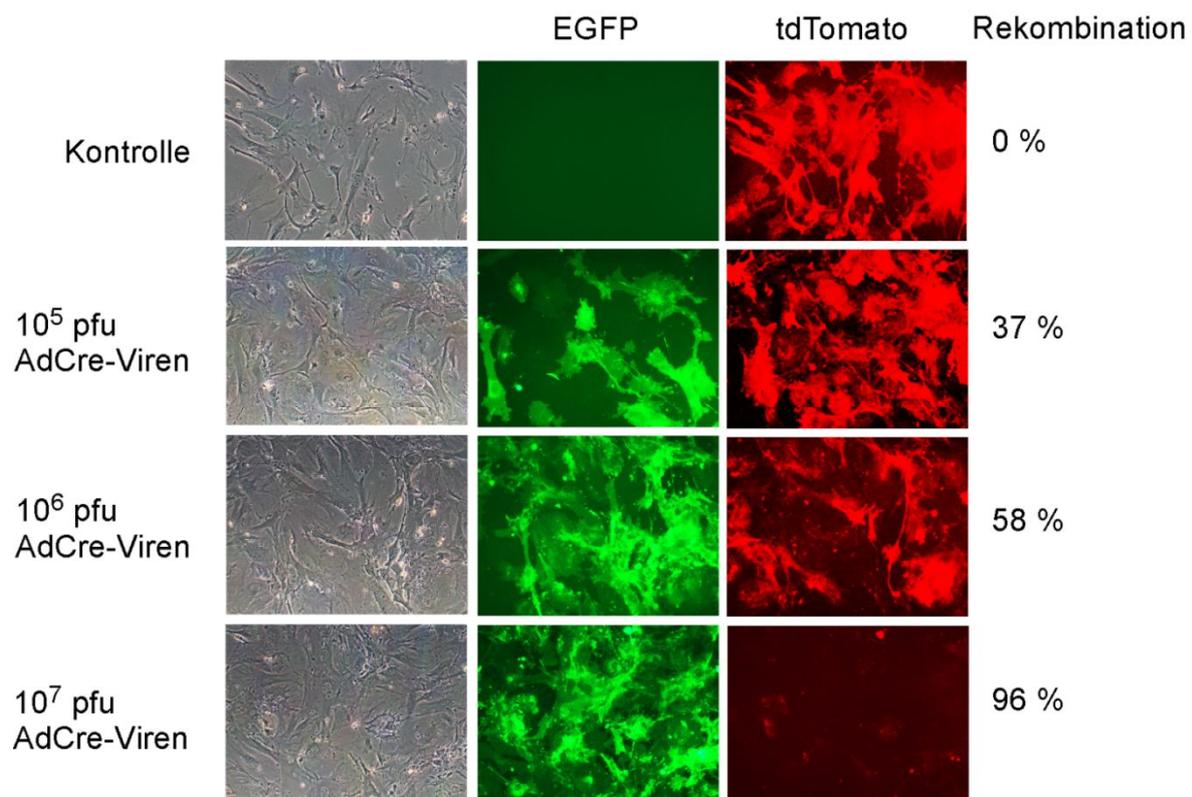


Abbildung 6: Rekombinationsraten bei MEFs $R26^{mT-mG/+}$

MEFs $R26^{mT-mG/+}$ wurden vier Tage mit AdCre-Viren unterschiedlicher Menge inkubiert sowie anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie (Originalvergrößerung 1:100) fotografiert und quantifiziert.

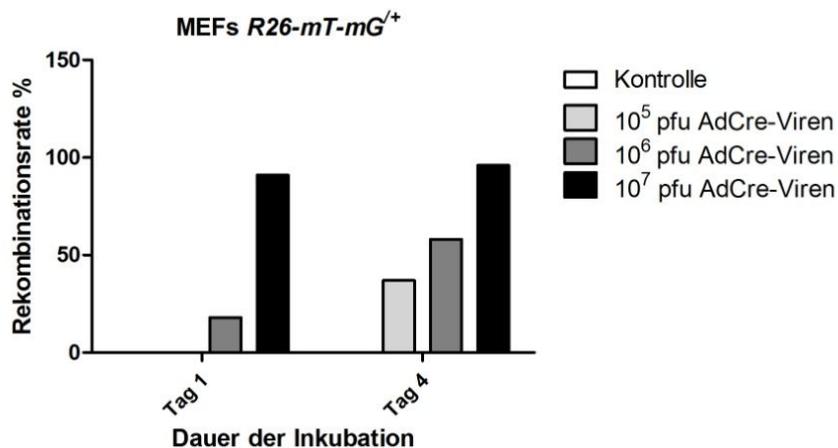


Abbildung 7: Abhängigkeit der Rekombinationsraten bei MEFs $R26-mT-mG^{+/+}$ von der Inkubationszeit mit AdCre-Viren

Nach einer Dauer von einem bzw. vier Tagen Inkubation wurden die MEFs $R26-mT-mG^{+/+}$ mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert

Eine andere Rekombinationskontrolle nach adenoviraler Infektion erfolgte mittels PCR. Nach Behandlung von MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ mit adenoviraler Cre-Rekombinase wurde die DNA der Zellen unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kits extrahiert und eine genaue Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop durchgeführt. Aufgrund des Einsatzes einer definierten DNA-Menge pro Probe (50 ng und 100 ng) in der nachfolgenden PCR, wurde eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Banden gewährleistet. Es konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Deletion der $PIK3CA^{H1047R}$ -Stop-Bande (600 bp) in annähernd allen Zellen, der mit einer Konzentration von 10^7 pfu AdCre-Viren behandelten MEFs kam (Abbildung 8). Zudem fand sich bei diesen Zellen eine Zunahme der Bande bei 900 bp, welche eine deletierte Stop-Kassette im $PIK3CA^{H1047R}$ -Lokus anzeigte. Diese Bande war in den Kontroll-Zellen nicht zu sehen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte vor Beginn einer Versuchsreihe mit rekombinierten MEFs bei jeder Zelllinie der Rekombinationsnachweis mittels PCR der purifizierten DNA.

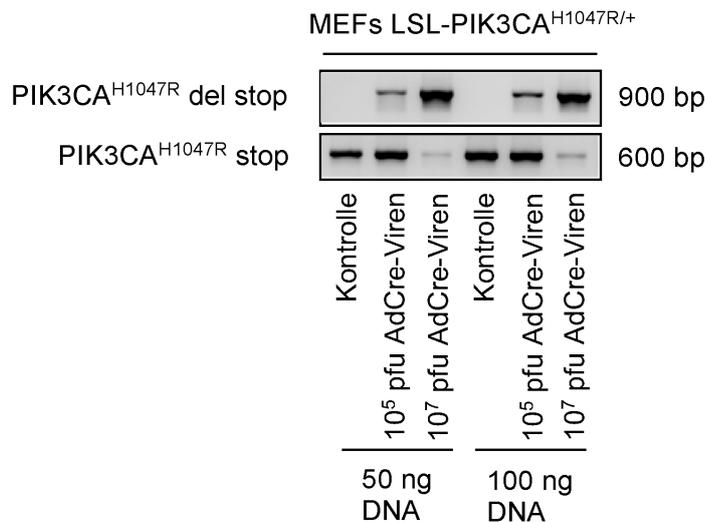


Abbildung 8: Rekombinationsnachweis mittels PCR

MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* wurden vier Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von AdCre-Viren inkubiert. Anschließend wurde die extrahierte DNA (50 und 100 ng) mittels PCR amplifiziert. Es zeigte sich eine nahezu vollständige Deletion der *PIK3CA^{H1047R}*-Stop-Bande (600 bp) in den mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelten MEFs.

3.2. Die Rekombination von *LSL-PIK3CA^{H1047R}* führt zu einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs in MEFs

Eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs geht mit einer Phosphorylierung einer Vielzahl an Effektorproteinen der Signalkaskade einher. Dies konnte im duktalem Adenokarzinom des Pankreas anhand von Mausmodellen nachgewiesen werden (Eser, et al., 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in MEFs die Rekombination des *LSL-PIK3CA^{H1047R}*-Lokus zu einer Aktivierung der PI3K-Signalkaskade führt. Nach AdCre-Behandlung der Zelllinie *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* wurde die Aktivierung einzelner Proteine des PI3K-Signalwegs mittels Western Blot verifiziert (Abbildung 9). Es fand sich eine stärkere Phosphorylierung von AKT-Thr308 und AKT-Ser473 in rekombinierten MEFs (10^7 pfu AdCre-Viren) gegenüber unbehandelten MEFs des gleichen Genotyps (Kontrolle). Konstitutiv aktive PI3-Kinasen katalysieren auch in MEFs die Umwandlung von PI-4,5-P₂ zu PIP₃. Dieses Substrat moduliert die Aktivierung der Proteinkinase AKT über Phosphorylierung an Threonin 308 durch PDK1 und über Phosphorylierung an Serin 473 durch die mTOR-Riktor Kinase (Alessi et al., 1997; Sarbassov et al., 2005). Ebenso fand sich in

AdCre-behandelten MEFs eine stärkere Phosphorylierung von GSK3 β , einem Substrat der aktivierten Proteinkinase AKT. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Phosphorylierung von ERK, einem Protein stromabwärts im Raf/MAP/ERK-Signalweg, der neben dem PI3K-Signalweg einen der anderen *Kras*-aktivierten Hauptsignalkaskaden darstellt.

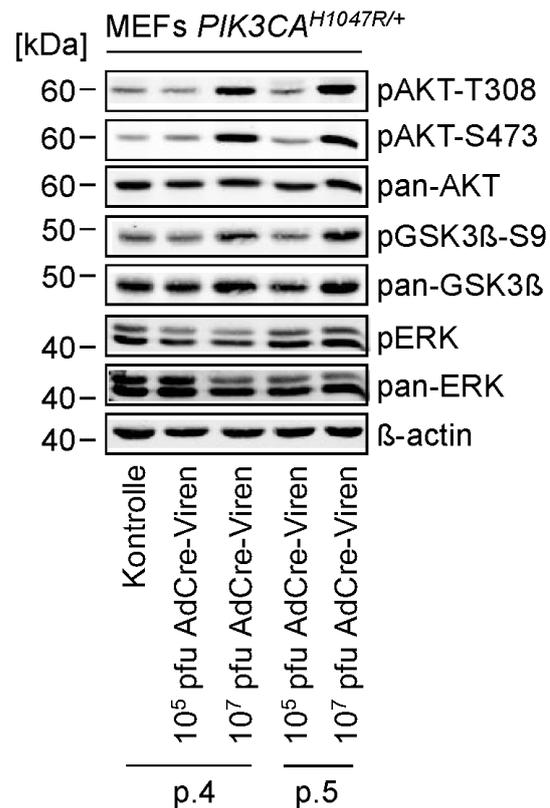


Abbildung 9: Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Aktivierung in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}

Phosphorylierung von Effektorproteinen des PI3K-Signalwegs in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} nach Inkubation mit 10⁷ pfu bzw. 10⁵ pfu AdCre-Viren im Vergleich zu unbehandelten MEFs. Es wurden MEFs nach der 4. (p.4) und der 5. (p.5.) Passage verwendet. β -actin diente als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.3. Eine isolierte *Kras*^{G12D}-Mutation bei MEFs führt nicht zu einer Phosphorylierung von Proteinen des PI3K-Signalwegs

Um die Phosphorylierung stromabwärts gelegener Proteine des PI3K-Signalwegs vergleichend analysieren zu können wurden Western Blots von je zwei Zelllinien mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}, dem Genotyp *LSL-Kras*^{G12D/+} und dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} angefertigt. Hierbei zeigte sich in rekombinierten MEFs mit *PIK3CA*^{H1047R}-Mutation erneut eine stärkere Phosphorylierung von AKT-Thr308 und AKT-Ser473 im Gegensatz zu Kontroll-MEFs (Abbildung 10). Dies konnte auch in MEFs mit kombinierter Aktivierung von *Kras*^{G12D} und *PIK3CA*^{H1047R} nachgewiesen werden, entsprechend dem aktiven PI3K-Signalwegs. Im Vergleich dazu zeigte sich die Menge an phosphoryliertem AKT-Thr308 und AKT-Ser473 in MEFs mit isolierter konstitutiver Aktivierung von *Kras*^{G12D} idem zu Kontroll-MEFs. Einerseits fungiert *Kras* als Aktivator von PI3-Kinasen, die über eine Umwandlung von PI-4,5-P₂ in PIP₃ zu einer Phosphorylierung von AKT führen. Andererseits wird in AdCre-behandelten MEFs *LSL-Kras*^{G12D/+} der Raf/MAP/ERK-Signalweg stimuliert. Dieser hemmt nach Aktivierung von MEK1 als Bestandteil des aktiven MAGI1/MEK1/PTEN-Komplexes den PI3K-Signalweg über eine erneute Dephosphorylierung von PIP₃ zu PI-4,5-P₂ (Zmajkovicova, et al., 2013). Passend hierzu zeigte sich neben der fehlenden Zunahme von phosphoryliertem AKT in MEFs *LSL-Kras*^{G12D/+} im Vergleich zu MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} auch keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von GSK3β, eines weiteren Effektorproteins des PI3K-Signalwegs. Bei MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} konnte analog der MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} eine zunehmende Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Expression von *PIK3CA*^{H1047R/+} und *Kras*^{G12D/+} scheint die onkogene *PIK3CA*^{H1047R}-Mutation über eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs einen dominanteren Effekt auf die AKT-Phosphorylierung zu haben als der, über den aktivierten Raf/MAP/ERK-Signalweg stimulierte, MAGI1/MEK1/PTEN-Komplex.

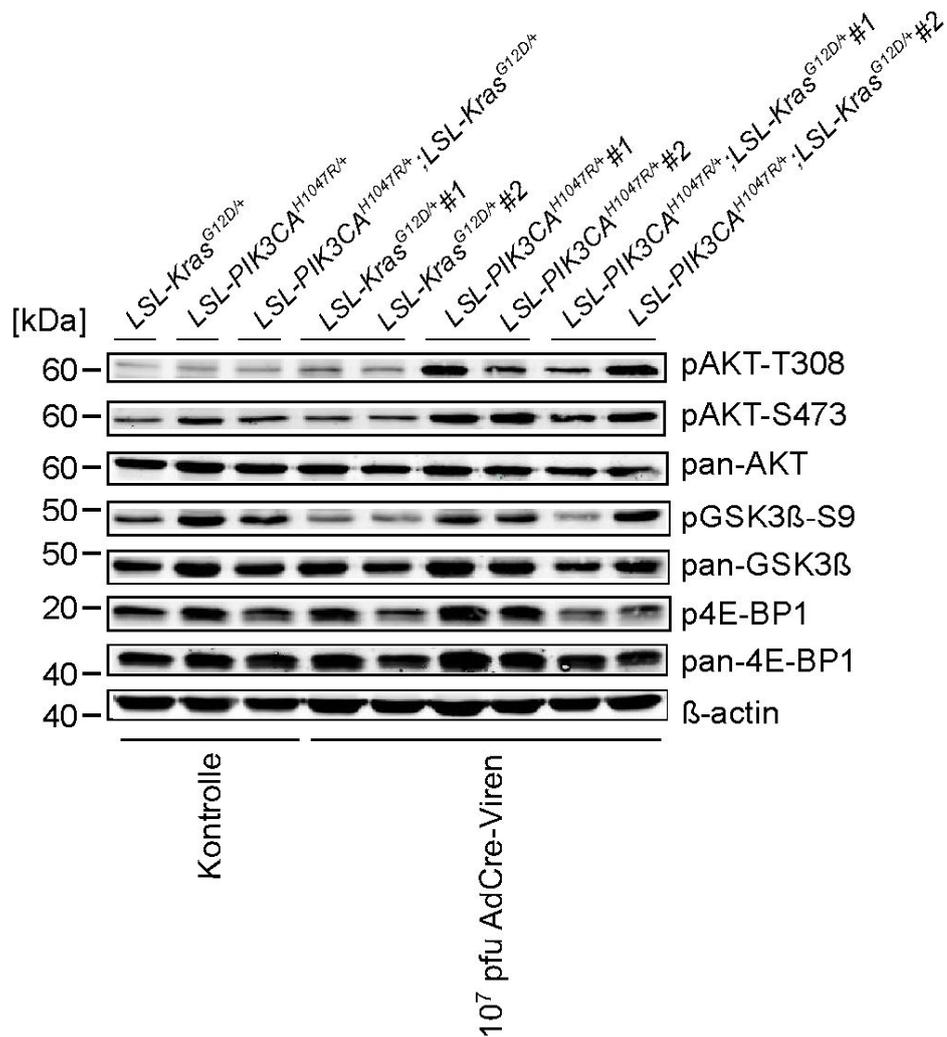


Abbildung 10: Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Aktivierung in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+} und *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}

Gegenüberstellung der Phosphorylierung von Effektorproteinen des PI3K-Signalwegs in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}, *LSL-Kras*^{G12D/+} und *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} nach Inkubation mit 10⁷ pfu AdCre-Viren im Vergleich zu unbehandelten MEFs. Bei jedem Genotyp wurden zwei unabhängige MEF-Zelllinien, die aus zwei verschiedenen Mäusen isoliert wurden, verwendet (#1 und #2). β-actin diente als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung

3.4. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu Morphologie-Veränderung der MEFs

Neben einer Modifikation der Proteinphosphorylierung stellte sich die Frage, ob sich auch morphologische Veränderungen der MEFs nach Aktivierung des PI3K-Signalwegs nachweisen lassen, entsprechend dem Verhalten von MEFs mit anderen Genmutationen. Bei MEFs mit dem Genotyp *LSL-Kras^{G12D/+}* wurde von Tuveson und Kollegen beschrieben, dass eine Behandlung mit adenoviraler Cre-Rekombinase nach 2-3 Tagen zu charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie führt. Die rekombinierten MEFs imponierten nicht mehr breit und flach, sondern schmal und spindelzelliger, was auf eine Reorganisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts zurückgeführt wurde (Tuveson, et al., 2004). In dieser Arbeit fand sich bei MEFs mit alleiniger *PIK3CA^{H1047R/+}*-Mutation ein ähnliches Verhalten. Etwa vier bis fünf Tage nach Induktion des PI3K-Signalwegs durch adenovirale Rekombination konnte eine Morphologie-Veränderung der MEFs beobachtet werden. Es wurden MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* verwendet, die sich in Passage fünf am Übergang zu einer langsameren Wachstumsphase befanden. Die Kontroll-Zellen zeigten überwiegend eine breite, flache und abgerundete Morphologie. Mit steigender Rekombinationsrate imponierten die MEFs schmäler, spindelzelliger und mit zunehmender Kern-Plasma-Relation (Abbildung 11).

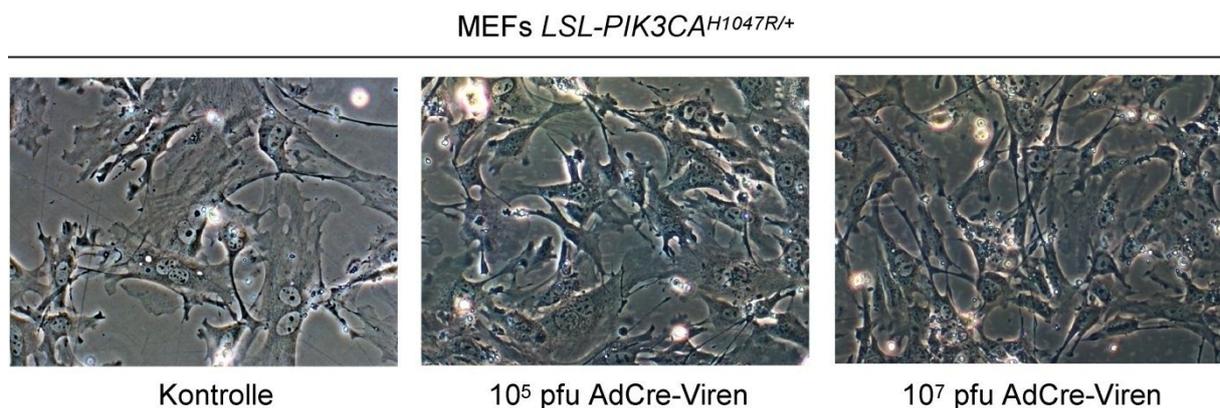


Abbildung 11: Morphologie-Veränderungen von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* nach Behandlung mit unterschiedlichen AdCre-Virus-Konzentrationen

Mikroskopische Darstellung von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* p.5 ohne (Kontrolle) und nach Inkubation mit 10⁵ pfu sowie 10⁷ pfu AdCre-Viren. Es zeigt sich eine vermehrt spindelzellige Morphologie bei Zunahme der Rekombinationsrate. Originalvergrößerung 1:200

3.5. Die Induktion des PI3K-Signalwegs zeigt keinen Einfluss auf die Apoptose in MEFs

Zur Erfassung des Apoptose-Verhaltens von Kontroll-MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* im Vergleich zu MEFs mit Induktion des PI3K-Signalwegs nach Rekombination durch AdCre-Viren wurden die Zellen mithilfe der Hoechst-Färbung quantifiziert. Die angewendete Methode beruht darauf, dass kondensiertes Chromatin als ein charakteristisches Merkmal apoptotischer Zellen nach Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm blau fluoresziert. Die apoptotischen Zellen eines Gesichtsfelds wurden gezählt und ins Verhältnis mit den übrigen Zellen gesetzt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl apoptotischer Zellen in Kontroll-MEFs im Gegensatz zu rekombinierten MEFs nach Behandlung mit 10^5 pfu oder 10^7 pfu AdCre-Viren (Abbildung 12).

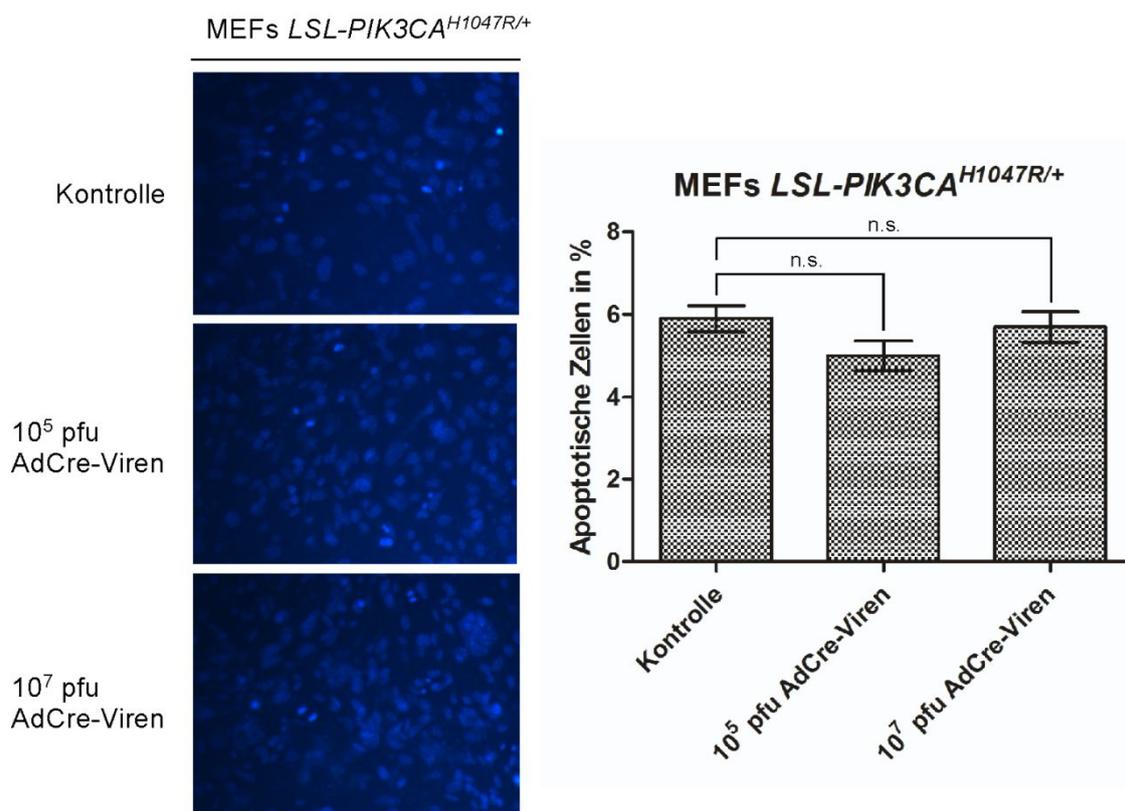


Abbildung 12: Apoptose bei MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*
 MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* ohne (Kontrolle) und nach Inkubation mit 10^5 pfu bzw. 10^7 pfu AdCre-Viren wurden nach Hoechst-Methode angefärbt. Apoptotische Zellen mit blau-fluoreszierendem Chromatin wurden mittels Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht der Wellenlänge 350 nm (Originalvergrößerung 1:100) fotografiert und quantifiziert. Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld \pm SD (n.s., nicht signifikant, t-Test). Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.6. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu reduzierter Seneszenz in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*

Nach Aktivierung des PI3K-Signalwegs mittels AdCre-Vireninjektion zeigten MEFs eine vermehrt spindelzellige Morphologie. Im Gegensatz dazu wiesen die nicht-rekombinierten Kontroll-Zellen mit ihrer breiten, flachen und abgerundeten Morphologie Zeichen seneszenten Zellen auf. Um eine Korrelation zwischen Induktion des PI3K-Signalwegs und Seneszenz nachzuweisen, wurden seneszente MEFs nach Durchführung einer SA- β -Galactosidase(SA- β -gal)-Färbung quantifiziert. Für die Experimente wurden MEFs der Passage 7 (p.7) verwendet, die sich am Übergang einer Phase reduzierteren Wachstums zur Seneszenz befinden. Tuveson und Kollegen konnten nachweisen, dass Wildtyp-MEFs nach 5-10 Passagen seneszent werden und nur noch geringe Wachstumsraten aufweisen. Im Gegensatz dazu fand sich bei MEFs mit konstitutiver *Kras^{G12D}*-Aktivierung keine Wachstumsrestriktion durch Seneszenz (Tuveson, et al., 2004)

Wie exemplarisch für MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* in Abbildung 13 dargestellt, zeigten sich bei den Kontroll-Zellen signifikant höhere Zahlen an seneszenten, SA- β -gal-positiven Zellen im Vergleich zu den mit einer AdCre-Virus-Konzentration von 10^7 pfu behandelten MEFs. Auch konnte ein dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden, da eine höhere Rekombinationsrate der MEFs mit einer verminderten Seneszenz einherging. So fanden sich nach AdCre-Infektion von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* mit 10^5 pfu, entsprechend einer erfolgreichen Rekombination in 35-40% der Zellen, durchschnittlich 7,9 seneszente Zellen pro Gesichtsfeld. Eine Behandlung mit 10^5 pfu AdCre-Viren und folglich Vorliegen von über 95% rekombinierten Zellen, hatte im Durchschnitt das Auftreten von nur 5,6 seneszenten Zellen pro Gesichtsfeld zur Folge.

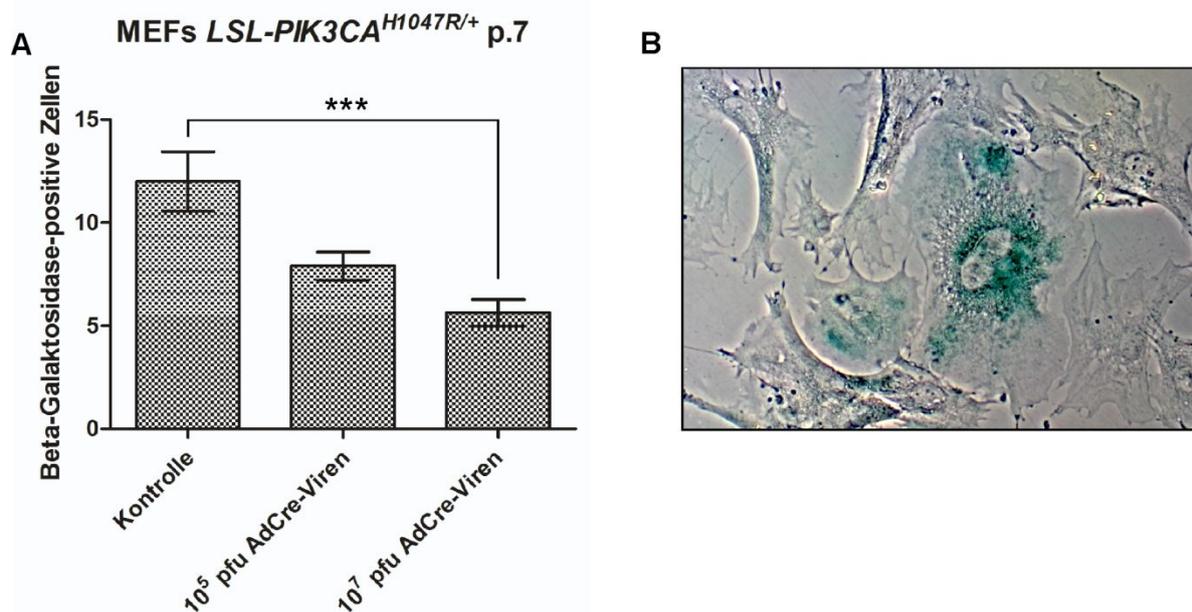


Abbildung 13: Seneszenz in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*

MEFs wurden nach AdCre-Infektion mit der SA- β -Galactosidase-Färbung behandelt. Seneszente Zellen färbten sich blau an. Es wurden je 15 Gesichtsfelder (Originalvergrößerung 1:100) gezählt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Es wurden je zwei Zelllinien MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* und MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* verwendet.

(A) Exemplarisch dargestellt ist der Durchschnitt an seneszenten Zellen bei MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, der mikroskopisch pro Gesichtsfeld quantifiziert wurde. Es zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt, je nach Rekombinationsraten der mit AdCre-Viren behandelten Zellen. (***) $p < 0,001$, t-Test)

(B) Exemplarische Darstellung einer seneszenten Zelle nach SA- β -Galactosidase-Färbung (Originalvergrößerung 1:200)

3.7. MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* und *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* weisen ebenfalls eine reduzierte Seneszenz auf

Eine reduzierte Seneszenz im Vergleich von Kontroll-MEFs zu MEFs mit Aktivierung einer onkogenen Mutation durch Rekombination konnte nicht nur bei MEFs mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* nachgewiesen werden, sondern auch bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* sowie *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}*. Interessanterweise zeigte sich bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* in allen Versuchsgruppen, ob rekombiniert oder nicht, vergleichsweise mehr SA- β -gal-positive Zellen pro Gesichtsfeld. Um zu bestätigen, dass dieser Effekt nicht auf den Eigenschaften einer einzelnen Zelllinie beruht, wurden die Versuche jeweils mit 2 Zelllinien des gleichen Genotyps durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnten bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}#1* ähnliche Zahlen an seneszenten Zellen erhoben werden, wie bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}#2*.

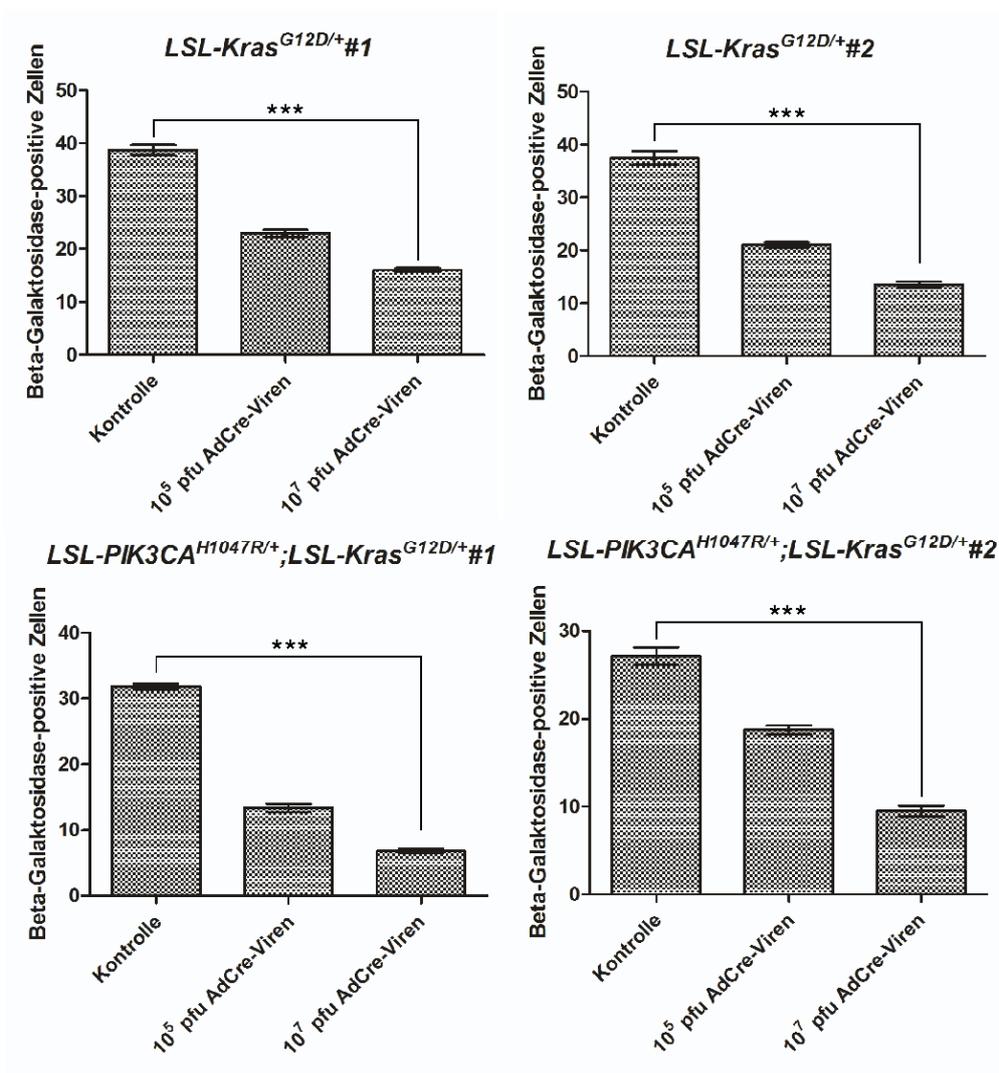


Abbildung 14: Seneszenz in MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ und $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$
 Je zwei Zelllinien MEFs mit dem Genotyp $LSL-Kras^{G12D/+}$ sowie dem Genotyp $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ wurden in Passage 7 nach AdCre-Infektion mit der SA- β -Galactosidase-Färbung behandelt. Seneszente Zellen färbten sich blau an. Es wurden je 15 Gesichtsfelder (Originalvergrößerung 1:100) gezählt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist der Durchschnitt an seneszenten Zellen, der mikroskopisch pro Gesichtsfeld quantifiziert wurde. (***) $p < 0,001$, t-Test).

3.8. Die Induktion des PI3K-Signalwegs führt zu vermehrter Proliferation von MEFs

Karzinome weisen neben vielfältigen anderen Zeichen der malignen Transformation eine erhöhte Zellproliferation auf. Diese wird über die Initiierung von Zellwachstum, Zellzyklusprogression, Metabolismus sowie Hemmung der Apoptose beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das *Kras* Onkogen und seine Effektor-Kaskaden, der ERK- und der PI3K-Signalweg (Steelman, et al., 2011). Um zu analysieren, ob

die Aktivierung des PI3K-Signalwegs durch eine isolierte Mutation im *PIK3CA*-Gen zu einem signifikanten Anstieg des Zellwachstums in unserem Modellsystem führt, wurden für Proliferationsversuche MEFs mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* gemäß in Kapitel 2.2.13 beschriebener Methodik behandelt. Bei dem Vergleich von rekombinierten MEFs (10^7 pfu AdCre-Viren) mit nicht-rekombinierten MEFs (Kontrolle) zeigte sich eine deutlich gesteigerte Proliferation der rekombinierten MEFs, die eine konstitutiv aktive PI3-Kinase exprimierten. Kontroll-MEFs zeigten 4 Tage nach Aussaat einen Anstieg der Zellzahl um 17%, von 1×10^5 auf $1,17 \times 10^5$ Zellen. Bei MEFs, die mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelt wurden, konnte eine Zunahme um 756%, von 1×10^5 Zellen auf $8,56 \times 10^5$ Zellen, nachgewiesen werden (Abbildung 15). Interessanterweise kam es bei den, mit 10^5 pfu AdCre-Viren behandelten, MEFs zu einem intermediären Anstieg der Zellzahl um 407%, von 1×10^5 auf $5,07 \times 10^5$ Zellen, entsprechend einem dosisabhängigen Effekt. Dies kann dadurch erklärt werden kann, dass nur 35-40% der ausgesäten Zellen das rekombinierte *PIK3CA^{H1047R}*-Gen besitzen, das mit einer erhöhten Proliferation vergesellschaftet ist

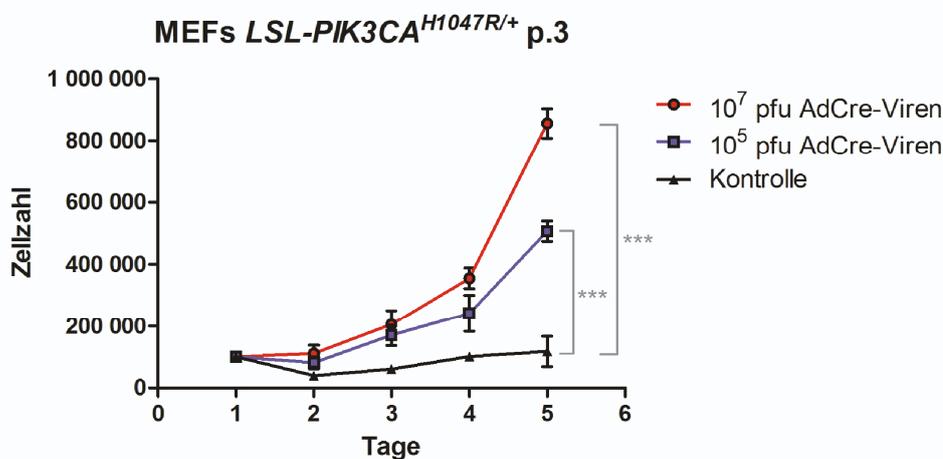


Abbildung 15: Proliferation von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* nach Rekombination

Eine definierte Menge MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* p.3 wurde 24 Stunden nach Behandlung mit 10^5 pfu oder 10^7 pfu AdCre-Viren bzw. unbehandelt (Kontrolle) ausgesät. Anschließend erfolgte täglich eine Bestimmung der Zellzahl. Es wurden zwei Zelllinien MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* verwendet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Daten zeigen das durchschnittliche Zellwachstum \pm SD (***) $p < 0,001$, t-Test)

3.8.1. Abhängigkeit der Proliferation von rekombinierten MEFs von der Passage

In weiteren vergleichenden Analysen zeigten sich die absoluten Zellzahlen im Proliferationsversuch abhängig von der Passage der Zelllinie. Entsprechend dem Wachstumsverhalten von MEFs konnte bei rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* der Passage 3 (p.3), die mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelt wurden, ein ausgeprägtes Wachstum von 10^5 auf $8,56 \times 10^5$ Zellen (+756%) nach vier Tagen beobachtet werden. Schon nach der sechsten Passage (p.6) war der Zellzuwachs mit 119% (von 2×10^5 auf $4,39 \times 10^5$ Zellen in vier Tagen) weniger ausgeprägt (Abbildung 16). In der Versuchsreihe der MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* p.6 wurde zu Beginn eine größere Anzahl Zellen ausgesät, um eine ausreichende Zelldichte zu gewährleisten. Für nachfolgende Proliferationsversuche wurden MEFs p.6 als Standard eingesetzt.

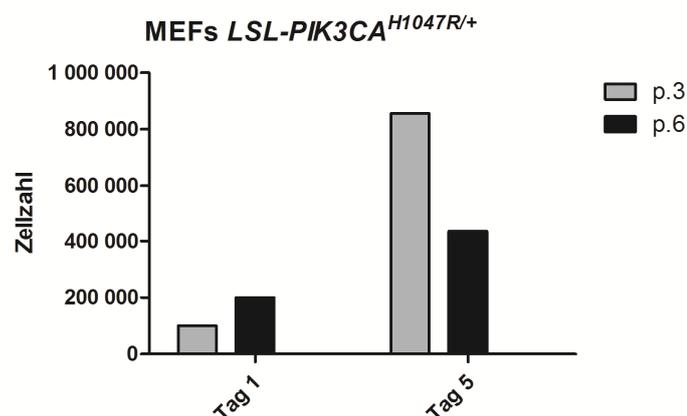


Abbildung 16: Proliferation von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* in Abhängigkeit von der Passage
 MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* wurden mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelt und nach einem Tag bzw. an Tag 5 quantifiziert. Dargestellt ist das jeweilige Zellwachstum rekombinierter MEFs nach 3 Passagen und nach 6 Passagen. Um eine ausreichende Zelldichte zu gewährleisten, wurden 10^5 MEFs p.3 und 2×10^5 MEFs p.6 ausgesät. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.9. MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}* und *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* zeigen ähnliche Proliferationsverhalten

Im Hinblick auf den beschriebenen Proliferations-Phänotypen von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* bei alleiniger *PIK3CA^{H1047R}*-Mutation wurden die Auswirkungen einer isolierten *Kras^{G12D}*-Mutation und kombinierten *PIK3CA^{H1047R}*- und *Kras^{G12D}*-Mutation

auf die Proliferation untersucht. Zum Vergleich der drei Genotypen wurden MEFs der Passage 6 verwendet. Bei MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ konnte nach Behandlung mit 10^7 pfu AdCre-Viren ein Anstieg der Zellzahl um 124,5%, von 2×10^5 auf $4,49 \times 10^5$ Zellen festgestellt werden (Abbildung 17). Auch bei MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ zeigten sich nach Infektion mit AdCre-Viren signifikant höhere Wachstumsraten als bei Kontroll-MEFs. So konnte bei MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ nach Behandlung mit 10^7 pfu AdCre-Viren, entsprechend einer über 95%igen Rekombination, ein Wachstum um 222,8%, von 2×10^5 auf $6,46 \times 10^5$ Zellen, nachgewiesen werden. Bei MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ führte die Behandlung mit 10^7 pfu AdCre-Viren zu einer Zunahme der Zellzahl um 109%, von 2×10^5 Zellen auf $4,18 \times 10^5$ Zellen.

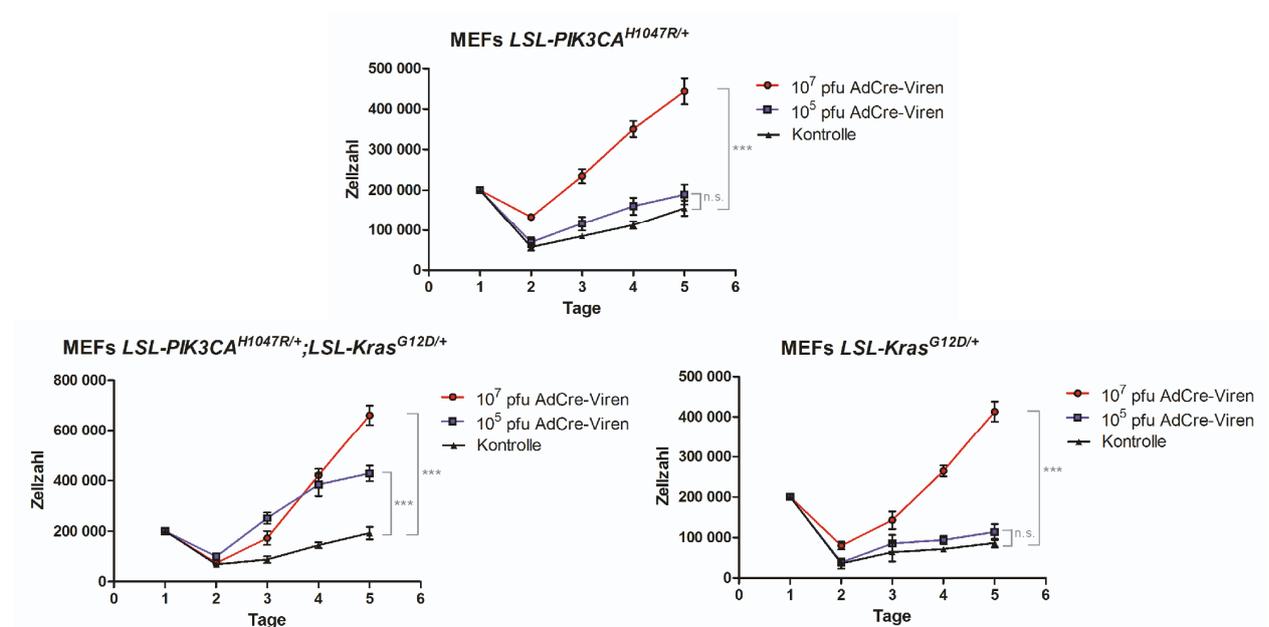


Abbildung 17: Proliferation von MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$

MEFs der Passagen 6 wurden 24 Stunden nach Behandlung mit 10^5 pfu oder 10^7 pfu AdCre-Viren bzw. unbehandelt (Kontrolle) ausgesät. Anschließend erfolgte täglich eine Bestimmung der Zellzahl. Es wurden je zwei Zelllinien MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ verwendet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Daten zeigen das durchschnittliche Zellwachstum \pm SD (n.s., nicht signifikant, *** $p < 0,001$, t-Test)

Interessanterweise zeigte die absolute Zunahme der Zellzahl im Proliferationsversuch nach Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit einer Konzentration von 10^7 pfu AdCre-Viren keine signifikanten Unterschiede. Nach 4 Tagen konnte bei den rekombinierten MEFs eine durchschnittliche Wachstumsrate von 114,8% beobachtet werden, unabhängig vom Genotyp der Zelllinien (Abbildung 18).

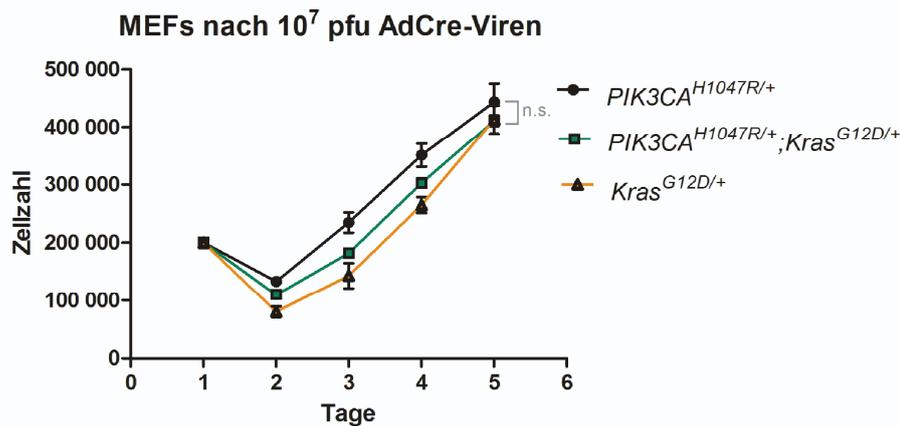


Abbildung 18: Wachstumsraten von MEFs nach Behandlung mit 10^7 pfu AdCre-Viren
 Nach Behandlung mit 10^7 pfu AdCre-Viren erfolgte täglich eine Bestimmung der Zellzahl. Es wurden je zwei Zelllinien MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ verwendet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Daten zeigen das durchschnittliche Zellwachstum \pm SD (n.s., nicht signifikant, t-Test)

3.10. Die Blockade des PI3K-Signalwegs vermindert die Proliferation von MEFs

Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika gegen Tumorentstehung und -wachstum stehen eine Vielzahl an Raf/MAP/ERK- und PI3K/AKT-Inhibitoren zur Verfügung (Courtney, et al., 2010). Um die Effekte dieser Inhibitoren auf die Proliferation von MEFs mit Expression von verschiedenen Onkogenkombinationen zu analysieren, wurden in dieser Arbeit Versuche mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 durchgeführt. GDC-0941 befindet sich als effizienter PI3K-Inhibitor momentan in klinischer Entwicklung (Alagesan et al., 2015; Ehrhardt et al., 2015; Lehmann et al., 2014; LoRusso et al., 2011; Sarker et al., 2015; Yuan, et al., 2013). Auch die Wirkung des AKT-Inhibitors MK-2206 auf verschiedene Tumorarten wird in klinische Studien untersucht (Wilson et al., 2014; Yap et al., 2014; Zhao et al., 2014).

Für die Versuche wurden MEFs verschiedener Genotypen mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelt. Die MEFs zeigten nach Rekombination und Aktivierung der jeweiligen onkogenen Mutation eine erhöhte Proliferation. Um den Effekt der Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206 auf den jeweiligen, durch konstitutive Expression von $PIK3CA^{H1047R}$ bzw. $Kras^{G12D}$, aktivierten Signalweg zu untersuchen, wurden MEFs der Passage 10-12 gemäß in Kapitel 2.2.14 beschriebener Methodik behandelt und quantifiziert. Die Zelllinie $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ zeigte während der Inkubation mit dem

PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 ein deutlich reduziertes Wachstum gegenüber der DMSO-behandelte Kontroll-Gruppe (Abbildung 19). Nach 4 Tagen Inkubation mit GDC-0941 konnte eine Zellzunahme um 31,5%, von 2×10^5 auf $2,63 \times 10^5$ nachgewiesen werden. Bei der mit MK-2206 behandelten Gruppe fand sich ein Wachstum um 127%, von 2×10^5 auf $4,54 \times 10^5$ Zellen. Die DMSO-behandelte Kontroll-Gruppe zeigte im Gegensatz dazu eine ungebremste Proliferation von 2×10^5 auf 13×10^5 Zellen (+ 550%). Das Zellwachstum wurde somit durch GDC-0941-Behandlung um 94% und durch MK-2206-Behandlung um 77% reduziert. Dieser signifikante Effekt konnte auch bei MEFs mit dem Genotypen $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ nachgewiesen werden. Das Wachstum dieser Zelllinie zeigte sich nach Inhibitoren-Behandlung jedoch etwas weniger gehemmt als bei MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$. Die Reduktion des Zellwachstums lag nach GDC-0941-Behandlung bei 56% und nach MK-2206-Behandlung bei 33%. Im Unterschied dazu konnte bei MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ nach Behandlung mit MK-2206 kein signifikanter Rückgang der Proliferation nachgewiesen werden.

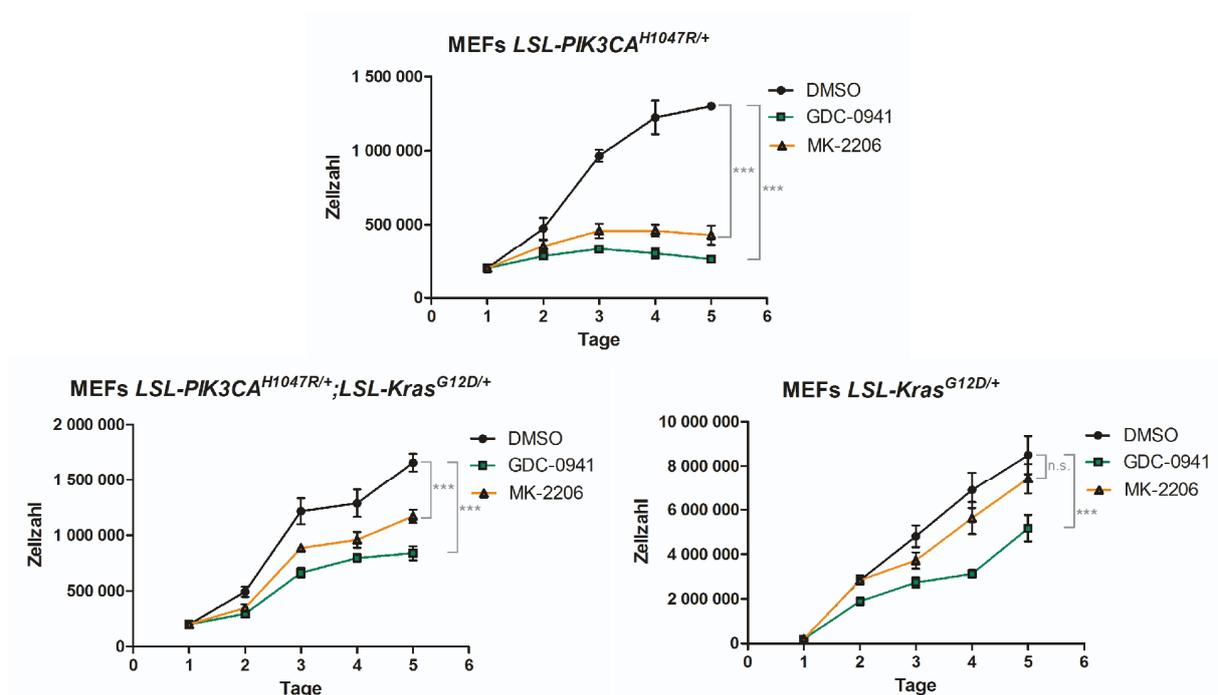


Abbildung 19: Proliferationshemmung durch Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206

Die Inhibitionsversuche erfolgten mit MEFs der Passage 10-12, die initial mittels 10^7 pfu AdCre-Viren rekombiniert wurden. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und in einer 1:5000 Verdünnung mit DMEM auf die Zellen gegeben. Während der Inkubation mit DMSO (Kontrolle) sowie den Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206 erfolgte eine tägliche Quantifizierung der Zellzahl und graphische Darstellung als Wachstumskurve. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Es wurden je eine Zelllinie MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ verwendet. Die Daten zeigen den durchschnittlichen Zellwachstum \pm SD (n.s., nicht signifikant, *** $p < 0,001$, t-Test)

3.10.1. PI3K-Inhibitor GDC-0941

Die Behandlung von rekombinierten MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, die eine konstitutiv aktive PI3-Kinase enthalten, mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 resultierte in einer effizienten Wachstumshemmung (Abbildung 20). Die vormals konstitutiv aktive PI3-Kinase, die über Aktivierung des PI3K-Signalwegs eine Proliferation bewirkt hatte, wurde inhibiert. Das Wachstum von MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ nach Inhibitor-Behandlung zeigte sich ähnlich dem von Kontroll-MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ ohne Rekombination (vgl. Abbildung 17). Diese Wachstumshemmung konnte auch in MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Behandlung mit GDC-0941 bei MEFs mit alleiniger $Kras^{G12D}$ -Mutation nicht diesen ausgeprägten Rückgang des Zellwachstums. Die Zellzahlen unterschieden sich nach 4-tägiger Inkubation mit dem Inhibitor je nach Genotyp signifikant (Abbildung 20).

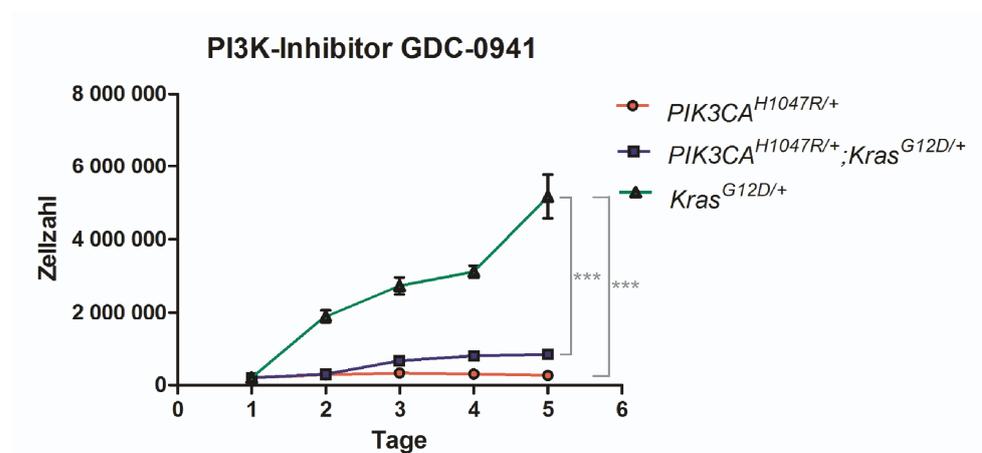


Abbildung 20: Proliferationshemmung durch PI3K-Inhibitor GDC-0941

Der Inhibitionsversuch erfolgte mit MEFs der Passage 10-12, die initial mittels 10^7 pfu AdCre-Viren rekombiniert wurden. Der Inhibitor GDC-0941 wurde in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und in einer 1:5000 Verdünnung mit DMEM auf die Zellen gegeben. Während der Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor erfolgte eine tägliche Zellquantifizierung und graphische Darstellung als Wachstumskurve. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Es wurden je eine Zelllinie MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$, MEFs $LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und MEFs $LSL-Kras^{G12D/+}$ verwendet. Die Daten zeigen das durchschnittliche Zellwachstum \pm SD (***) $p < 0,001$, t-Test)

3.10.2. AKT-Inhibitor MK-2206

Bei Versuchen mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 zeigte sich analog der Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 eine deutliche Wachstumshemmung von MEFs mit aktivierter *PIK3CA*^{H1047R}-Mutation und MEFs mit kombinierter *PIK3CA*^{H1047R}- und *Kras*^{G12D}-Mutation. Das Wachstum von rekombinierten MEFs *LSL-Kras*^{G12D/+} hingegen wurde unter dem Inhibitor MK-2206 nicht reduziert, sodass sich auch hier die Zellzahlen nach 4-tägiger Inkubation je nach Genotyp signifikant unterschieden (Abbildung 21).

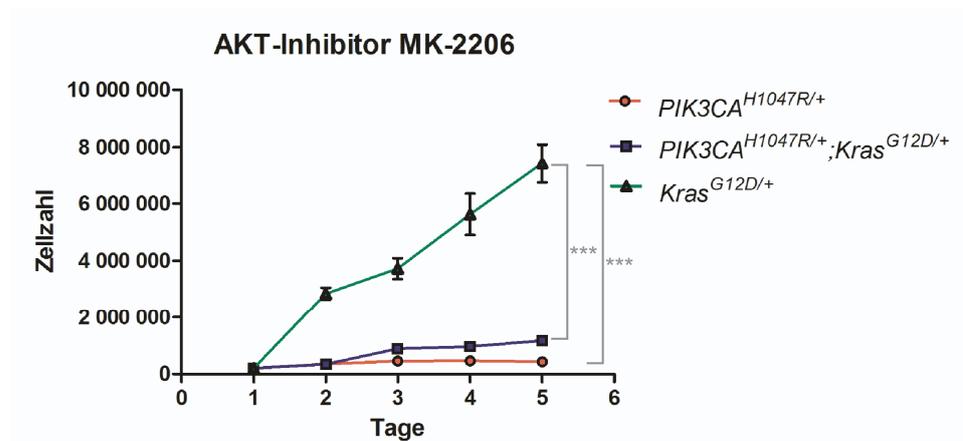


Abbildung 21: Proliferationshemmung durch AKT-Inhibitor MK-2206

Der Inhibitionsversuch erfolgte mit MEFs der Passage 10-12, die initial mittels 10^7 pfu AdCre-Viren rekombiniert wurden. Der Inhibitor MK-2206 wurde in einer Konzentration von 5 mM in DMSO gelöst und in einer 1:5000 Verdünnung mit DMEM auf die Zellen gegeben. Während der Inkubation mit dem AKT-Inhibitor erfolgte eine tägliche Zellquantifizierung und graphische Darstellung als Wachstumskurve. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Es wurden je eine Zelllinie MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}, MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} und MEFs *LSL-Kras*^{G12D/+} verwendet. Die Daten zeigen das durchschnittliche Zellwachstum \pm SD (***) ($p < 0,001$, t-Test)

3.11. Die Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206 führen zu einer Dephosphorylierung von PI3K-Substraten

Um die wachstumshemmende Wirkung der Inhibitoren auf MEFs auch auf molekularer Ebene zu analysieren, wurden Western Blots rekombinierter MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} vor und vier bzw. sechs Stunden nach Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 angefertigt (Abbildung 22). Die mit DMSO behandelten Kontroll-MEFs mit weiterhin konstitutiv exprimierter

PIK3CA^{H1047R} zeigten eine Phosphorylierung von AKT-Thr308 und AKT-Ser473, entsprechend der Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Nach Inhibitoren-Behandlung und somit Blockade der aktiven Kinase *PIK3CA*^{H1047R} und Proteinkinase AKT konnte eine deutlich geringere Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden. Auch das AKT-Substrat GSK3 β wies in, mit Inhibitoren behandelten, MEFs eine reduzierte Phosphorylierung auf, vergleichbar mit der fehlenden Phosphorylierung in MEFs ohne konstitutive PI3K-Signalweg-Aktivierung (siehe Kapitel 3.2). Dies bestätigt, dass die Proliferation ebenso wie die Wachstumshemmung in MEFs über eine isolierte Aktivierung bzw. Blockade des PI3K-Signalwegs gesteuert werden kann.

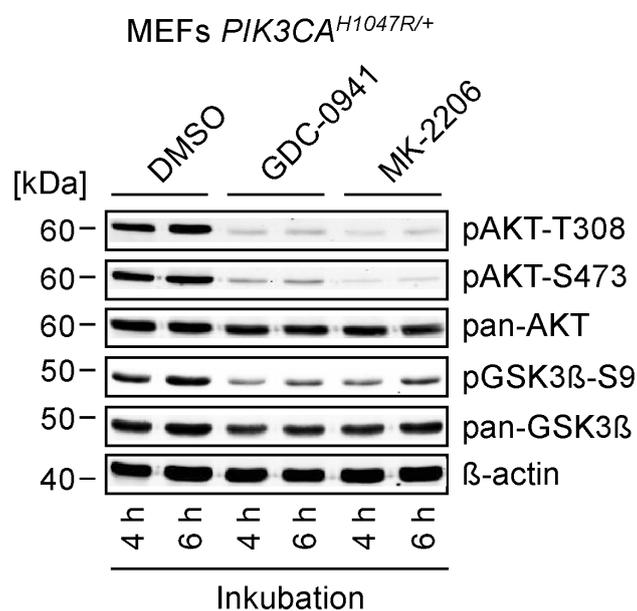


Abbildung 22: Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Hemmung in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} nach Inkubation mit den Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206

Phosphorylierung von Effektorproteinen des PI3K-Signalwegs in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} nach vier- bzw. sechs-stündiger Inkubation mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 im Vergleich zu unbehandelten MEFs (DMSO). β -actin diente als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung.

3.12. Rekombination aktiviert in MEFs Gen-Gruppen von Zellteilung, Metabolismus und Karzinomen

Zur Bestimmung der relativen Änderung der Genexpressionslevels zwischen rekombinierten und Kontroll-MEFs wurden Microarrays der jeweiligen Zell-mRNA, die in cDNA umgeschrieben wurde, angefertigt. Dies erfolgte nach Protokollen des Ambion® WT Expression Kits und des Affymetrix® Gene Chip® WT Terminal

Labeling Kits unter Verwendung eines Affymetrix® Mouse Gene Chip1.0 ST. Erhobene Daten wurden mittels der vom Broad Institute zur Verfügung gestellten Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Software ausgewertet (Subramanian, et al., 2005). Mit dieser Methode wird nicht nur die Expression einzelner Gene dargestellt, sondern nach Aktivierung oder Hemmung von Gen-Gruppen gesucht, die gemeinsam für bestimmte molekulargenetische Abläufe in Zellen, wie Metabolismus, Signaltransduktion, Proliferation oder Apoptose, verantwortlich sind. Die Gruppierung der Gene erfolgte unter Verwendung der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY Datenbank, die eine Vielzahl von Signalwegen beinhaltet. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, erfolgte die Gegenüberstellung der Genexpressionslevels von mit 10^7 pfu AdCre-Viren behandelten MEFs und Kontroll-MEFs von jeweils zwei Zelllinien des gleichen Genotyps. Von Interesse waren hierbei die Gen-Gruppen, die in rekombinierten MEFs ein differenzielles Expressionslevel im Gegensatz zu Kontroll-MEFs aufwiesen. Nach adenoviraler Rekombination konnte in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* und MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};*LSL-Kras^{G12D/+}* interessanterweise eine Aktivierung von ähnlichen Gen-Gruppen nachgewiesen werden. Einige sind assoziiert mit der Zellteilung, wie die Gen-Gruppe Zellzyklus, sowie Reparaturmechanismen, wie Gen-Gruppen Nukleotid-Exzisions-Reparatur oder homologe Rekombination. Andere spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus, wie die Gen-Gruppen Purin-Metabolismus, Aminoacyl-tRNA-Biosynthese oder Proteinexport (Tabelle 2 und Tabelle 3). Beispielsweise zeigte sich in beiden Zelllinien eine deutliche Stimulation des Pyrimidin-Metabolismus und der DNA-Replikation (Abbildung 23 und Abbildung 24). In rekombinierten MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* hingegen kam es im Vergleich zu Kontroll-MEFs zu einer Stimulation von Gen-Gruppen, die inflammatorische Prozesse steuern, wie dem B-Zell-Rezeptor-Signalweg, der natürliche-Killerzellen-vermittelten Zytotoxizität oder dem Chemokin-Signalweg. Interessanterweise fand sich auch eine Aktivierung von Gen-Gruppen, die mit verschiedenen Tumoren assoziiert sind, unter anderem mit dem kolorektalen Karzinom, dem Gliom, dem Nierenzellkarzinom oder dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Tabelle 4). Insbesondere konnte auch eine Aktivierung der Gene nachgewiesen werden, die eine entscheidende Rolle im Pankreaskarzinom spielen (Abbildung 25).*

Tabelle 2: Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* nach Rekombination

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Aminoacyl-tRNA-Biosynthesis	2,65	0,000	0,000
DNA-Replication	2,57	0,000	0,000
Spliceosome	2,43	0,000	0,000
Pyrimidine-Metabolism	2,36	0,000	0,000
RNA-Degradation	2,25	0,000	0,000
Ribosome	2,21	0,000	0,000
Nucleotide-Excision-Repair	2,19	0,000	0,000
RNA-Polymerase	2,11	0,000	0,000
Proteasome	2,08	0,000	0,000
Purine-Metabolism	2,03	0,000	0,001
Homologous Recombination	1,93	0,000	0,002
Glyoxylate- and Dicarboxylate-Metabolism	1,93	0,002	0,002
Basal Transcription-Factors	1,90	0,002	0,002
Mismatch-Repair	1,88	0,002	0,003
Glycolysis-Gluconeogenesis	1,86	0,000	0,004
Cysteine- and Methionine-Metabolism	1,85	0,000	0,004
Huntingtons Disease	1,84	0,000	0,005
Terpenoid Backbone Metabolism	1,80	0,006	0,008
Base-Excision-Repair	1,78	0,006	0,009
Gluthation-Metabolism	1,76	0,002	0,011
Pantothenate- and CoA-Biosynthesis	1,75	0,009	0,011
Nicotinate- and Nicotinamide-Metabolism	1,74	0,010	0,011
Fructose- and Mannose-Metabolism	1,70	0,002	0,017
Butanoate-Metabolism	1,66	0,009	0,022
Glycine-, Serine-, and Threonine-Metabolism	1,66	0,010	0,021
Pentose-Phosphate-Pathway	1,65	0,010	0,021
Citrate-Cycle, TCA-Cycle	1,64	0,010	0,022
Cell-Cycle	1,58	0,002	0,036
Pyrovate-Metabolism	1,55	0,026	0,047
Selenoamino-Acid-Metabolism	1,53	0,045	0,052
Oxidative Phosphorylation	1,51	0,006	0,057
Parkinsons Disease	1,48	0,008	0,069
Arginine- and Proline-Metabolism	1,47	0,023	0,071
Protein-Export	1,45	0,059	0,084
P53-Signaling-Pathway	1,44	0,040	0,085

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Lysine-Degradation	1,43	0,048	0,087
Alanine-, Aspartate- and Glutamate-Metabolism	1,43	0,061	0,085
Biosynthesis of unsaturated Fatty Acids	1,43	0,082	0,083
Porphyrin- and Chlorophyll-Metabolism	1,43	0,063	0,081
Galactose-Metabolism	1,39	0,081	0,104
Propanoate-Metabolism	1,38	0,087	0,111
Amino-Sugar- and Nucleotide-Sugar-Metabolism	1,35	0,089	0,127
Drug-Metabolism other Enzymes	1,33	0,113	0,141
Starch- and Sucrose-Metabolism	1,32	0,121	0,150
Amyotrophic Lateral Sclerosis	1,31	0,086	0,153

Dargestellt sind die aktivierten Gen-Gruppen in zwei Zelllinien MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* nach Rekombination im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Aufgelistet sind alle Gen-Gruppen mit einer false discovery rate (FDR q-val) < 0,25, absteigend sortiert nach dem normalized enrichment score (NES). NOM p-val: nominal p-value.

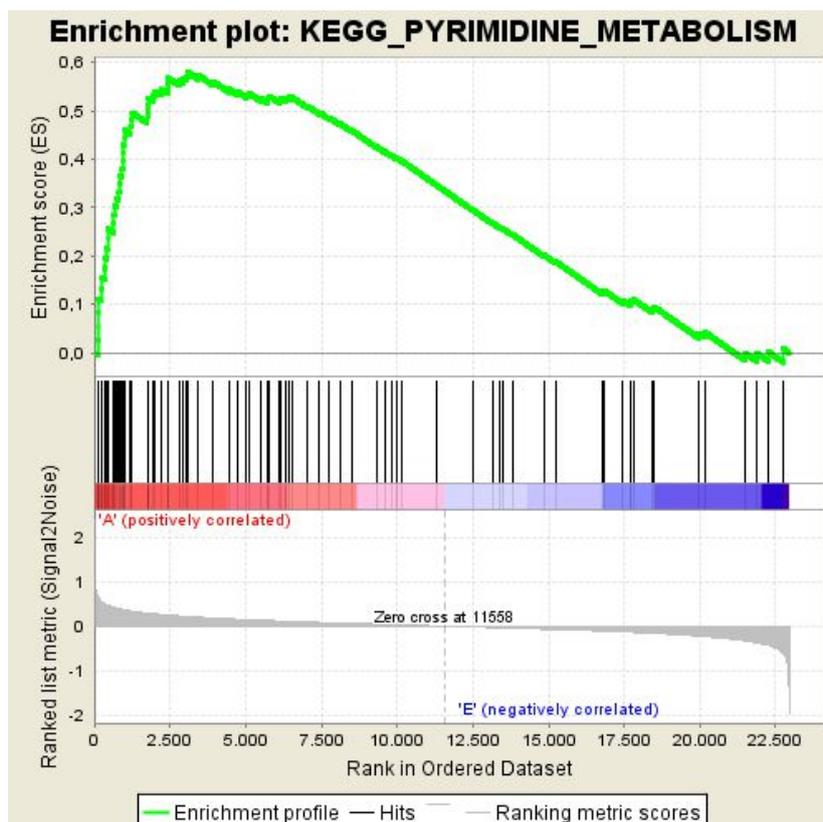


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Gen-Gruppe des Pyrimidin-Metabolismus in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*
 Profil des Enrichment Scores (ES) und Verteilung der einzelnen Gene der Gen-Gruppe des Pyrimidin-Metabolismus in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Tabelle 3: Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*; *LSL-Kras^{G12D/+}* nach Rekombination

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
DNA-Replication	2,38	0,000	0,000
Cell-Cycle	2,24	0,000	0,000
Spliceosome	2,23	0,000	0,000
Pyrimidine-Metabolism	2,16	0,000	0,000
Ribosome	2,15	0,000	0,000
Aminoacyl-tRNA-Biosynthesis	2,14	0,000	0,000
Homologous Recombination	1,96	0,000	0,002
Purine-Metabolism	1,91	0,000	0,003
Base-Excision-Repair	1,88	0,002	0,005
RNA-Degradation	1,87	0,004	0,005
Mismatch-Repair	1,84	0,006	0,007
P53-Signaling-Pathway	1,71	0,004	0,028
Oocyte-Meiosis	1,65	0,005	0,048
RNA-Polymerase	1,62	0,014	0,055
Drug-Metabolism other Enzymes	1,62	0,008	0,052
Pentose-Phosphate-Pathway	1,59	0,028	0,065
Nucleotide-Excision-Repair	1,57	0,011	0,070
Small Cell Lung Cancer	1,54	0,013	0,083
Selenoamino-Acid-Metabolism	1,53	0,031	0,086
Nicotinate- and Nicotinamide-Metabolism	1,51	0,029	0,090
Protein-Export	1,51	0,034	0,092
Glyoxylate- and Dicarboxylate-Metabolism	1,48	0,046	0,104
Cysteine- and Methionine-Metabolism	1,46	0,046	0,121
Renin-Angiotensin-System	1,46	0,083	0,119
Lysine-Degradation	1,38	0,076	0,196
Alanine-, Aspartate- and Glutamate-Metabolism	1,37	0,070	0,192
Parkinsons Disease	1,37	0,041	0,190
Huntingtons Disease	1,34	0,017	0,216
Amyotrophic Lateral Sclerosis	1,33	0,094	0,232
Progesteron-mediated Oocyte-Maturation	1,32	0,086	0,242
Systemic Lupus Erythematosus	1,31	0,070	0,240
Nod like Receptor-Signaling-Pathway	1,30	0,089	0,249
Rig I like Receptor-Signaling-Pathway	1,29	0,101	0,254
Cytosolic DNA-sensing-Pathway	1,29	0,122	0,250

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Viral Myocarditis	1,29	0,109	0,242
Complement- and Coagulation-Cascades	1,29	0,089	0,241

Dargestellt sind die aktivierten Gen-Gruppen in zwei Zelllinien MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* nach Rekombination im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Aufgelistet sind alle Gen-Gruppen mit einer false discovery rate (FDR q-val) < 0,25, absteigend sortiert nach dem normalized enrichment score (NES). NOM p-val: nominal p-value.

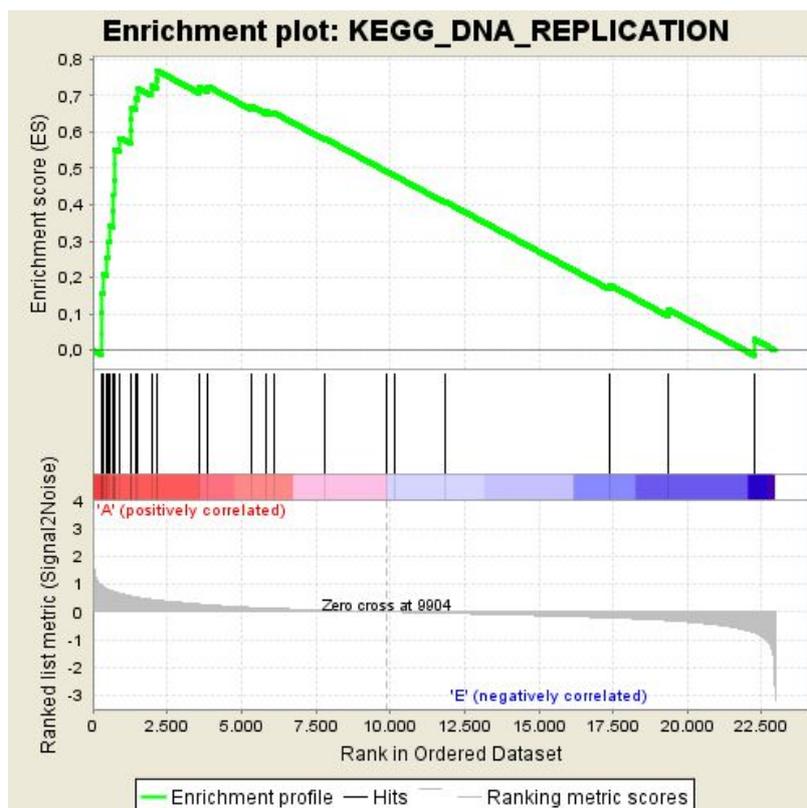


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Gen-Gruppe der DNA-Replikation in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}*

Profil des Enrichment Scores (ES) und Verteilung der einzelnen Gene der Gen-Gruppe der DNA-Replikation in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Tabelle 4: Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* nach Rekombination

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Leishmania Infection	2,28	0,000	0,002
Toll like Receptor-Signaling-Pathway	2,28	0,000	0,001
Nod like Receptor-Signaling-Pathway	2,17	0,000	0,002
Renin-Angiotensin-Pathway	2,15	0,000	0,002

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Chemokine-Signaling-Pathway	2,10	0,000	0,004
B-Cell- Receptor-Signaling-Pathway	2,05	0,000	0,005
Jak-Stat- Signaling-Pathway	1,97	0,000	0,012
Fc-Epsilon-Ri-Signaling-Pathway	1,94	0,000	0,012
Fc-Gamma-R-mediated-Phagocytosis	1,88	0,003	0,019
Hematopoetic-Cell-Lineage	1,87	0,000	0,019
Nicotinate- and Nicotinamide-Metabolism	1,86	0,005	0,021
Glioma	1,85	0,003	0,021
Cytosolic-DNA-Sensing-Pathway	1,84	0,000	0,021
Colorectal Cancer	1,81	0,003	0,027
O-Glycan-Biosynthesis	1,75	0,018	0,041
Natural-Killer-Cell-Mediated-Cytotoxicity	1,74	0,000	0,042
Chronic myeloid Leukemia	1,72	0,000	0,044
ErbB-Signaling-Pathway	1,71	0,003	0,045
Apoptosis	1,71	0,003	0,044
Starch- and Sucrose-Metabolism	1,70	0,008	0,045
Fatty-acid-Metabolism	1,69	0,008	0,045
Pancreatic Cancer	1,69	0,000	0,045
Systemic Lupus Erythematosus	1,67	0,000	0,051
N-Glycan-Biosynthesis	1,62	0,021	0,065
T-Cell-Receptor-Signaling-Pathway	1,61	0,000	0,070
Renal Cell-Carcinoma	1,59	0,019	0,075
Rig-I-like Receptor-Signaling-Pathway	1,59	0,023	0,073
Glycosphingolipid-Biosynthesis, Ganglio-series	1,59	0,031	0,071
Non-small-lung-Cancer	1,58	0,015	0,071
Lysosome	1,55	0,008	0,089
Cytokine-Cytokine-Receptor-Interaction	1,55	0,000	0,086
Drug-Metabolism other Enzymes	1,54	0,033	0,089
Spliceosome	1,54	0,014	0,089
Leukocyte Transendothelial Migration	1,54	0,005	0,088
Neutrophin-Signaling-Pathway	1,53	0,000	0,088
Type II Diabetes mellitus	1,53	0,040	0,086
Pathways in Cancer	1,50	0,000	0,098
Aldosterone regulated Sodium-Reabsorption	1,49	0,036	0,103
RNA-Degradation	1,49	0,021	0,103
Cell-Adhesion-Molecules-Cams	1,48	0,012	0,108

Gen-Gruppe	NES	NOM p-val	FDR q-val
Peroxisome	1,45	0,023	0,123
PPAR-Signaling-Pathway	1,44	0,042	0,126
Adherens-Junction	1,44	0,028	0,127
Complement- and Coagulation-Cascades	1,44	0,037	0,126
Amyotrophic Lateral Sclerosis	1,42	0,050	0,137
Glycosphingolipid-Biosynthesis, Lacto- and Neolacto-Series	1,40	0,081	0,144
MAPK-Signaling Pathway	1,39	0,009	0,157

Dargestellt sind die aktivierten Gen-Gruppen in zwei Zelllinien MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* nach Rekombination im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Aufgelistet sind alle Gen-Gruppen mit einer false discovery rate (FDR q-val) < 0,25, absteigend sortiert nach dem normalized enrichment score (NES). NOM p-val: nominal p-value.

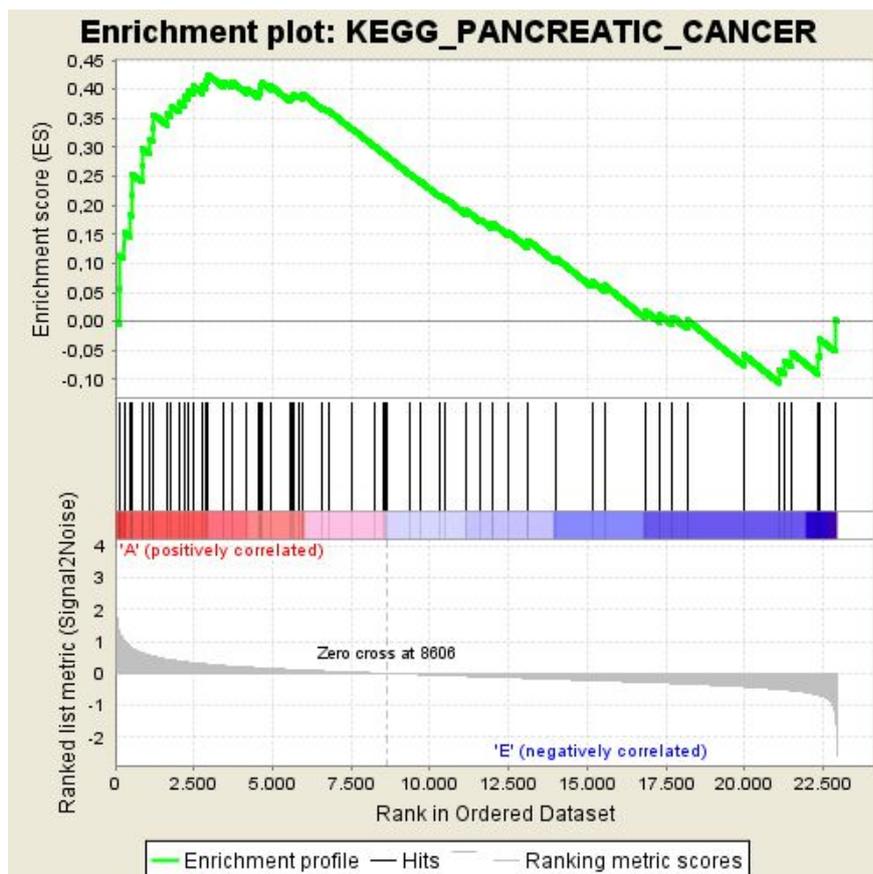


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Gen-Gruppe des Pankreaskarzinoms in rekombinierten MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}*

Profil des Enrichment Scores (ES) und Verteilung der einzelnen Gene der Gen-Gruppe des Pankreaskarzinoms in rekombinierten MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* im Vergleich zu Kontroll-MEFs unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

4. Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt mit einer Fünfjahresüberlebensrate von unter 1% eine Tumorentität mit einer der schlechtesten Prognosen dar (Carpelan-Holmström, et al., 2005). Dies lässt sich zurückführen auf die meist späte Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium und das reduzierte Ansprechen von Pankreaskarzinomen auf bisher eingesetzte Chemotherapeutika (Kothari et al., 2013). Im Laufe jahrzehntelanger Forschung konnten viele genetische Mutationen, die regelhaft in Pankreaskarzinomzellen nachweisbar sind, identifiziert werden. Jedoch bedarf es zur Entwicklung erfolgsversprechender Therapiemöglichkeiten eine größere spezifische Kenntnis der molekulargenetischen Vorgänge während der Karzinogenese. Zur Analyse dieser Veränderungen sind reproduzierbare Tier- bzw. Zell-Modelle unerlässlich.

4.1. Adenovirale Cre-Rekombinase zeigt hohe Rekombinationsraten in MEFs

Um spezifische molekulargenetische Veränderungen nach kontrollierter Mutation einzelner Gene analysieren zu können, wurden verschiedene Maus- und Zellmodelle generiert. Das vielfältig eingesetzte Cre/loxP-System ermöglicht hierbei eine gezielte und gewebespezifische Rekombination des gewünschten Gens bei Zugabe einer Cre-Rekombinase, wobei eine Vielzahl an Cre-Mauslinien zur Verfügung stehen (Muzumdar, et al., 2007). Um eine konstitutive PIK3CA^{H1047R}-Expression zu erreichen, setzten Collisson und Kollegen eine Pdx1-CreER^{T2}-Mauslinie mit Tamoxifen-Induktion ein (Collisson, et al., 2012). Alternativ dazu wurde eine Aktivierung der PIK3CA^{H1047R}-Expression unter Verwendung einer Ptf1a^{Cre}-Mauslinie gezeigt (Eser, et al., 2013). Die Möglichkeit eine Rekombination ohne Verwendung einer Cre-Mauslinie besteht bei Einsatz einer adenoviralen Cre-Rekombinase (Wang, et al., 1995). Der Vorteil hierbei ist, dass eine gezielte Rekombination an ausgewählten Zeitpunkten der Zellentwicklung möglich ist, analog der Tamoxifen-induzierten Cre-Aktivierung in Pdx1-CreER^{T2}-Mauslinien. Zur Kontrolle der erfolgten Rekombination eignen sich Reporter-Gene, die einen bestimmten Marker enthalten (z.B. EGFP, LacZ, EYFP, ECFP) (Srinivas et al., 2001). In dieser Arbeit wurde eine

adenovirale Cre-Rekombinase zur Initiierung der konstitutiven PIK3CA^{H1047R}- und Kras^{G12D}-Expression eingesetzt. Um eine erfolgreiche Rekombination zu beweisen wurden MEFs *R26-mT-mG⁺* verwendet. Aufgrund einer Expression von EGFP nach erfolgreicher Rekombination konnte nachgewiesen werden, dass eine AdCre-Behandlung mit einer Viren-Konzentration von 10⁷ pfu in MEFs nach vier Tagen zu Rekombinationsraten von über 95% führt. Diese hohe Rekombinations-Effizienz wurde auch von Tuveson und Kollegen bei MEFs mit dem Genotyp *LSL-Kras^{G12D/+}* beschrieben (Tuveson, et al., 2004). Eine adenovirale Cre-Rekombinase gewährleistet somit in MEFs mit Cre/loxP-System eine effiziente und schnell umsetzbare Rekombination mit nachfolgender Expression des gewünschten Gens. Dies und die Tatsache, dass die Rekombination zu einem bestimmten Zeitpunkt der Zellentwicklung gewählt werden kann, zeigen, dass MEFs mit Cre/loxP-System ein sehr gutes Modell darstellen, um onkogene Signalwege in einem definierten genetischen System zu untersuchen.

4.2. Aktivierung des PI3K-Signalwegs und Raf/MAP/ERK-Signalwegs in MEFs

Der PI3K-Signalweg ist in einer Vielzahl menschlicher Tumore aktiviert, wobei er einen Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Metabolismus und Zellüberleben hat. Eine Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt über onkogenes *Kras*, Rezeptortyrosinkinasen oder G-proteingekoppelte Rezeptoren (Courtney, et al., 2010). Nach Umwandlung von PIP₂ in PIP₃ durch die aktive Klasse I-PI3-Kinase wird die Proteinkinase AKT aktiviert. Dies erfolgt durch Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 durch PDK 1 oder an Serin 473 durch den mTOR-Komplex 2 (Dumble, et al., 2014). Die Kinase AKT wiederum stimuliert das Zellüberleben über Aktivierung von Mdm2, das die p53-vermittelte Apoptose antagonisiert. Auch durch eine Hemmung der proapoptotischen Bcl-2 Proteine BAX und BAD sowie des Transkriptionsfaktors FOXO, der eine Expression von Zelltod-fördernden Proteinen initiiert, wird das Zellüberleben verlängert. Zudem vermittelt AKT über Aktivierung des mTOR-Komplex 1 eine Phosphorylierung von p70 S6-Kinase, 4E-BP1 und ribosomalem S6-Protein. Letztere beiden führen zu einer Zunahme der Proteinsynthese (Courtney, et al., 2010; Engelman, et al., 2006; Steelman, et al., 2011). Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs konnte in verschiedenen Tumoren,

unter anderem im duktalem Adenokarzinom des Pankreas, nachgewiesen werden (Castellano & Downward, 2011; Eser, et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs über Rekombination des *LSL-PIK3CA^{H1047R}*-Lokus auch in MEFs zu einer Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 und Serin 473 führt. Desweiteren fand sich eine Zunahme des phosphorylierten AKT-Substrats GSK3 β . Die vermehrte Phosphorylierung von AKT konnte auch in MEFs mit dem Genotypen *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich dazu die Menge an phosphoryliertem AKT in MEFs mit isolierter konstitutiver Aktivierung von Kras (*LSL-Kras^{G12D/+}*) annähernd identisch zu Kontroll-MEFs. Dieser Unterschied kann unter Umständen durch Interaktionen des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs erklärt werden. Die Aktivierung von onkogenem Kras^{G12D} führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Raf/MAP/ERK-Signalwegs und zu einer Stimulation von MEK1. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteinkinase im Rahmen des MAGI1/MEK1/PTEN-Komplexes als Inhibitor des PI3K-Signalwegs eine Dephosphorylierung von PIP₃ zu PI-4,5-P₂ bewirkt. Demzufolge sinkt die Phosphorylierungsrate von Substraten des PI3K-Signalwegs, wie der Proteinkinase AKT (Zmajkovicova, et al., 2013). Passend hierzu zeigte sich in dieser Arbeit bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* neben der fehlenden Zunahme von phosphoryliertem AKT auch eine verminderte Phosphorylierung von GSK3 β , einem Substrat von AKT, im Vergleich zu MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*. Diese Daten sprechen dafür, dass ein isoliert konstitutiv aktives *Kras^{G12D}* Onkogen in MEFs über seine Effektorproteine wesentlich stärker den Raf/MAP/ERK-Signalweg stimuliert, als den PI3K-Signalweg. Man kann davon ausgehen, dass in MEF *LSL-Kras^{G12D/+}* die Aktivierung des Raf/MAP/ERK-Signalwegs ursächlich für die Veränderungen von Metabolismus, Seneszenz und Proliferation ist. Bei MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* hingegen konnte analog zu MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* eine zunehmende Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden. Dies spricht für einen stärkeren Wirkungseffekt der konstitutiv aktiven PI3-Kinase auf PI-4,5-P₂ als des, über den Raf/MAP/ERK-Signalweg stimulierte, MAGI1/MEK1/PTEN-Komplexes auf PIP₃. Der PI3K-Signalweg ist somit trotz negativer Regulationsmechanismen des Raf/MAP/ERK-Signalwegs in MEFs mit gleichzeitiger *PIK3CA^{H1047R/+}*- und *Kras^{G12D/+}*-Mutation aktiviert.

4.3. PI3K-Aktivierung führt zu Morphologie-Veränderungen und Seneszenz-Hemmung in MEFs

Bestimmte Mutationen können über die Aktivierung eines Signalwegs zu charakteristischen morphologischen Veränderungen führen. Tuveson und Kollegen konnten nachweisen, dass die Aktivierung einer isolierten *Kras*^{G12D/+}-Mutation mittels adenoviraler Cre-Rekombinase in MEFs markante Änderungen der Zellmorphologie von einer flachen, abgerundeten Form in Richtung einer schmalen, spindelzelligen Form zur Folge hat. Diese wurden zurückgeführt auf eine Reorganisation der Aktinfilamente des Zytoskeletts. Unter Verwendung von Wildtyp-MEFs konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen nicht durch virus-spezifische Interaktionen an der Zelle hervorgerufen wurden, sondern ausschließlich auf einer erfolgreichen Rekombination des *Kras*-Gens und Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden basierten (Tuveson, et al., 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MEFs mit alleiniger *PIK3CA*^{H1047R/+}-Mutation ähnliche morphologische Veränderungen durchlaufen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der konstitutiv aktive PI3K-Signalweg in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} die gleichen Effektorproteine stimuliert, die auch in MEFs *LSL-Kras*^{G12D/+} für die beschriebenen morphologischen Veränderungen verantwortlich sind. Welche Proteine das im Einzelnen sind und welche Folgen diese Veränderungen im Rahmen der Entwicklung und Migration von menschlichen Tumorzellen haben, muss im Rahmen weiterer Forschung analysiert werden.

Seneszenz ist ein zellulärer Prozess, der einen stabilen Zellzyklus-Arrest bewirkt, um die Proliferation mutierter Zellen zu verhindern. Eine Reaktivierung der Seneszenz in murinen Karzinomen, beispielsweise über den Tumorsuppressor p53, bewirkt eine Tumorregression (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Seneszenten Zellen zeichnen sich aus durch eine Aktivierung von DNA-Reparatur-Signalwegen, eine Intensivierung von Autophagozytose und eine Sekretion von inflammatorischen Proteinen. Solche seneszenz-assoziierten Sekretine sind unter anderem IL-6, IL-8 und extrazellulär wirkende Proteasen, wie die Matrix-Metallo-Proteinase, die möglicherweise durch Initiierung einer Immunantwort eine weitere Tumorentwicklung aufhalten können (Coppe et al., 2008; Kennedy, et al., 2011). Auch wurde beschrieben, dass die Ausbildung von sogenannten Seneszenz-assoziierten

Heterochromatin Foci (SAHF) auf DNA-Ebene eine Expression von proliferationsfördernden Genen verhindern kann (Narita et al., 2003). Auf zellulärer Ebene wird Seneszenz über den p19/ARF-p53- oder den p16/Ink4a-Zyklus D1-pRB-Signalweg reguliert (Z. Chen et al., 2005; Coppe, et al., 2008; Kuilman et al., 2010; Ohtani et al., 2004). Onkogen-induzierte Seneszenz ist ein Mechanismus in vielen Vorläuferläsionen von malignen Tumoren, um einen Zellzyklus-Arrest herbeizuführen und eine weitere Tumorentwicklung zu bremsen. Hierbei kann ein isoliert mutiertes Onkogen in einer primär nicht transformierten Zelle als Tumorsuppressor fungieren. Diese Eigenschaft Seneszenz-Mechanismen zu aktivieren konnte bei einigen Onkogenen nachgewiesen werden, unter anderem bei dem in einer Vielzahl von Tumoren mutierten Protein Kras (Braig et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006; Michaloglou et al., 2005). Kras bewirkt eine Stimulation von Seneszenz-Prozessen über Aktivierung von GSK3 β mit daraufhin folgender Induktion von SAHF, über p16/Ink4a-Hochregulation und über Hemmung von mTor, einem Inhibitor der Autophagozytose (He & Klionsky, 2009; Kennedy, et al., 2011; Ye et al., 2007). Auch der PI3K-Signalweg stellte sich als ein, wenn auch schwacher Seneszenz-Initiator heraus. Interessanterweise konnte bei kombinierter Aktivierung von Kras und PI3K in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden, dass der PI3K-Signalweg die ausgeprägte Seneszenz-fördernde Eigenschaft des isoliert mutierten Kras-Signalwegs umgehen kann und zu einer malignen Transformation mit Zellproliferation führt. Als Ursache hierfür zeigte sich, dass der PI3K-Signalweg verschiedene von Kras aktivierte Seneszenz-Mechanismen antagonisiert. Nach Aktivierung des PI3K-Signalwegs in Zellen mit *Kras*^{G12D}-Mutation konnte eine Phosphorylierung und somit Hemmung von GSK3 β , eine Aktivierung von mTor und eine Herunterregulation von p16/Ink4a gezeigt werden (Kennedy, et al., 2011). Bardeesy und Kollegen konnten nachweisen, dass ein zusätzlicher Verlust der Tumorsuppressoren p16/Ink4a, p19/ARF oder p53 in *Kras*^{G12D/+}-Mausmodellen zur Progression von pankreatischen Vorläuferläsionen zu einem invasiven Karzinom führt (Bardeesy et al., 2006). Entsprechend dieser Daten, fand sich auch in *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}-Mausmodellen nach Transformation in ein duktales Adenokarzinom des Pankreas eine fehlende p16/Ink4a-Expression, die in prämaligen PanINs noch nachweisbar und mit einem Seneszenz-Programm assoziiert war (Eser, et al., 2013). Auch in dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass MEFs ohne onkogene Mutation nach 5-10 Passagen seneszent werden und einen Wachstumsarrest

aufweisen. Rekombinierte MEFs mit konstitutiver PI3K-Signalweg-Aktivierung hingegen zeigten eine reduzierte Seneszenz, entsprechend dem Verhalten von malignen Zellen. Eine isolierte *Kras*^{G12D/+}-Mutation führte in MEFs in dieser Arbeit nicht zu einer verstärkten Induktion von Seneszenz, wie für prä-maligne Läsionen nachgewiesen werden konnte, sondern ebenso wie bei MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} zu signifikant weniger seneszenten Zellen im Vergleich zu Kontroll-MEFs. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in MEFs eine isolierte Mutation, *Kras*^{G12D/+} oder auch *PIK3CA*^{H1047R/+}, ausreichen kann, um Seneszenz-Programme zu umgehen.

4.4. Rekombinierte MEFs zeigen Proliferations-Phänotyp

Karzinome zeichnen sich durch ein gesteigertes Zellwachstum mit Entwicklung von Resistenzen gegenüber Wachstumsinhibitoren und Apoptoseinduktoren sowie die erworbene Fähigkeit zur Angiogenese und Metastasierung aus. Diese Veränderungen werden bedingt durch eine Dysregulation des Zellzyklus und Aktivierung spezifischer Signalwege (Hanahan & Weinberg, 2000). Die *Kras*-stimulierten Signalwege stromabwärts von Raf und PI3K spielen hierbei eine bedeutende Rolle. Aktivierende Mutationen von Proteinen, die diesen beiden Signalwegen zuzuordnen sind, konnten in vielen Tumorarten des Menschen nachgewiesen werden. So zeigt sich beispielsweise eine B_{Raf}-Mutation in 27-70% bei Melanomen, 36-53% bei papillären Schilddrüsenkarzinomen, 30% bei serösen Ovarialkarzinomen und 5-22% bei kolorektalen Karzinomen. Das Gen der katalytischen Untereinheit 110 α der PI3-Kinase (*PIK3CA*) ist mit über 30% einer der am häufigsten veränderten Gene in soliden Tumoren. In mutierter Form findet es sich unter anderem in kolorektalen Karzinomen (32%), Endometriumkarzinomen (27%), Mammakarzinomen (25%), Magenkarzinomen (25%) und auch in Pankreaskarzinomen (6%). Eine aktivierende Mutation im *Kras* Onkogen wird in ungefähr 20-25% aller Tumore beschrieben, insbesondere in Pankreaskarzinomen (90%). Nachgewiesen ist sie auch in Schilddrüsenkarzinomen (55-60%), kolorektalen Karzinomen (45%), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (35%), hepatozellulären Karzinomen (30%) und anderen (Chalhoub & Baker, 2009; Downward, 2003; Ligresti et al., 2009; Steelman, et al., 2011). *Kras* und seine Effektor-Kaskaden, der Raf/MAP/ERK- und der PI3K-Signalweg, spielen eine nachgewiesene wichtige Rolle in der Karzinogenese vieler Tumore, da sie die Initiierung von Zellwachstum,

Zellzyklusprogression, Metabolismus sowie Hemmung der Apoptose und DNA-Reparatur über ihre Substrate Mdm2, GSK3 β , ERK1/2, BAX, BAD, NF κ B, FOXO und viele weitere beeinflussen (Courtney, et al., 2010). All diese Mechanismen führen über einer Aktivierung der Zellproliferation zu Tumorwachstum und -ausbreitung im menschlichen Körper.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs über eine isolierte *PIK3CA*-Mutation in MEFs zu der für die Tumorentstehung und das Tumorwachstum essenziellen Steigerung der Proliferation führt. Im Gegensatz zu der Proliferationsrate von Kontroll-MEFs (17%, von 1×10^5 auf $1,17 \times 10^5$ Zellen innerhalb von 4 Tagen) zeigte sich bei konstitutiv *PIK3CA*^{H1047R}-exprimierenden MEFs nach 4 Tagen eine Zunahme der Zellzahl um 756% (von 1×10^5 Zellen auf $8,56 \times 10^5$ Zellen). Zudem bestätigte sich eine Abhängigkeit der Proliferation von der Passage der Zelllinie. Bei rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} konnte nach Passage 3 ein deutliches Wachstum beobachtet werden, das in Passage 6 nicht so stark ausgeprägt war. Die Daten dieser Arbeit entsprechen somit dem bereits beschriebenen Verhalten von MEFs nach 5-10 Passagen langsamer zu proliferieren (Tuveson, et al., 2004). Auch bei MEFs mit den Genotypen *LSL-Kras*^{G12D/+} sowie *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} konnten nach Rekombination der jeweiligen Gene signifikant höhere Wachstumsraten im Vergleich zu Kontroll-MEFs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die konstitutive Aktivierung des Raf/MAP/ERK- und/oder des PI3K-Signalwegs ohne zusätzliche Mutation anderer Onkogene ausreicht, um bei MEFs einen Proliferationsphänotyp hervorzurufen. Da MEFs nach Onkogen-Mutation diese essenzielle Eigenschaft menschlicher Tumoren abbilden, können in diesen Modell-Organismen anhand weiterführender Analysen genaue Zellprozesse, die zur Proliferation führen, aufgedeckt werden.

4.5. Proliferationshemmung durch Inhibitoren

Der PI3K-Signalweg ist in einem Drittel aller menschlichen Karzinome infolge von Mutationen dysreguliert (Akinleye et al., 2013). Aufgrund seines Einflusses auf Zellwachstum, Metabolismus und Zellüberleben spielt der PI3K-Signalweg eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung und -aufrechterhaltung. Er stellt somit ein interessantes Ziel für therapeutische Interventionen dar (Wong et al., 2010). Dies gilt insbesondere für die Behandlung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas, da

eine direkte Hemmung von Kras, einem zentralen PI3K-Aktivator, bisher nicht erfolgreich war (Zhong, et al., 2013). Karzinogenese fördernde Mutationen des *Kras* Onkogens finden sich in vielen Tumoren unter anderem in über 90% aller Pankreaskarzinome. Da der PI3K-Signalweg, neben dem Raf/MAP/ERK- und dem RalGDS/p38MAPK-Signalweg, einer der Hauptsignalkaskaden stromabwärts von Kras darstellt, sind PI3K-Inhibitoren in der aktuellen Forschung von großem Interesse (Eser, et al., 2013). Mittlerweile befinden sich eine Vielzahl an PI3K-Inhibitoren in klinischen Studien, die unterteilt werden in Isoform-selektive, Klasse I- und duale PI3K/mTor-Inhibitoren (Martini et al., 2013). Der Klasse I-Inhibitor GDC-0941 wurde hierbei als erster in klinischen Studien mit Patienten, die einen soliden Tumor entwickelt hatten, eingesetzt (Akinleye, et al., 2013). Auch Proteine stromabwärts der PI3-Kinase stellen ein Ziel therapeutischer Hemmung dar. Zur Antagonisierung von Zellwachstum und -proliferation in Tumorzellen wurden verschiedene AKT-Inhibitoren, wie MK-2206, RX-0201, Perifosin, PBI-05204 und GSK2141795 entwickelt (Pal et al., 2010). Der AKT-Inhibitor MK-2206 konnte in klinischen Studien bereits vielversprechende therapeutische Ergebnisse bei Patienten mit soliden Tumoren erzielen (Yap et al., 2011). Neben Inhibitoren, die Proteine des PI3K-Signalwegs hemmen, existieren eine Reihe weiterer molekularer Therapeutika, wie AZD6244, ein potenter MEK 1/2-Inhibitor der zweiten Generation (Davies et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}*, die initial durch adenovirale Rekombination einen Proliferationsphänotyp zeigten, nach Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 oder dem AKT-Inhibitor MK-2206 eine signifikante Proliferationshemmung erreicht werden kann. Zudem zeigte sich eine Herunterregulation des PI3K-Signalwegs durch Rückgang der AKT-Phosphorylierung nach Zugabe der Inhibitoren. Die nach Rekombination des *PIK3CA^{H1047R/+}*-Gens erreichte Aktivierung des PI3K-Signalwegs, unterstrichen von der nachgewiesenen AKT-Phosphorylierung, konnte rückgängig gemacht werden.

In einer Studie wurde der hemmende Einfluss von isoliert oder kombiniert eingesetzten Inhibitoren auf das Wachstum von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas in *LSL-Kras^{G12D/+}*-Mauslinien verglichen. Hierbei zeigte der MEK 1/2-Inhibitor AZD6244 bei isoliertem Einsatz die höchste Effizienz bei überwiegend zytostatischer Wirkungsweise. In Kombination mit einem PI3K-Inhibitor (GDC-0941 oder BKM120) konnte eine zusätzliche Apoptose-Induktion nachgewiesen werden.

Die duale Inhibition des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs wirkte sich synergistisch auf die Hemmung von Tumorwachstum und -überleben aus (Alagesan, et al., 2015). Diesen Effekt der optimierten Inhibition bei Kombination von GDC-0941 und AZD6244 konnten auch Zhong und Kollegen an Pankreaskarzinom-Modellen beobachten. Ursächlich gehen sie davon aus, dass kompensatorische Feedback-Schleifen, die den Raf/MAP/ERK- und PI3K-Signalweg miteinander verknüpfen umgangen werden (Zhong, et al., 2013). In dieser Arbeit konnte auch in MEFs ein unterschiedlicher Effekt des eingesetzten PI3K-Inhibitors GDC-0941 und des AKT-Inhibitors MK-2206 nachgewiesen werden. Die effizienteste Proliferationshemmung konnte unter Verwendung von MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* erzielt werden. Nach Blockade des konstitutiv aktiven PI3K-Signalwegs durch GDC-0941 bzw. MK-2206 kam es zu einer deutlichen Reduktion des gesteigerten Zellwachstums um 94% bzw. 77%. Im Gegensatz dazu zeigte sich der wachstumshemmende Effekt der Inhibitoren in MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* weniger deutlich ausgeprägt (56% durch GDC-0941 bzw. 33% durch MK-2206). Interessanterweise konnte in MEFs mit alleiniger *Kras^{G12D}*-Mutation nach Behandlung mit MK-2206 kein signifikanter Rückgang der Proliferation nachgewiesen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in MEFs mit dem Genotyp *LSL-Kras^{G12D/+}* durch eine konstitutive *Kras*-Expression auch andere wachstumsfördernde Signalkaskaden neben dem PI3K-Signalweg aktiviert werden. Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist hier insbesondere der *Kras*-abhängig regulierte Raf/MAP/ERK- sowie RalGDS/p38MAPK-Signalweg beschrieben (Collisson, et al., 2012; Eser, et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation in MEFs mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* durch Rekombination und Inhibition gezielt gesteuert werden kann. Der Effekt der verwendeten Inhibitoren auf MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* war etwas milder ausgeprägt, da die Zellen neben dem aktiven PI3K-Signalweg auch den aktiven Raf/MAP/ERK-Signalweg beinhalten, der durch den PI3K-Inhibitor GDC-0941 und den AKT-Inhibitor MK-2206 nicht gehemmt wird. Bei MEFs *LSL-Kras^{G12D/+}* konnte das Proliferationsverhalten durch Einsatz von MK-2206 jedoch nicht blockiert werden. Hier empfiehlt sich der kombinierte Einsatz von Inhibitoren, die eine Wirkung auf Effektoren des Raf/MAP/ERK- und des PI3K-Signalwegs haben. Insbesondere, da es auch zu paradoxen Reaktionen kommen kann, wie zum Beispiel der Aktivierung von PI3-Kinasen durch MEK-Inhibitoren aufgrund kompensatorischer Feedback-Mechanismen über den MAG11/MEK1/PTEN-Komplex (Gysin, et al.,

2011). Wie bereits in vielen klinischen Studien zu molekularen Inhibitoren realisiert, ist eine weitere Erforschung der Kombinationsmöglichkeiten und -effekte verschiedener Inhibitoren bei der Behandlung von Karzinomen abhängig vom Genotyp unerlässlich.

4.6. Rekombinierte MEFs aktivieren Gen-Gruppen von Zellteilung, Metabolismus und Karzinomen

Der in vielen Tumoren mutierte PI3K-Signalweg hat Einfluss auf die Karzinogenese über eine Regulation von Proliferation, Metabolismus und Zellüberleben. Diese erfolgt über eine Aktivierung verschiedener stromabwärts gelegener Effektoren (Courtney, et al., 2010; Engelman, et al., 2006). In dieser Arbeit konnte bereits eine Phosphorylierung einzelner Effektorproteine des PI3K-Signalwegs nach Rekombination des Allels *PIK3CA*^{H1047R} und der daraus resultierende Effekt auf Proliferation und Seneszenz in MEFs nachgewiesen werden. Um nicht nur einzelne Proteine und Gene zu untersuchen, sondern auch die Auswirkungen einer PI3K-Signalweg-Aktivierung auf das gesamte Genexpressionsprofil einer Zelle, wurden mittels Microarrays Expressionsprofile der Zell-mRNA angefertigt. Subramanian und Kollegen entwickelten mit der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) eine Methode die extrahierten Datenmengen sinnvoll zu strukturieren, indem alle Gene ihrer biologischen Funktion entsprechend in Gruppen eingeteilt wurden. So konnten sie unter anderem in drei unabhängig voneinander erhobenen Datensätzen zu Lungenkarzinomen mit schlechter Prognose nach Analyse von Gen-Gruppen mittels GSEA mehr Gemeinsamkeiten von dysregulierten Signalwegen nachweisen als nach Analyse einzelner Gene (Subramanian, et al., 2005).

Um die Expressionslevel der Gene in dieser Arbeit miteinander zu vergleichen, erfolgte die Auswertung der Arrays unter Verwendung der Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) und der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) PATHWAY-Datenbank. Letztere beinhaltet eine Vielzahl von Signalwegen, die im Rahmen von Metabolismus, zellulärer Informationsverarbeitung, Organsystemen und Erkrankungen des Menschen von Bedeutung sind. In Microarrays von MEFs mit dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} und dem Genotyp *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} zeigte sich nach adenoviraler Rekombination im Vergleich zu Kontroll-MEFs eine besonders ausgeprägte Aktivierung von Gen-Gruppen, die mit Metabolismus und

Zellteilung assoziiert sind. Diese Ergebnisse passen zu den in dieser Arbeit bereits beschriebenen Eigenschaften von MEFs, die nach Aktivierung des PI3K-Signalwegs eine reduzierte Seneszenz sowie eine gesteigerte Proliferation aufweisen. Für den Prozess des Zellwachstums und der Proliferation ist die, in den Microarrays nachgewiesene, Stimulation von Gen-Gruppen unerlässlich, die für DNA-Replikation und -Reparatur, (z.B. Purin-/Pyrimidin-Metabolismus, Mismatch-Reparatur oder homologe Rekombination), für Aminosäuren- und Protein-Metabolismus (z.B. Aminoacyl-tRNA-Biosynthese, Cystein/Methionin-Metabolismus oder Proteinexport) und für Energiezufuhr (z.B. Glykolyse/Gluconeogenese, Fruktose-/Mannose-Metabolismus oder Pentose-phosphatweg) verantwortlich sind. In rekombinierten MEFs mit dem Genotyp *LSL-Kras*^{G12D/+} hingegen konnte nach Anfertigung von Microarrays im Vergleich zu Kontroll-MEFs eine Aktivierung von Gen-Gruppen nachgewiesen werden, die im Rahmen inflammatorischer Prozesse (z.B. Toll-like-Rezeptor-Signalweg, T- und B-Zell-Rezeptor-Signalweg oder Chemokin-Interaktionen) sowie der Tumorentstehung von Bedeutung sind. Entsprechend der bekannten Effektor-Signalwege von *Kras* zeigte sich eine Aktivierung des Raf/MAP/ERK-Signalwegs. Zudem fand sich eine Stimulation von Signalwegen, die allgemein mit Karzinomen in Verbindung gebracht werden. Unter anderem waren die Gene des ErbB-Signalwegs vermehrt exprimiert, der in vielen Tumorarten mutiert ist (Yu & Hung, 2000). Unabhängig von spezifischen Signalwegen konnte eine Aktivierung von Gen-Gruppen nachgewiesen werden, die generell mit verschiedenen Tumorarten assoziiert sind, beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, dem Gliom, dem Nierenzellkarzinom oder dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Insbesondere zeigte sich auch eine Aktivierung der Gene, die eine entscheidende Rolle im Pankreaskarzinom spielen. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im *PIK3CA*- bzw. *Kras*-Gen auch in MEFs zu einem Genexpressionsprofil führt, das in vermehrt proliferierenden Zellen und auch in Tumoren beobachtet wird.

4.7. MEFs als Modellorganismen für die Analyse der Pankreaskarzinom-Entwicklung

Im Verlauf jahrzehntelanger Forschung ist es gelungen viele molekulargenetische Vorgänge während der Tumorentstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas im Menschen aufzudecken. Für die Analyse einzelner genetischer und

pathophysiologischer Schritte der humanen Karzinogenese entwickelten sich reproduzierbare Tier- und Zellmodelle zu essentiellen Hilfsmitteln. Insbesondere etablierten sich genetisch veränderte Mauslinien als geeignete Modellorganismen. Ein einzelnes Mausmodell ist zwar nicht geeignet das komplette Spektrum des duktales Adenokarzinoms des menschlichen Pankreas abzubilden, stellt aber wichtige Informationen zu Auswirkungen isolierter Mutationen auf den Organismus bereit. In Kombination mit Zellmodellen, die eine genaue Analyse einzelner Signalwege ermöglichen, können so bedeutende Einblicke in die zugrunde liegende Tumorbilogie gewonnen werden. Tuveson und Kollegen verwendeten hierfür MEFs, die der frühen embryonalen Entwicklung entstammen. Nach Insertion einer *Kras*^{G12D}-Mutation in das Genom konnten sie Veränderungen in MEFs nachweisen, die charakteristisch für die zellulären Prozesse im Rahmen der menschlichen Karzinogenese sind, wie ein gesteigerter Metabolismus, ein vermehrtes Zellwachstum und ein reduziertes Seneszenz-Verhalten (Tuveson, et al., 2004). Eine Mutation des *Kras* Onkogens findet sich in der Mehrzahl der Pankreaskarzinome und wirkt über die Aktivierung dreier Hauptsignalkaskaden, des Raf/MAP/ERK-, des PI3K- sowie des RalGDS/p38MAPK-Signalwegs.

Um den PI3K-Signalweg isoliert, ohne Aktivierung anderer zur Tumorentstehung führender Signalkaskaden, zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit MEFs mit dem Knock-In *LSL-PIK3CA*^{H1047R} verwendet. Auf molekularer Ebene zeigte sich in rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} eine Aktivierung des PI3K-Signalwegs durch Phosphorylierung der Effektoren AKT und GSK3β. Diese Phosphorylierung fand sich auch in Gewebeproben des Pankreas von *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+}-Mäusen, die bereits eine Transformation zu PanINs oder einem duktales Adenokarzinom des Pankreas aufwiesen (Eser, et al., 2013). Analog zu den Daten von Tuveson und Kollegen konnte auch in MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} nach adenoviraler Rekombination und somit konstitutiv aktivem PI3K-Signalweg eine reduzierte Seneszenz und eine gesteigerte Proliferation der Zellen nachgewiesen werden. Passend zu diesen phänotypischen Merkmalen zeigten sich nach Anfertigung von Microarrays Genexpressionsprofile der rekombinierten MEFs, die mit Proliferation, Metabolismus und Tumorentstehung assoziiert sind. Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206, die sich bereits in klinischen Studien befinden, demonstrierte bei rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} anschließend die Reversibilität der Protein-Phosphorylierung und des Proliferations-Phänotyps.

Wie die Daten dieser Arbeit belegen, finden sich in genetisch modifizierten MEFs die gleichen molekulargenetischen und phänotypischen Veränderungen, die auch andere Modellorganismen zur Analyse des PI3K-Signalwegs im duktalem Adenokarzinom des Pankreas aufweisen. Es können nicht nur die Folgen isolierter oder kombinierter genetischer Mutationen anhand MEFs untersucht werden, sondern auch die Auswirkungen onkologischer Therapeutika evaluiert werden. MEFs sind aufgrund ihrer relativ unkomplizierten Akquirierung, Handhabung und Verfügbarkeit erfolgsversprechende Modellorganismen, um weiterführende Erkenntnisse bezüglich Tumorentstehung und zukünftiger Therapiemöglichkeiten des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas zu sammeln.

4.8. Ausblicke

Um Tumore in Zukunft effizienter behandeln zu können sind genaue Kenntnisse der molekulargenetischen Veränderungen während der Karzinogenese essenziell. Insbesondere beim Adenokarzinom des Pankreas fehlen erfolgsversprechende Therapieoptionen. In den letzten Jahrzehnten stellte das *Kras* Onkogen, das in vielen Tumoren und in über 90% der Pankreaskarzinome mutiert ist, ein interessantes Therapieziel dar. Es konnte jedoch kein therapeutisch nutzbarer Inhibitor von *Kras* zur gezielten Blockade der, durch dieses Protein ausgelösten Onkogenese, gefunden werden (Eser, et al., 2014). Infolgedessen sind die Hauptsignalkaskaden stromabwärts von *Kras*, der Raf/MAP/ERK-, der PI3K- sowie der RalGDS/p38MAPK-Signalweg, in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt (Löhr, et al., 2005; Schneider & Schmid, 2005; Steelman, et al., 2011). Diese fördern aufgrund komplexer Interaktionen, die im Detail noch nicht verstanden sind, die Karzinomentwicklung.

Anhand von MEFs konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine isolierte oder kombinierte Mutation von *Kras* und *PI3K* über die Aktivierung des PI3K-Signalwegs ausreicht, um zu einer deutlichen Proliferation der Zellen zu führen. Dieses Wachstumsverhalten spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Metastasierung eines Tumors.

Da sich Karzinome je nach Patient in der Anzahl und Art mutierter Onkogene unterscheiden, ist eine Genotypisierung der betroffenen Patienten notwendig. Je nach Zusammenspiel der individuell mutierten Onkogene besteht eine Aktivierung

der einzelnen Hauptsignalkaskaden, die therapeutisch inhibiert werden kann. Insbesondere der in vielen Tumoren aberrant aktivierte PI3K-Signalweg ist aufgrund seiner Regulation von Zellproliferation, Metabolismus und Apoptose von Bedeutung. Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnte das Proliferationsverhalten von adenoviral rekombinierten MEFs *LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL-Kras^{G12D/+}* mit konstitutiv aktivem PI3K-Signalweg durch Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 oder dem AKT-Inhibitor MK-2206 gezielt blockiert werden. Bei MEFs mit alleiniger *Kras^{G12D}*-Mutation konnte dieser wachstumshemmende Effekt nach Behandlung mit MK-2206 nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig die Kenntnis des Genotyps des Tumorgewebes für den Behandlungserfolg ist. Ursächlich für die fehlende Inhibition ist vermutlich, dass andere proliferationsfördernde Hauptsignalkaskaden stromabwärts von *Kras* aktiviert sind und miteinander interagieren. Im Rahmen einer Therapiestratifizierung sollten Tumore deshalb nicht nur genotypisiert, sondern auch auf die Aktivierung der einzelnen Signalkaskaden getestet werden, um eine individuelle Kombination aus Inhibitoren in der Behandlung einzusetzen. Eine weitere Optimierung der onkologischen Therapie kann durch Resistenztestung des Tumorgewebes gegenüber den einzelnen Inhibitoren erreicht werden. Eventuell wird es in Zukunft auch möglich sein über eine Früherkennung einzelner Mutationen und gezielte Blockade von aktivierten Signalwegen eine Karzinomentstehung aufzuhalten oder sogar zu verhindern. Um diese Ziele zu erreichen und zukünftige onkologische Therapien somit individueller zu gestalten, sind weiterführende Analysen zu den Aktivierungsmechanismen und Interaktionen der drei Hauptsignalkaskaden von *Kras* essenziell. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der PI3K-Signalweg hierfür einen erfolgsversprechenden Ausgangspunkt darstellt.

5. Zusammenfassung

Die Diagnose eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas geht für Patienten aufgrund des meist fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Diagnosestellung und der frühzeitigen Metastasierung mit einer infausten Prognose einher. Aktuell zur Verfügung stehende therapeutische Ansätze zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zeigen bisher leider nur geringe Effekte auf eine Verbesserung der Lebenszeit und -qualität der Patienten. Um neue effiziente Behandlungsstrategien entwickeln zu können, werden seit Jahrzehnten die molekulargenetischen Mechanismen der Pankreaskarzinom-Entstehung erforscht. Das Ziel ist eine Früherkennung von Vorläuferläsionen sowie der gezielte Einsatz inhibitorischer Therapeutika gegen dysregulierte, Onkogenese-stimulierende Moleküle. Ein genaues Verständnis der Signalwege und Effektorproteine, die aufgrund von Mutationen während der Karzinogenese eine entscheidende Rolle spielen, ist daher unerlässlich.

Als entscheidende genetische Veränderung im Laufe der Pankreaskarzinom-Entstehung wurde die Mutation des *Kras* Onkogens identifiziert. Diese lässt sich in über 90% aller Pankreaskarzinome nachweisen und trägt zur Karzinogenese bei, indem sie drei Hauptsignalkaskaden aktiviert, den Raf/MAP/ERK-, den PI3K- sowie den RalGDS/p38MAPK-Signalweg. Anhand verschiedener Mausmodelle können die Auswirkungen isolierter und kombinierter Mutationen einzelner Proteine dieser Signalwege auf den Organismus untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde der PI3K-Signalweg anhand von Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) als Modellorganismen analysiert. Hierbei handelt es sich um Fibroblasten aus murinen Embryonen, die im Alter von 11,5-12,5 Tagen isoliert wurden. Verglichen wurden MEFs mit dem Genotyp $PIK3CA^{H1047R/+}$, dem Genotyp $Kras^{G12D/+}$ sowie dem Genotyp $PIK3CA^{H1047R/+};Kras^{G12D/+}$. Eine Rekombination und Expression der jeweiligen Gene erfolgte an gewählten Zeitpunkten mittels AdCre-Viren. Es konnte gezeigt werden, dass eine isolierte PI3K-Signalweg-Aktivierung in MEFs zu Reduktion von Seneszenz, Stimulation von Proliferation und Phosphorylierung entscheidender Effektorproteine des PI3K-Signalwegs führt. Durch eine Behandlung der mutierten MEFs mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 waren die Proteinphosphorylierung und der Proliferationsphänotyp blockierbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass der PI3K-Signalweg essenzielle Funktionen während der Karzinogenese steuert und somit ein interessantes Ziel weiterführender Forschung darstellt, um Tumore in Zukunft effizienter behandeln zu können.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Progressionsmodell für das duktales Pankreaskarzinom.....	2
Abbildung 2:	PI3K-Signalweg.....	6
Abbildung 3:	Rosa26-Lokus mit <i>PIK3CA</i> ^{H1047R} -Knock-In	21
Abbildung 4:	Rosa26-Lokus mit <i>mT-mG</i> -Knock-In.....	21
Abbildung 5:	RNA-Gel zur Qualitätskontrolle	31
Abbildung 6:	Rekombinationsraten bei MEFs <i>R26</i> ^{mT-mG/+}	36
Abbildung 7:	Abhängigkeit der Rekombinationsraten bei MEFs <i>R26-mT-mG</i> ^{+/+} von der Inkubationszeit mit AdCre-Viren.....	37
Abbildung 8:	Rekombinationsnachweis mittels PCR.....	38
Abbildung 9:	Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Aktivierung in MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+}	39
Abbildung 10:	Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Aktivierung in MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} , <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} und <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}	41
Abbildung 11:	Morphologie-Veränderungen von MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} nach Behandlung mit unterschiedlichen AdCre-Virus-Konzentrationen....	42
Abbildung 12:	Apoptose bei MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+}	43
Abbildung 13:	Senseszenz in MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+}	45
Abbildung 14:	Senseszenz in MEFs <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} und <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}	46
Abbildung 15:	Proliferation von MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} nach Rekombination ...	47
Abbildung 16:	Proliferation von MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} in Abhängigkeit von der Passage	48
Abbildung 17:	Proliferation von MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} , MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} und MEFs <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}	49
Abbildung 18:	Wachstumsraten von MEFs nach Behandlung mit 10 ⁷ pfu AdCre-Viren.....	50
Abbildung 19:	Proliferationshemmung durch Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206	51
Abbildung 20:	Proliferationshemmung durch PI3K-Inhibitor GDC-0941.....	52
Abbildung 21:	Proliferationshemmung durch AKT-Inhibitor MK-2206	53
Abbildung 22:	Western Blot-Analyse der PI3K-Signalweg-Hemmung in rekombinierten MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} nach Inkubation mit den Inhibitoren GDC-0941 und MK-2206.....	54
Abbildung 23:	Graphische Darstellung der Gen-Gruppe des Pyrimidin-Metabolismus in rekombinierten MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+}	57
Abbildung 24:	Graphische Darstellung der Gen-Gruppe der DNA-Replikation in rekombinierten MEFs <i>LSL-PIK3CA</i> ^{H1047R/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}	59
Abbildung 25:	Graphische Darstellung der Gen-Gruppe des Pankreaskarzinoms in rekombinierten MEFs <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+}	61

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Standard-PCR-Bedinungen	27
Tabelle 2:	Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+}</i> nach Rekombination	56
Tabelle 3:	Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs <i>LSL-PIK3CA^{H1047R/+};LSL- Kras^{G12D/+}</i> nach Rekombination	58
Tabelle 4:	Aktivierung von Gen-Gruppen in MEFs <i>LSL-Kras^{G12D/+}</i> nach Rekombination	59

8. Literaturverzeichnis

- Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., Redston, M. S., & DePinho, R. A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, *17*(24), 3112-3126.
- Ahrendt, S. A., & Pitt, H. A. (2002). Surgical management of pancreatic cancer. *Oncology (Williston Park)*, *16*(6), 725-734; discussion 734, 736-728, 740, 743.
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D. K., Langer, P., Chiblak, S., Durr, A., Hofler, H., Kloppel, G., Muller-Decker, K., Brielmeier, M., & Esposito, I. (2012). Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, *226*(5), 723-734.
- Akinleye, A., Avvaru, P., Furqan, M., Song, Y., & Liu, D. (2013). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol*, *6*(1), 88.
- Alagesan, B., Contino, G., Guimaraes, A. R., Corcoran, R. B., Deshpande, V., Wojtkiewicz, G. R., Hezel, A. F., Wong, K. K., Loda, M., Weissleder, R., Benes, C., Engelman, J. A., & Bardeesy, N. (2015). Combined MEK and PI3K inhibition in a mouse model of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *21*(2), 396-404.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, *7*(4), 261-269.
- Anton, M., & Graham, F. L. (1995). Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol*, *69*(8), 4600-4606.
- Asano, T., Yao, Y., Shin, S., McCubrey, J., Abbruzzese, J. L., & Reddy, S. A. (2005). Insulin receptor substrate is a mediator of phosphoinositide 3-kinase activation in quiescent pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, *65*(20), 9164-9168.
- Asano, T., Yao, Y., Zhu, J., Li, D., Abbruzzese, J. L., & Reddy, S. A. (2004). The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, *23*(53), 8571-8580.
- Bardeesy, N., Aguirre, A. J., Chu, G. C., Cheng, K. H., Lopez, L. V., Hezel, A. F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Hanahan, D., Redston, M. S., Chin, L., & Depinho, R. A. (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(15), 5947-5952.
- Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, *2*(12), 897-909.
- Braig, M., Lee, S., Lodenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., & Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, *436*(7051), 660-665.
- Carpelan-Holmström, M., Nordling, S., Pukkala, E., Sankila, R., Luttges, J., Kloppel, G., & Haglund, C. (2005). Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut*, *54*(3), 385-387.
- Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*, *2*(3), 261-274.
- Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*, *4*, 127-150.
- Chen, L., Anton, M., & Graham, F. L. (1996). Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre. *Somat Cell Mol Genet*, *22*(6), 477-488.

- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725-730.
- Collisson, E. A., Trejo, C. L., Silva, J. M., Gu, S., Korkola, J. E., Heiser, L. M., Charles, R. P., Rabinovich, B. A., Hann, B., Dankort, D., Spellman, P. T., Phillips, W. A., Gray, J. W., & McMahon, M. (2012). A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov*, 2(8), 685-693.
- Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6(12), 2853-2868.
- Courtney, K. D., Corcoran, R. B., & Engelman, J. A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*, 28(6), 1075-1083.
- Courtois-Cox, S., Genter Williams, S. M., Reczek, E. E., Johnson, B. W., McGillicuddy, L. T., Johannessen, C. M., Hollstein, P. E., MacCollin, M., & Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10(6), 459-472.
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov*, 13(11), 828-851.
- Davies, B. R., Logie, A., McKay, J. S., Martin, P., Steele, S., Jenkins, R., Cockerill, M., Cartlidge, S., & Smith, P. D. (2007). AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther*, 6(8), 2209-2219.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11-22.
- Dumble, M., Crouthamel, M. C., Zhang, S. Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D. J., Minthorn, E. A., Seefeld, M. A., Rouse, M. B., Rabindran, S. K., Heering, D. A., & Kumar, R. (2014). Discovery of Novel AKT Inhibitors with Enhanced Anti-Tumor Effects in Combination with the MEK Inhibitor. *PLoS One*, 9(6), e100880.
- Ehrhardt, M., Craveiro, R. B., Holst, M. I., Pietsch, T., & Dilloo, D. (2015). The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. *Oncotarget*, 6(2), 802-813.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 7(8), 606-619.
- Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., Michalski, C. W., Schlitter, A. M., Esposito, I., Kind, A. J., Rad, L., Schnieke, A. E., Baccarini, M., Alessi, D. R., Rad, R., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2013). Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*, 23(3), 406-420.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., & Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*.
- Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14(3), 224-232.
- Fero, M. (2006). Culturing Mouse Embryonic Fibroblasts. <http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/MEFs.html>, Stand: 11.10.2016.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30(2), 193-204.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., & Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4(2), 111-120.

- Gysin, S., Salt, M., Young, A., & McCormick, F. (2011). Therapeutic strategies for targeting ras proteins. *Genes Cancer*, 2(3), 359-372.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10), 1218-1249.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450.
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469-483.
- Hoeflich, K. P., O'Brien, C., Boyd, Z., Cavet, G., Guerrero, S., Jung, K., Januario, T., Savage, H., Punnoose, E., Truong, T., Zhou, W., Berry, L., Murray, L., Amler, L., Belvin, M., Friedman, L. S., & Lackner, M. R. (2009). In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res*, 15(14), 4649-4664.
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 6(8), 2969-2972.
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*, 15(24), 3243-3248.
- Jimeno, A., Tan, A. C., Coffa, J., Rajeshkumar, N. V., Kulesza, P., Rubio-Viqueira, B., Wheelhouse, J., Diosdado, B., Messersmith, W. A., Iacobuzio-Donahue, C., Maitra, A., Varela-Garcia, M., Hirsch, F. R., Meijer, G. A., & Hidalgo, M. (2008). Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 68(8), 2841-2849.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*, 32(1), 128-134.
- Kennedy, A. L., Morton, J. P., Manoharan, I., Nelson, D. M., Jamieson, N. B., Pawlikowski, J. S., McBryan, T., Doyle, B., McKay, C., Oien, K. A., Enders, G. H., Zhang, R., Sansom, O. J., & Adams, P. D. (2011). Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell*, 42(1), 36-49.
- Kothari, V., Wei, I., Shankar, S., Kalyana-Sundaram, S., Wang, L., Ma, L. W., Vats, P., Grasso, C. S., Robinson, D. R., Wu, Y. M., Cao, X., Simeone, D. M., Chinnaiyan, A. M., & Kumar-Sinha, C. (2013). Outlier kinase expression by RNA sequencing as targets for precision therapy. *Cancer Discov*, 3(3), 280-293.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev*, 24(22), 2463-2479.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Schafer, J. M., Pendleton, C. S., Tang, L., Johnson, K. C., Chen, X., Balko, J. M., Gomez, H., Arteaga, C. L., Mills, G. B., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2014). PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*, 16(4), 406.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., & Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet*, 363(9414), 1049-1057.

- Liau, S. S., Jazag, A., Ito, K., & Whang, E. E. (2007). Overexpression of HMGA1 promotes anoikis resistance and constitutive Akt activation in pancreatic adenocarcinoma cells. *Br J Cancer*, *96*(6), 993-1000.
- Ligresti, G., Militello, L., Steelman, L. S., Cavallaro, A., Basile, F., Nicoletti, F., Stivala, F., McCubrey, J. A., & Libra, M. (2009). PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*, *8*(9), 1352-1358.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(8), 627-644.
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., & Lüttges, J. (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*, *7*(1), 17-23.
- LoRusso, P. M., Weiss, D., Guardino, E., Girish, S., & Sliwkowski, M. X. (2011). Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin Cancer Res*, *17*(20), 6437-6447.
- Martini, M., Ciraolo, E., Gulluni, F., & Hirsch, E. (2013). Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Front Oncol*, *3*, 108.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, *436*(7051), 720-724.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., & Groop, L. C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, *34*(3), 267-273.
- Morris, J. P. t., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*, *10*(10), 683-695.
- Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., & Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*, *45*(9), 593-605.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, *113*(6), 703-716.
- Nilausen, K., & Green, H. (1965). Reversible arrest of growth in G1 of an established fibroblast line (3T3). *Exp Cell Res*, *40*(1), 166-168.
- Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., & Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest*, *51*(3-4), 146-153.
- Pal, S. K., Reckamp, K., Yu, H., & Figlin, R. A. (2010). Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, *19*(11), 1355-1366.
- Patterson, G., Day, R. N., & Piston, D. (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci*, *114*(Pt 5), 837-838.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, *11*(11), 761-774.
- Reichert, M., & Rustgi, A. K. (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest*, *121*(12), 4572-4578.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101.
- Sarker, D., Ang, J. E., Baird, R., Kristeleit, R., Shah, K., Moreno, V., Clarke, P. A., Raynaud, F. I., Levy, G., Ware, J. A., Mazina, K., Lin, R., Wu, J., Fredrickson, J., Spoerke, J. M., Lackner, M. R., Yan, Y., Friedman, L. S., Kaye, S. B., Derynck, M. K., Workman, P., & de Bono, J. S. (2015). First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, *21*(1), 77-86.

- Schneider, G., Hamacher, R., Eser, S., Friess, H., Schmid, R. M., & Saur, D. (2008). Molecular biology of pancreatic cancer--new aspects and targets. *Anticancer Res*, 28(3a), 1541-1550.
- Schneider, G., & Schmid, R. M. (2005). Pathogenese des Pankreaskarzinoms. Bereits Konsequenzen für künftige therapeutische Ansätze? *Internist (Berl)*, 46(2), 157-165.
- Schneider, G., Siveke, J. T., Eckel, F., & Schmid, R. M. (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, 128(6), 1606-1625.
- She, Q. B., Halilovic, E., Ye, Q., Zhen, W., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Solit, D. B., & Rosen, N. (2010). 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*, 18(1), 39-51.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(1), 10-29.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M., & Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*, 1, 4.
- Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Kempf, R. C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazzarino, M. C., Donia, M., Fagone, P., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., Milella, M., Tafuri, A., Bonati, A., Basecke, J., Cocco, L., Evangelisti, C., Martelli, A. M., Montalto, G., Cervello, M., & McCubrey, J. A. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*, 3(3), 192-222.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43), 15545-15550.
- Tuveson, D. A., Shaw, A. T., Willis, N. A., Silver, D. P., Jackson, E. L., Chang, S., Mercer, K. L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D., Hingorani, S. R., Zaks, T., King, C., Jacobetz, M. A., Wang, L., Bronson, R. T., Orkin, S. H., DePinho, R. A., & Jacks, T. (2004). Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*, 5(4), 375-387.
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E. E., Weissleder, R., & Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661-665.
- Wang, P., Anton, M., Graham, F. L., & Bacchetti, S. (1995). High frequency recombination between loxP sites in human chromosomes mediated by an adenovirus vector expressing Cre recombinase. *Somat Cell Mol Genet*, 21(6), 429-441.
- Wilson, J. M., Kunnimalaiyaan, S., Gambin, T. C., & Kunnimalaiyaan, M. (2014). MK2206 inhibits hepatocellular carcinoma cellular proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest. *J Surg Res*, 191(2), 280-285.
- Wong, K. K., Engelman, J. A., & Cantley, L. C. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 20(1), 87-90.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656-660.
- Yap, T. A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R. D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Pope, L. L., Heaton, S. P., Thomas, G., Garrett, M. D., Sullivan, D. M., de Bono, J. S., & Tolcher, A. W. (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 29(35), 4688-4695.
- Yap, T. A., Yan, L., Patnaik, A., Tunariu, N., Biondo, A., Fearen, I., Papadopoulos, K. P., Olmos, D., Baird, R., Delgado, L., Tetteh, E., Beckman, R. A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Decordova, S., Heaton, S. P., Swales, K., deSouza, N. M., Leach, M. O., Garrett, M. D., Sullivan, D. M., de Bono, J. S., & Tolcher, A. W. (2014). Interrogating two schedules of the AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors

- incorporating novel pharmacodynamic and functional imaging biomarkers. *Clin Cancer Res*, 20(22), 5672-5685.
- Ye, X., Zerlanko, B., Kennedy, A., Banumathy, G., Zhang, R., & Adams, P. D. (2007). Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell*, 27(2), 183-196.
- Ying, H., Elpek, K. G., Vinjamoori, A., Zimmerman, S. M., Chu, G. C., Yan, H., Fletcher-Sananikone, E., Zhang, H., Liu, Y., Wang, W., Ren, X., Zheng, H., Kimmelman, A. C., Paik, J. H., Lim, C., Perry, S. R., Jiang, S., Malinn, B., Protopopov, A., Colla, S., Xiao, Y., Hezel, A. F., Bardeesy, N., Turley, S. J., Wang, Y. A., Chin, L., Thayer, S. P., & DePinho, R. A. (2011). PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF-kappaB-cytokine network. *Cancer Discov*, 1(2), 158-169.
- Yu, D., & Hung, M. C. (2000). Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene*, 19(53), 6115-6121.
- Yuan, W., Stawiski, E., Janakiraman, V., Chan, E., Durinck, S., Edgar, K. A., Kljavin, N. M., Rivers, C. S., Gnad, F., Roose-Girma, M., Haverty, P. M., Fedorowicz, G., Heldens, S., Soriano, R. H., Zhang, Z., Wallin, J. J., Johnson, L., Merchant, M., Modrusan, Z., Stern, H. M., & Seshagiri, S. (2013). Conditional activation of Pik3ca(H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. *Oncogene*, 32(3), 318-326.
- Zhao, Y. Y., Tian, Y., Zhang, J., Xu, F., Yang, Y. P., Huang, Y., Zhao, H. Y., Zhang, J. W., Xue, C., Lam, M. H., Yan, L., Hu, Z. H., Dinglin, X. X., & Zhang, L. (2014). Effects of an oral allosteric AKT inhibitor (MK-2206) on human nasopharyngeal cancer in vitro and in vivo. *Drug Des Devel Ther*, 8, 1827-1837.
- Zhong, H., Sanchez, C., Spitzner, D., Plambeck-Suess, S., Gibbs, J., Hawkins, W. G., Denardo, D., Gao, F., Pufahl, R. A., Lockhart, A. C., Xu, M., Linehan, D., Weber, J., & Wang-Gillam, A. (2013). Synergistic effects of concurrent blockade of PI3K and MEK pathways in pancreatic cancer preclinical models. *PLoS One*, 8(10), e77243.
- Zmajkovicova, K., Jesenberger, V., Catalanotti, F., Baumgartner, C., Reyes, G., & Baccarini, M. (2013). MEK1 is required for PTEN membrane recruitment, AKT regulation, and the maintenance of peripheral tolerance. *Mol Cell*, 50(1), 43-55.
- Zondag, G. C., Evers, E. E., ten Klooster, J. P., Janssen, L., van der Kammen, R. A., & Collard, J. G. (2000). Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 149(4), 775-782.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Schmid, der mir ermöglicht hat in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar zu promovieren.

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. Saur für die hervorragende Betreuung, seine zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und seine stets freundliche Diskussionsbereitschaft. Ich habe auch den von ihm allzeit geförderten kollegialen und freundschaftlichen Austausch in seiner Arbeitsgruppe sehr geschätzt.

Ganz besonders danke ich Herrn Stefan Eser für seine außerordentliche Unterstützung beim Erlernen wissenschaftlicher Arbeitstechniken, beim Umsetzen neuer Ideen sowie beim Auswerten und Interpretieren meiner Ergebnisse. Er stand mir immer mit viel Hilfsbereitschaft, Geduld und Motivation zur Seite.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung meiner Doktorarbeit. Ich danke unter anderem Frau Angelika Kroemer, Frau Maren Hieber, Frau Melanie Dobler, Frau Vanessa Klein, Frau Melanie Jahreis, Frau Sandra Diersch, Frau Sabine Klein, Frau Nina Reiff und Frau Magda Zukowska.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren moralischen Beistand, der mir die nötige Energie zur Anfertigung und Vollendung meiner Doktorarbeit gegeben hat.

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die genannten Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift