

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R.M. Schmid)

Stat3 ist ein wichtiger Regulator der Progression präneoplastischer Läsionen im *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese.

Katharina Maria Ludes

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Algül
2. Univ.-Prof. Dr. F.R. Greten
3. Univ.-Prof. Dr. J.H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 04.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.04.2013 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Dissertation sind Inhalt folgender Publikation:

Lesina M., Kurkowski M. U., **Ludes K.**, Rose-John S., Treiber M., Kloppel G., Yoshimura A., Reindl W., Sipos B., Akira S., Schmid R. M., Algül H. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. Cancer Cell *19*, 456-69.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

1. Das Pankreaskarzinom 1

 1.1. Epidemiologie, Klinik und Risikofaktoren 1

 1.2. Molekularbiologische und -genetische Hintergründe 2

2. Das Mausmodell..... 6

 2.1. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem 6

 2.2. Das *Kras*^{G12D}-Mausmodell..... 8

3. Der Stat3-Signalweg 10

4. Zielsetzung der Arbeit..... 13

II. MATERIAL UND METHODEN 14

1. Material 14

 1.1. Geräte und Hilfsmittel 14

 1.2. Chemikalien 15

 1.3. Kommerziell erhältliche Kits 16

 1.4. Puffer und Lösungen..... 17

 1.5. Antikörper 18

 1.6. Primer..... 19

 1.7. Mäuse..... 19

2. Methoden..... 20

 2.1. Versuchstiere 20

 2.1.1. Resektion 20

 2.2. Molekularbiologische Methoden 20

 2.2.1. DNA-Isolation aus der Mausschwanzspitze 20

 2.2.2. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) 20

 2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese 21

 2.3. Proteinchemische Methoden..... 22

 2.3.1. Proteinextraktion aus Mauspankreasgewebe 22

 2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung 22

 2.3.3. Western Blot Analyse 23

 2.4. Histochemische Methoden..... 25

 2.4.1. Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten 25

2.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung).....	25
2.4.3. Immunhistochemie	26
III. ERGEBNISSE	28
1. Pankreasspezifische Inhibition des Stat3-Signalwegs in der Maus.....	28
1.1. Generierung einer pankreasspezifisch Stat3-defizienten Mauslinie <i>Stat3^{Δpanc}</i> unter Anwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems	28
1.2. Biochemische und morphologische Charakterisierung von <i>Stat3^{Δpanc}</i> -Mäusen	30
1.2.1. Proteinchemischer Nachweis fehlender pankreatischer Stat3 ^{Y705} -Expression ..	30
1.2.2. Charakterisierung des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments.....	31
2. Nachweis der Aktivierung des Stat3-Signalwegs im <i>Kras^{G12D}</i>-Mausmodell.....	34
2.1. Proteinchemischer Nachweis pankreatischer phospho-Stat3 ^{Y705} -Expression in <i>Kras^{G12D}</i> -Mäusen	34
2.2. Expression von Effektor- und Zielproteinen des Jak2/Stat3-Signalwegs im <i>Kras^{G12D}</i> -Mausmodell.....	34
3. Inaktivierung des Stat3-Signalwegs im <i>Kras^{G12D}</i>-Mausmodell.....	37
3.1. Generierung der pankreasspezifisch Stat3-defizienten Tumormodellmaus <i>Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}</i>	37
3.2. Biochemische und morphologische Charakterisierung von <i>Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}</i> -Mäusen.....	37
3.2.1. Proteinchemischer Nachweis fehlender pankreatischer Stat3 ^{Y705} -Expression ..	37
3.2.2. Proteinchemischer Nachweis von konstitutiv aktivem K-Ras-Protein.....	38
3.2.3. Untersuchungen zur Stat3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705.....	39
3.2.4. Analyse des makroskopischen Pankreasaspekts.....	39
4. Einfluss der Inaktivierung von Stat3 auf die PanIN-Entwicklung im <i>Kras^{G12D}</i>-Mausmodell.....	42
4.1. Verzögerte PanIN-Progression in <i>Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}</i> -Mäusen.....	42
4.1.1. Morphologische Charakterisierung der PanIN-Läsionen	42
4.1.2. Quantitative Auswertung der PanIN-Läsionen.....	46
5. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	48
IV. DISKUSSION	49
1. Stat3 hat keinen Einfluss auf Morphologie und Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments	49
2. Die Aktivität des Stat3-Signalwegs im <i>Kras^{G12D}</i>-Mausmodell	51

3. Die Funktion von Stat3 in der <i>Kras</i>^{G12D}-induzierten pankreatischen Onkogenese	55
4. Ausblick	61
V. ZUSAMMENFASSUNG	63
VI. LITERATURVERZEICHNIS	65
VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
VIII. TABELLENVERZEICHNIS	75
IX. DANKSAGUNG	76

ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	Bovines Serumalbumin
BRCA2	breast cancer gene 2
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CK-19	Cytokeratin-19
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Cox-2	Cyclooxygenase-2
Cre	cyclization recombination
DAB	Diaminobenzidin
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGF	epidermal growth factor
F	Flox
FAMMM	familial atypical mole-malignant melanome
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
gp130	Glykoprotein 130
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
Hsp-70	heat shock protein-70
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Jak	Janus Kinase
kD	Kilodalton
l	Liter
loxP	locus of x-over of P1
LSAB	Labeled-Strept-Avidin-Biotin
LSL	lox-STOP-lox
M	Molar
McI-1	myeloid leukemia cell differentiation protein 1
Min.	Minute(n)
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2
Muc5	Mucin 5
OSM	Oncostatin M
p	phospho
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
Pdx-1	pankreatischer und duodenaler Homeoboxfaktor 1
PFA	Paraformaldehyd
PIAS	protein inhibitor of activated Stat
PRSS1	Protease, Serin, 1
PSC	pancreatic stellate cell
Ptfl	Pankreastranskriptionsfaktor 1
PTPase	Protein Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBD	Ras-bindende Domäne
RIP	rat insulin promotor
RNA	ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src-homology 2
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
SOCS	supressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription (human)
Stat	signal transducer and activator of transcription (murin)
STK11	Serin/Threonin Kinase 11
Strep	Streptomycin
TAD	Transkription-Aktivierende Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor-beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot

I. EINLEITUNG

1. Das Pankreaskarzinom

1.1. Epidemiologie, Klinik und Risikofaktoren

Im Jahr 2010 erkrankten in den USA 43 140 Menschen am Pankreaskarzinom, wovon 36 800 auch daran verstarben. Damit stellt dieses Karzinom die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in der westlichen Welt dar (Jemal et al. 2010). Die mittlere Überlebenszeit beträgt nur drei bis fünf Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 5 % (Hezel et al. 2006).

Diese schlechte Prognose lässt sich unter anderem auf den Umstand zurückführen, dass das Pankreaskarzinom aufgrund fehlender Frühsymptomatik in der Regel erst sehr spät diagnostiziert wird. Weniger als 20 % der Patienten weisen bei Diagnosestellung lokalisierte, potentiell heilbare Tumore auf. Unspezifische Beschwerden im Spätstadium der Erkrankung sind unklare abdominelle Beschwerden oder Übelkeit. Da die Mehrzahl der Karzinome im Bereich des Pankreaskopfes lokalisiert sind, leiden die Patienten zudem häufig an einer obstruktiven Cholestase (Hidalgo 2010).

Darüber hinaus trägt das hochaggressive Ausbreitungsmuster des Pankreaskarzinoms in Form frühzeitiger Metastasierung in lymphatische und periphere Organe zur infausten Prognose dieser Krebserkrankung bei. 80 % der Patienten weisen bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen auf (Yeo et al. 2002).

Zudem spricht der Tumor schlecht auf therapeutische Maßnahmen an. Die einzige kurative Therapieoption stellt die chirurgische Resektion in Form einer partiellen Pankreatektomie dar, wobei nur 10-20 % der Karzinome überhaupt resezierbar sind und nur 20 % der chirurgisch behandelten Patienten die ersten drei Jahre nach der Operation überleben (Shaib et al. 2007). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom konnte auch durch den Ersatz des vorherigen Standardchemotherapeutikums 5-Fluoruracil gegen Gemcitabin nur gering von 4,4 auf 5,7 Monate gesteigert werden (Burris et al. 1997).

In den letzten Jahren wurden im Rahmen zahlreicher Studien mögliche Faktoren ermittelt, die das Risiko am Pankreaskarzinom zu erkranken erhöhen. Neben dem Alter konnte in den diversen Untersuchungen jedoch nur das Rauchen einheitlich als Risikofaktor deklariert werden. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei

73 Jahren. Karzinome vor dem 40. Lebensjahr werden nur selten beobachtet. Der Zigarettenkonsum stellt den führenden vermeidbaren Risikofaktor in der Pankreaskarzinogenese dar. 25 % aller Karzinome lassen sich auf das Rauchen zurückführen. Weitere mögliche Risikofaktoren sind eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, Übergewicht, ein lange bestehender Diabetes Mellitus sowie eine chronische Pankreatitis (Lowenfels et al. 2006).

5-10 % aller Pankreaskarzinome beruhen auf einer familiären Disposition. Die genetische Basis ist in den meisten Fällen gehäuften Auftretens maligner Neoplasien des Pankreas unklar. Für einen kleinen Teil der familiären Karzinome sind jedoch autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutationen bestimmter Gene verantwortlich. Hierbei handelt es sich um folgende hereditäre Tumorprädispositionssyndrome:

- Das Peutz-Jeghers-Syndrom, bei dem das Tumorsuppressorgen *STK11* (Serin/Threonin Kinase 11) mutiert ist;
- die hereditäre Pankreatitis, die mit einer Mutation des kationischen Trypsinogen Gens *PRSSI* (Protease, Serin 1) einhergeht;
- das FAMM (familial atypical mole-malignant melanome)-Syndrom, bei dem der Genlocus *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) betroffen ist;
- sowie das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom mit der *BRCA2* (breast cancer gene 2)-Mutation (Shi et al. 2009).

Allerdings scheinen die mit diesen Syndromen assoziierten Genmutationen eher zur Progression bereits bestehender prämaligener Läsionen als zur Tumorentstehung beizutragen (Yeo et al. 2002).

1.2. Molekularbiologische und -genetische Hintergründe

Das duktales Adenokarzinom stellt mit einem Anteil von über 85 % den häufigsten histologischen Subtyp des Pankreaskarzinoms dar (Warshaw et al. 1992). Daher werden die Begriffe duktales Adenokarzinom des Pankreas und Pankreaskarzinom in dieser Arbeit synonym verwendet.

Histopathologische und molekulargenetische Untersuchungen haben zur Etablierung eines definierten Tumorprogressionsmodells für das Adenokarzinom des Pankreas geführt. Demnach entwickelt es sich auf der Basis spezifischer, aufeinander folgender Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs). Es werden drei PanIN-Stufen beschrieben (PanIN-1 – PanIN-3), wobei mit steigendem

Stadium jeweils die zellulären und architektonischen Atypien im Bereich der duktalem Strukturen im Pankreas zunehmen (siehe Abbildung 1).

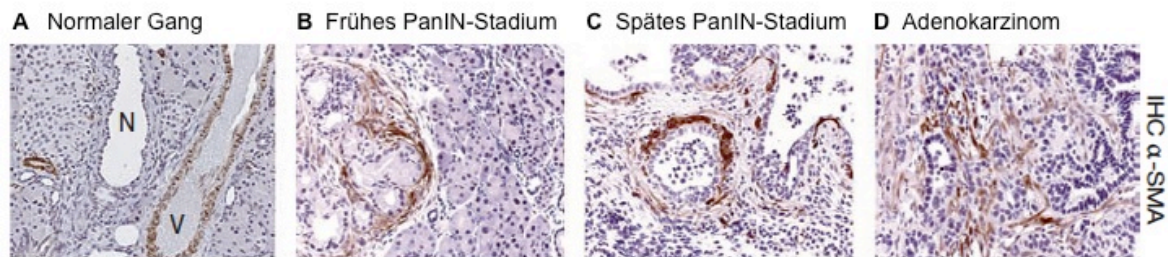


Abbildung 1: Morphologisches Progressionsmodell des duktalem Pankreasadenokarzinoms.

Die immunohistochemische Färbung α -smooth muscle actin (α -SMA)-exprimierender Zellen stellt die Akkumulation pankreatischer Sternzellen in der Nachbarschaft früher (B) und später (C) PanIN-Läsionen sowie im Bereich des Adenokarzinoms (D) dar. In der Nachbarschaft normaler Gänge (N) lassen sich keine pankreatischen Sternzellen detektieren. Blutgefäße (V) dienen als Positivkontrolle (modifiziert nach Algül et al. 2007b).

PanIN-1A- und -1B-Läsionen weisen eine Zellkörperverlängerung sowie eine vermehrte Schleimproduktion auf. Zusätzlich gehen im Stadium 1B die normalerweise flachen duktalem Strukturen in ein papilläres Wachstumsmuster über. Diese frühesten Vorläuferläsionen finden sich bei bis zu 40 % aller Erwachsenen auch ohne invasives Pankreaskarzinom. Das PanIN-2-Stadium ist charakterisiert durch das Auftreten nukleärer Atypien, deren Schwere in PanIN-3-Läsionen noch zunimmt. In diesem letzten Stadium beobachtet man zudem sich ins duktalem Lumen vorwölbende epitheliale Zellen sowie luminale Nekrosen. PanINs der Stufe 3 sind in weniger als 5 % der gesunden Organe jedoch in 30-50 % aller invasiven Tumore nachweisbar (Hruban et al. 2004).

Histopathologisch charakteristisch für das Pankreasadenokarzinom ist darüber hinaus das Vorliegen eines reaktiven desmoplastischen Stromas angrenzend an das Tumorgewebe. Dieses Stroma formiert ein komplexes „Tumor-Microenvironment“, das sich aus extrazellulären Matrixproteinen, neugebildeten Blutgefäßen und einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen zusammensetzt. Hierzu zählen proliferierende Fibroblasten und pankreatische Sternzellen (pancreatic stellate cells = PSC), die Fibronectin und Kollagen produzieren, sowie inflammatorische Zellen und Makrophagen, die Chemokine und Zytokine freisetzen (Algül et al. 2007b).

Parallel zu den morphologischen Atypien lassen sich den einzelnen PanIN-Läsionen auch bestimmte molekulargenetische Veränderungen zuweisen, die in ihrer Anzahl und Schwere ebenfalls mit dem Grad der Läsion steigen (vergleiche Abbildung 2). Hierbei handelt es sich, wie in Tumoren im Allgemeinen, vornehmlich um Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Feldmann et al. 2007).

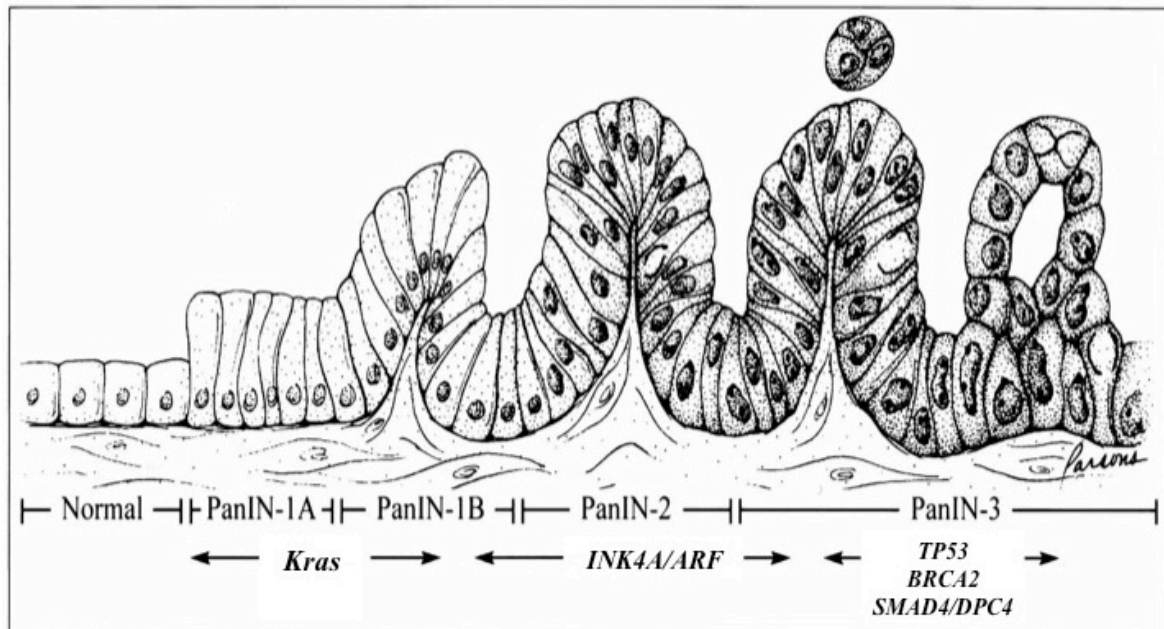


Abbildung 2: Progressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms mit Darstellung der genetischen Alterationen.

(modifiziert nach Hruban 2000).

Die wichtigste mit dem Pankreaskarzinom assoziierte Mutation eines Onkogens ist die *Kras*-Mutation. Sie ist bereits in etwa 40 % der frühen PanIN-Läsionen und in nahezu 100 % der Adenokarzinome nachweisbar (Almoguera et al. 1988; Löhr et al. 2005). Das Genprodukt von *Kras* gehört zur Gruppe der Ras-Proteine. Hierbei handelt es sich um kleine, 21 kD schwere, G-Proteine, die an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind. Aktiviert wird K-Ras, wie die anderen Ras-Proteine auch, über die Bindung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Hormonen an extrazellulär befindliche Transmembranrezeptoren, zumeist Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), wie zum Beispiel den EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor. Die Rezeptor-Liganden-Interaktion bewirkt die Umwandlung von inaktivem, GDP-gebundenen K-Ras in die aktive, GTP-korrelierte Form. Über nachgeschaltete Signalkaskaden, wie zum Beispiel den Raf-mitogen-activated protein kinase (Raf-MAPK)-Signalweg, wird der extrazelluläre Stimulus dann in eine veränderte Genexpression im Nukleus umgesetzt, wodurch Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose reguliert werden (Campbell et al. 1998). Bei den *Kras*-Mutationen handelt es sich fast ausschließlich um Punktmutationen im Bereich des Kodons 12, wobei hier ein Glycin durch ein Valin, Arginin oder Aspartat ersetzt wird. Dies führt zu einer herabgesetzten oder aufgehobenen Sensitivität des Proteins gegenüber Ras-GTPase aktivierenden Proteinen (GAP), welche zusätzlich zur schwachen intrinsischen GTPase Aktivität für eine Inaktivierung des K-Ras-Moleküls benötigt werden. Es resultiert eine

konstitutive, deregulierte, zellproliferative K-Ras-Aktivität (Hruban et al. 1993; Hingorani et al. 2003b).

Die zweite im Pankreaskarzinom häufig mutierte Genklasse sind die Tumorsuppressorgene. Mutationen dieser Gene führen im Gegensatz zu onkogenetischen Mutationen meist zu einem Funktionsverlust des jeweiligen Genprodukts.

Beispiele hierfür sind die Tumorsuppressorgene *INK4A* und *ARF*, die beide auf dem Genlocus 9q21 lokalisiert sind. *INK4A*, das auch als *CDKN2A* bezeichnet wird, ist in 80-95 % aller sporadischen Pankreasadenokarzinome mutiert (Rozenblum et al. 1997). Es kodiert für das tumorsuppressive Protein p16, welches über eine inhibitorische Bindung an die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk4 und Cdk6 die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und darüber den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Konsequenterweise resultiert aus Mutationen dieses Gens ein unkontrolliertes Zellwachstum durch eine unzureichende Kontrolle der Zell-Zyklus-Progression. Das zweite auf diesem Genlocus ansässige Tumorsuppressorgen *ARF* kodiert für das Protein p19, welches den Tumorsuppressor p53 stabilisiert, indem es die MDM2-abhängige proteasomale Degradation von p53 verhindert. Ein Absinken des p19-Spiegels im Rahmen einer Mutation des zugehörigen Gens führt somit auch zu einer Reduktion des p53-Protein Levels (Bardeesy et al. 2002; Lowe et al. 2003).

Das p53-kodierende Tumorsuppressorgen *TP53* auf Chromosom 17p ist in 50-75 % der Pankreastumore, zumeist in fortgeschrittenen PanIN-3-Läsionen mutiert (Redston et al. 1994). Da p53 unter anderem das Fortschreiten von Zellen im Zell-Zyklus beim Vorhandensein von DNA-Schäden verhindert, trägt ein Funktionsverlust des Proteins, gerade in späten PanIN-Stadien, zu Akkumulation von DNA-Schäden bei. So können Zellen, die bereits prokarzinogene chromosomale Aberrationen aufweisen, überleben, wodurch das Tumorwachstum positiv beeinflusst wird (Vogelstein et al. 2000).

Weitere an der späteren Pankreaskarzinogenese beteiligte Tumorsuppressoren sind *BRCA2* und *SMAD4/DPC4*. *SMAD4/DPC4* stellt einen wichtigen Regulator des Transforming Growth Faktor- β (TGF- β)-Signalwegs dar. TGF- β hemmt entweder über einen G1-Arrest im Zell-Zyklus oder über pro-apoptotische Mechanismen das Wachstum epithelialer Zellen. Über eine Dysregulation dieser Signalkaskade können *SMAD4/DPC4*-Mutationen zur unkontrollierten Proliferation duktaler Zellen im Pankreas beitragen (Schneider et al. 2003).

2. Das Mausmodell

Zur genaueren Untersuchung der molekularbiologischen und -genetischen Hintergründe in der Genese des Pankreaskarzinoms wurden in den letzten Jahren einige Mausmodelle entwickelt. Über das Ausschalten relevanter Tumorsuppressorgene bzw. die Aktivierung von Onkogenen lässt sich die Entwicklung von Vorläuferläsionen bis hin zum invasiven Karzinom in der Maus veranschaulichen. Dadurch können Rückschlüsse auf die entsprechenden Prozesse in humanen Tumoren und mögliche Hinweise auf eine effizientere Therapie erzielt werden (Hruban et al. 2006).

Ein für die Generierung genetisch gezielt veränderter Mäuse essentielles Verfahren ist das Cre/loxP-Rekombinationssystem. Dieses System war auch für die Etablierung des in dieser Arbeit verwendeten *Kras*^{G12D}-Mausmodells essentiell. Im Folgenden werden daher sowohl die Cre/loxP-Technologie als auch das *Kras*^{G12D}-Mausmodell detailliert beschrieben.

2.1. Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Unter Rekombination versteht man die durch spezialisierte Enzyme (Rekombinasen) katalysierte Spaltung und Neuverknüpfung von DNA. Ein in der Forschung häufig angewendetes Rekombinationssystem arbeitet mit der sogenannten Cre (cyclization recombination)-Rekombinase. Hierbei handelt es sich um ein 38 kD schweres Protein des Bakteriophagen P1, das die Rekombination zwischen zwei locus of x-over of P1 (loxP)-Erkennungssequenzen auf der DNA katalysiert. LoxP besteht aus einer Kernsequenz aus acht Basenpaaren, die wiederum von zwei, jeweils 13 Basenpaaren langen, palindromischen Elementen flankiert wird. Ein durch zwei loxP-Sequenzen flankierter („gefloxter“) DNA-Abschnitt wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes aus der DNA herausgeschnitten und intrazellulär abgebaut. Auf der DNA verbleibt anschließend eine einzelne loxP-Sequenz (Sauer et al. 1988; Nagy 2000).

Das System trug in den letzten Jahren maßgeblich zur Generierung gewebespezifischer Knockout-Mäuse bei. Hierzu werden zwei genetisch veränderter Mauslinien benötigt (siehe Abbildung 3).

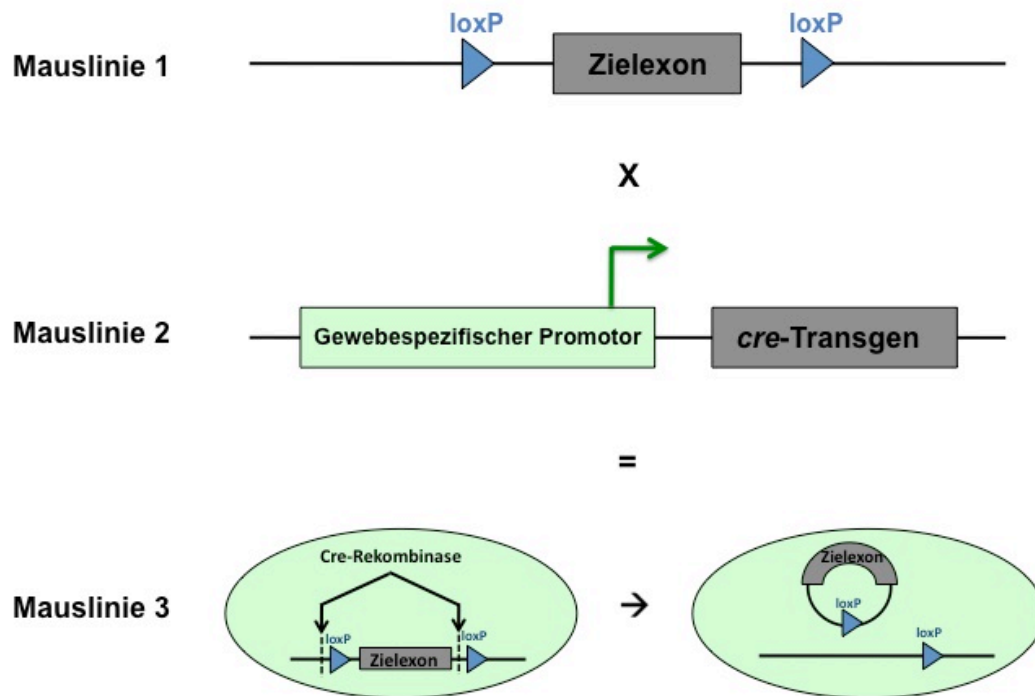


Abbildung 3: Gewebespezifische Gendeletion in der Maus mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.

Der grüne Pfeil kennzeichnet den Vorgang der Transkription; hellgrüne Ellipsen kennzeichnen das Gewebe, in dem die Cre-Rekombinase aktiv ist.

Die eine Mauslinie (Mauslinie 1) trägt ein gefloxtes Allel des Gens, das gezielt aus der DNA herausgeschnitten werden soll. Hierzu werden zwei loxP-Sequenzen in das Zielexon flankierende Intronsequenzen eingebaut. So bleibt das gefloxtes Gen funktionsfähig. Die zweite beteiligte Mauslinie (Mauslinie 2) exprimiert die Cre-Rekombinase selektiv in bestimmten Zelltypen. Um dies zu erreichen, wird ein *cre*-Transgen ins Genom integriert, das unter die Kontrolle eines nur in bestimmten Geweben vorkommenden Promotors gestellt wird. So können nur die Zellen die Cre-Rekombinase bilden, die auch über den entsprechenden Promotor verfügen. Die aus der Kreuzung der beiden Mauslinien hervorgehende Maus (Mauslinie 3) weist nun eine Exzision des loxP-markierten Exons und so eine Deletion des Zielgens in den Zelltypen auf, die die Cre-Rekombinase exprimieren. In allen anderen Geweben, die das *cre*-Gen nicht transkribieren, bleibt die Funktionalität des Zielgens erhalten. Auf diesem Wege lässt sich ein gewebespezifischer Gen-Knockout im Mausmodell erzielen (Sauer 1998; Metzger et al. 1999).

Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe der Cre/loxP-Strategie auch Mutationen einzelner Gene über die Verwendung loxP-markierter STOP-Kassetten gewebespezifisch etablieren. Diese Anwendungsweise kam im *Kras*^{G12D}-Mausmodell zum Tragen und wird daher im Rahmen der Beschreibung dessen genauer erläutert.

2.2. Das *Kras*^{G12D}-Mausmodell

In dieser Arbeit spielt das von David Tuveson und Tyler Jacks begründete *Kras*^{G12D}-Mausmodell eine entscheidende Rolle. Es basiert auf der gezielten, spezifischen Aktivierung einer onkogenen *Kras*-Mutation im Pankreas der Maus. Hierzu wurde zunächst über das Einbringen eines Plasmids in einen Mausstamm ein *Kras*-Allel konstruiert, das eine aktivierende Glycin-zu-Aspartat-Punktmutation auf dem Kodon 12 (G12D) im Bereich des Exons 1 aufweist (Jackson et al. 2001). Um zu erreichen, dass dieses *in-vivo* zu einer konstitutiven K-Ras-Protein-Aktivität führende *Kras*^{G12D}-Allel gezielt nur in Zellen des Pankreas exprimiert wird, wurde das unter I.2.1. beschriebene Cre/loxP-Rekombinationssystem angewendet.

Im Rahmen dessen wurde dem das am Kodon 12 mutierte Exon 1 enthaltenden Bereich des *Kras*^{G12D}-Allels eine lox-STOP-lox (LSL)-Sequenz vorgeschaltet (siehe Abbildung 4). Dadurch wurde das veränderte Exon von seinem zugehörigen Promotor getrennt und so die Transkription verhindert. Es resultierte die LSL-*Kras*^{G12D}-Mauslinie, in der das onkogene K-Ras-Protein nicht exprimiert werden kann. Um nun eine Aktivität des *Kras*^{G12D}-Allels spezifisch und ausschließlich im Pankreas zu erzielen, wurde die geflochte Mauslinie mit einer Mauslinie gekreuzt, in der die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des pankreasspezifischen *Ptf1a*-Promotors gestellt wurde. Hierzu wurde auf einem Allel von *Ptf1a* Exon 1 endogen durch das *cre*-Rekombinase-Gen ersetzt. Die entstandene Mauslinie wird daher als *Ptf1a-cre*^{ex1} bezeichnet (Nakhai et al. 2007).

Ptf1a kodiert für das 48 kD schwere basic helix-loop-helix Protein (bHLH) P48, das die sequenzspezifische DNA-bindende Untereinheit des trimerischen Pankreastranskriptionsfaktors 1 (Ptf1) darstellt (Kawaguchi et al. 2002). P48 wird ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung der Maus ausschließlich in pankreatischen Progenitorzellen exprimiert und ist gemeinsam mit dem ab Tag 8,5 auftretenden pankreatischen und duodenalen Homeobox Faktor 1 (Pdx-1) für die pankreasspezifische Differenzierung der Zellen verantwortlich. Nur *Pdx-1* und *Ptf1a* doppelt-positive Progenitorzellen können sich in Pankreasgewebszellen entwickeln, wobei in erwachsenen Mäusen Pdx-1 für die Differenzierung in Inselzellen essentiell ist, wohingegen P48 die Entwicklung zu Azinuszellen initiiert (Kim et al. 2002). Eine Nullmutation des *Ptf1a*-Gens mit Verlust von P48 führte in Experimenten zu einem vollständigen Fehlen des exokrinen Pankreas und endete letal kurz nach Geburt der Mäuse (Krapp et al. 1998).

Aus der Kreuzung der LSL-*Kras*^{G12D}- mit der *Ptf1a-cre*^{ex1}-Linie entstand nun eine für das *Kras*^{G12D}-Allel heterozygote Mausmutante LSL-*Kras*^{+G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1}, die kurz als

$Kras^{G12D}$ bezeichnet wird. Die Transkription des mutierten Exons 1 des $Kras^{G12D}$ -Allels in dieser Maus wird durch die Exzision der transkriptionsinhibierenden, loxP-markierten STOP-Sequenz durch die *Ptf1a*-Cre-Rekombinase ermöglicht (vergleiche Abbildung 4).

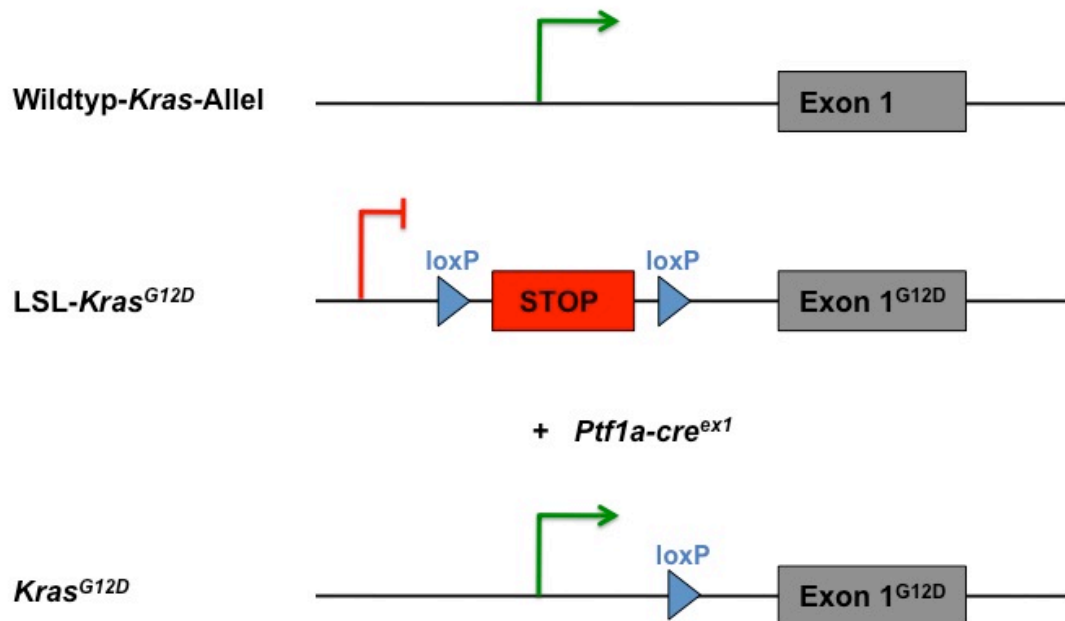


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung der $Kras^{G12D}$ -Linie.

Grüne Pfeile kennzeichnen den Vorgang der Transkription (modifiziert nach Hingorani et al. 2003a).

Das onkogene K-Ras-Protein wird nur in den Zellen der $Kras^{G12D}$ -Maus exprimiert, die den Promotor *Ptf1a* und darüber die Cre-Rekombinase transkribieren können, demnach nur in pankreatischen Vorläuferzellen sowie im exokrinen und in Teilen des endokrinen Pankreas. Auf diesem Wege gelang es Tuveson und Kollegen die $Kras^{G12D}$ -Mutation spezifisch im Pankreas der Maus zu etablieren und so die dortige Karzinomentwicklung zu initiieren (Hingorani et al. 2003a).

Histopathologische Untersuchungen der Pankreata unterschiedlich alter $LSL-Kras^{G12D};Ptf1a-cre^{ex1}$ ($Kras^{G12D}$)-Mäuse zeigen mit einer hundertprozentigen Penetranz das komplette Spektrum an PanIN-Stadien. Die Läsionen sind identisch mit humanen PanINs und steigen in Anzahl und Schweregrad mit dem Alter der Mäuse. Auch invasive, metastatische Karzinome entwickeln sich, allerdings nur in knapp 10 % der Fälle und nach einer Latenz von etwa 9 Monaten. Die Tatsache, dass alle Formen der PanIN-Läsionen in pankreatischen Progenitorzellen allein durch die Mutation von *Kras* erzielt werden können, beweist, dass diese Mutation ein zentrales, initiiierendes Ereignis in der Pankreaskarzinogenese darstellt (Hingorani et al. 2003a).

Das Modell bietet die Möglichkeit über die gezielte Initiierung von präneoplastischen Vorläuferläsionen und invasiven Karzinomen im Pankreas der Maus den Einfluss zusätzlicher genetischer Veränderungen auf die durch onkogenes *Kras* in Gang gesetzte Tumorentstehung zu untersuchen und so mögliche Ansatzpunkte für ein medizinisches Eingreifen in diesen Prozess zu finden.

3. Der Stat3-Signalweg

Stat3 gehört zur Familie der signal transducer and activator of transcription (Stat)-Proteine. Säuger exprimieren sieben unterschiedliche STATs, die als STAT1-6 bezeichnet werden, wobei STAT5 in A und B unterteilt wird. STATs dienen nicht nur als Transmitter extrazellulärer Signale ins Zytoplasma, sondern sind auch dazu in der Lage als Transkriptionsfaktoren selbst gezielt Einfluss auf die Genexpression zu nehmen. Abhängig von ihrer spezifischen Funktion unterscheiden sich die einzelnen STAT-Proteine sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer gewebespezifischen Verteilung im Organismus (Aaronson et al. 2002). Einige STATs spielen in malignen Prozessen eine entscheidende Rolle und dienen daher als Zielobjekte der Krebsforschung (Buettner et al. 2002).

Stat3 ist ein aus 770 Aminosäuren bestehendes Molekül. Es setzt sich, wie die anderen Stat-Proteine auch, aus unterschiedlichen Domänen zusammen, die jeweils in einen bestimmten Teil der Signaltransduktion involviert sind (siehe Abbildung 5).

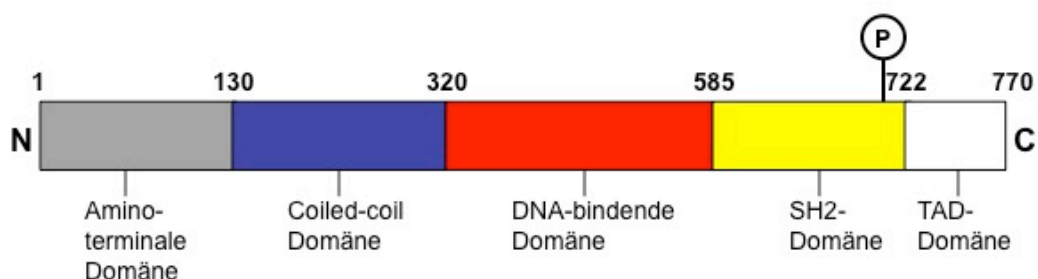


Abbildung 5: Domänenstruktur des Stat3-Moleküls.
(modifiziert nach Becker et al. 1998).

Die Amino-terminale (NH₂)-Domäne spielt in der Stabilisierung der Bindung von Stat3 an die DNA eine Rolle. Die eigentliche DNA-bindende Domäne befindet sich in Mitte des Moleküls, gefolgt von einer SH2 (Scr-homology-2)-Domäne. Hierbei handelt es sich um den am besten konservierten Bereich des Stat3-Moleküls, was sich durch seine essentielle Funktion sowohl als Bindungsstelle für die Tyrosin-phosphorylierte Rezeptordomäne als

auch als Ort der Stat3-Dimerisierung erklären lässt. Die Aktivierung von Stat3 äußert sich in einer Tyrosinphosphorylierung am Tyrosinrest 705, der sich direkt angrenzend an die SH2-Domäne befindet. Am C-Terminus des Proteins findet sich schließlich eine die Transkription aktivierende Domäne (TAD). Sie stellt den variabelsten Bereich des Moleküls dar und ist so in der Lage mit unterschiedlichen die Transkription regulierenden Faktoren zu interagieren (Becker et al. 1998; Schindler et al. 2007).

Die Aktivierung von Stat3 in der normalen Signaltransduktion (vergleiche Abbildung 6) wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie den epidermal growth factor (EGF) oder Zytokinen der Interleukin (IL)-6-Familie an für sie spezifische Zelloberflächenrezeptoren initiiert. Da der IL-6-Rezeptor über keine eigene intrazelluläre Domäne verfügt, ist sein Wirken stets an das Vorhandensein der ubiquitär exprimierten, intrazellulären Glykoprotein (gp)130-Rezeptoruntereinheit gebunden (Heinrich et al. 1998). Im Gegensatz zu Wachstumsfaktorrezeptoren verfügen die meisten Zytokinrezeptoren, so auch der gp130-Rezeptor, über keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor führt daher zunächst zur Aktivierung und Autophosphorylierung rezeptorassoziierter, intrazellulärer Janus Kinasen (Jak). Die aktivierten Jaks phosphorylieren wiederum den zytoplasmatischen Anteil des Zytokinrezeptors am Tyrosinrest 759, der als Andockstelle für die SH2-Domäne des Stat3-Moleküls, das in inaktiver Form als Monomer im Zytoplasma vorliegt, dient. Das Rezeptor-gebundene Stat3-Monomer wird daraufhin Jak-vermittelt am Tyrosin 705 phosphoryliert. Das dabei entstehende phospho(p)-Stat3^{Y705}-Protein ist in dazu in der Lage über reziproke Phosphotyrosin-SH2-Interaktionen mit einem weiteren phosphorylierten Stat3-Monomer ein aktives Dimer zu formen. Die aktivierten Dimere translozieren daraufhin in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-response Elemente in Promotoren von Zielgenen binden und so deren Transkriptionsrate massiv erhöhen. Unterstützt wird dieser Mechanismus durch die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren über die TAD-Domäne des Stat3-Moleküls (Leonard et al. 1998; Levy et al. 2002).

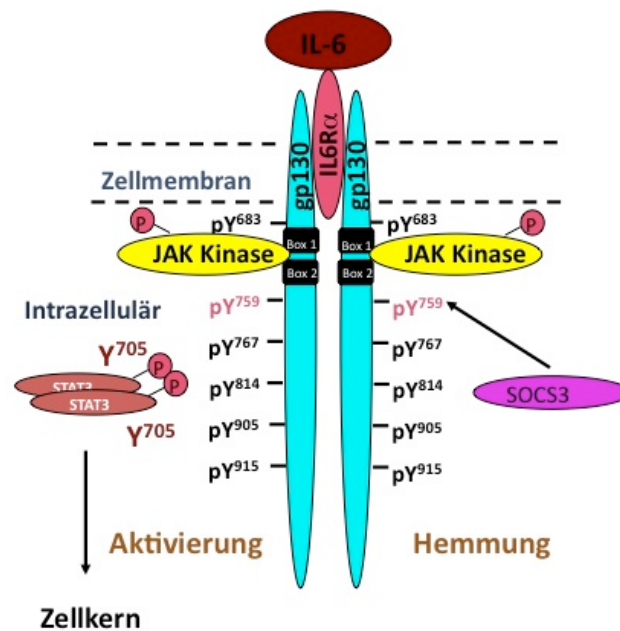


Abbildung 6: Schematische Darstellung des IL-6/gp130/STAT3/SOCS3-Signalwegs.

Normalerweise wird die Stat3-Aktivität streng durch verschiedene inhibitorische Proteine reguliert, deren Bildung zumeist im Sinne einer negativen Rückkopplung durch dieselben Zytokine stimuliert wird, die Stat3 aktivieren. Zu den wichtigsten Inhibitoren zählen das suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)-Protein (siehe Abbildung 6), protein inhibitor of activated Stat (PIAS) und Protein Tyrosinphosphatasen (PTPasen) (Shuai 2000; Kubo et al. 2003).

In einer wachsenden Anzahl maligner Tumoren hingegen kommt es, beispielsweise durch überaktive Rezeptor-Tyrosinkinase, zu einer konstitutiven Stat3-Phosphorylierung und -Aktivierung. Da die durch Stat3 aktivierten Zielgene in eine Vielzahl fundamentaler biologischer Prozesse, wie Apoptose, Proliferation, Inflammation und Angiogenese, involviert sind, führt eine konstitutive Stat3-Aktivität konsequenterweise über eine gesteigerte Expression der betreffenden Zielgene zu einer Dysregulation dieser Prozesse (Yu et al. 2004). Dies kann zum Überleben und Wachstum entarteter Zellen beitragen und so die Entwicklung und Entstehung von Karzinomen maßgeblich unterstützen, weshalb *Stat3* als Onkogen angesehen wird (Bromberg et al. 1999).

Schlussfolgernd könnte eine Inhibition des Stat3-Proteins auf molekularer Ebene die Karzinomentstehung hemmen oder gar verhindern, was das Molekül zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Krebsforschung macht (Yu et al. 2004).

4. Zielsetzung der Arbeit

Die *Kras*^{G12D}-Mutation führt im murinen *in-vivo*-Modell altersabhängig zur Entstehung pankreatischer intraepithelialer Neoplasien (Hingorani et al. 2003a). Spezifische molekulare Mechanismen, die die *Kras*^{G12D}-induzierte PanIN-Progression hin zu invasiven duktalem Adenokarzinomen vorantreiben, sind bisher jedoch weitgehend unbekannt.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 konnte bereits in zahlreichen humanen Karzinomen nachgewiesen werden (Yu et al. 2004). Obwohl eine STAT3-Aktivierung auch in humanen PanINs und Pankreaskarzinomen beschrieben ist (Scholz et al. 2003), wurde die genaue Funktion dieses Signalwegs in der pankreatischen Onkogenese bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von Stat3 auf die durch die *Kras*^{G12D}-Mutation induzierte murine Pankreaskarzinogenese zu untersuchen.

Folgende Fragen waren hierbei von Relevanz:

- 1) Lässt sich in PanINs von LSL-*Kras*^{G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Mäusen eine Aktivierung des Stat3-Signalwegs nachweisen?
- 2) Falls der Stat3-Signalweg im *Kras*^{G12D}-Mausmodell aktiviert ist, welchen Einfluss hat dann eine Inaktivierung der Stat3-abhängigen Signaltransduktion auf die Entwicklung und Progression von PanIN-Läsionen in *Kras*^{G12D}-Mäusen?

Sollte sich herausstellen, dass der Stat3-Signalweg eine essentielle Funktion in der murinen pankreatischen Onkogenese einnimmt, könnten daraus Rückschlüsse auf die entsprechenden Prozesse in humanen Pankreaskarzinomen gezogen werden. Hieraus könnten wiederum möglicherweise neue therapeutische Angriffsmöglichkeiten in der bisher weitgehend frustrierten Behandlung dieses hochaggressiven Tumors abgeleitet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Name und Firma
Agarosegel-Bildwandler	Molecular Imager Gel Doc XR System (Biorad, München)
Agarosegelkammer	Sub-Cell GT (Biorad, München)
Elektrophoreseapparatur	Mini-PROTEAN Tetracell (Biorad, München)
Entwicklermaschine	Amersham Hyperprocessor (GE Healthcare, München)
Filmkassette	BAS Cassette 2025 (Fujifilm, Kleve)
Heizplatte	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Homogenisator	Diax 900 (Heidolph, Schwabach)
Hyperfilm	Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, München)
Magnetrührer	MR 3001 (Heidolph, Schwabach)
Mikroskope	Axio Imager.A1 (Zeiss, München) Axiovert 40 CFL (Zeiss, München) MZ7 ₅ (Leica, Wetzlar)
Objektträger	Thermo Scientific, Schwerte
pH-Meter	Inolab pH 720 (WTW, Weilheim)
Pipetten	verschiedene (Eppendorf, Hamburg)
Schwenktisch	L40 (Labinco, Breda, Niederlande)
Spektrophotometer	2001 (Anthos, Krefeld)
Stromquelle	Power Pac Basic (Biorad, München)
Thermocycler	Mastercycler (Eppendorf, Hamburg)
Transferapparat	Mini Trans-Blot Cellfer (Biorad, München)
Transfermembran	Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Schwalbach)

Vortexer	Reax top (Heidolph, Schwabach)
Waage	BP 2100S (Sartoris, Göttingen)
Whatman-Papier	Biometra, Göttingen
Zentrifuge	Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
96-Well-Platte	Microtest TM96 Zellkulturplatte (Becton Dickinson, Heidelberg)

Tabelle 1: Geräte und Hilfsmittel.

1.2. Chemikalien

Chemikalie	Name und Firma
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
Agarose	Biozym, Oldendorf
APS	Sigma, Steinheim
Biorad Protein Assay	Biorad, München
Bromphenolblau	Bromphenol blue sodium salt (Sigma, Steinheim)
BSA	Cohn V fraction (Sigma, Steinheim)
ddH ₂ O	Aqua ad injectabilia (Diaco, Naila)
dH ₂ O	Aqua Delta Select Spüllösung (Delta Select, München)
DirectPCR [®] Lysis Reagent	Peqlab, Erlangen
DNA-Größenstandard	DNA-Leiter-Mix (Peqlab, Erlangen)
ECL	Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, München)
Eosin	Chroma, Münster
Ethanol	Apotheke MRI
Goat Serum	Sigma, Steinheim
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Histoclear	Roti-Histol (Roth, Karlsruhe)
30% H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt

Isofluran	Forene (Abbott, Wiesbaden)
Tween	Tween 20 (Roth, Karlsruhe)
Magermilchpulver	Sigma, Steinheim
NP-40	Roche, Mannheim
PBS-Pulver	Instamed PBS Dulbecco (Biochrom AG, Berlin)
Pertex	Medite, Burgdorf
PFA	Apotheke MRI
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Steinheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Protein-Größenstandard	Precision plus protein™ standard (Biorad, München)
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, Steinheim
Rabbit Serum	Sigma, Steinheim
RedTaq ReadyMix	Sigma, Steinheim
SDS	SDS Ultra pure (Roth, Karlsruhe)
TEMED	Sigma, Steinheim

Tabelle 2: Chemikalien.

Folgende Chemikalien wurden in analysereiner Qualität (p.a.) von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen: CaCl₂, EDTA, Ethidiumbromid, Glycin, HEPES, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄, β-Mercaptoethanol.

Folgende Chemikalien wurden in analysereiner Qualität (p.a.) von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen: Glycerin (Glycerol), Methanol, Tris-Base, Tris-HCl.

1.3. Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Firma
DAB/Ni Peroxidase Substrate Kit	Vector, Burlingame, USA
Ras Activation Assay Kit	Biomol, Hamburg
Vectastain ABC-Kit (Standard)	Vector, Burlingame, USA

Tabelle 3: Kommerziell erhältliche Kits.

1.4. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Antigendemaskierungslösung , pH 8,0	1 mM EDTA
IP-Puffer/Lysispuffer Lagerung bei 4 °C	50 mM HEPES, pH 7,9 150 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 0,5 % NP-40 10 % Glycerin Kurz vor der Lyse zugeben: 1mM DTT 0,2 mM PMSF 1 % Protease Inhibitor Cocktail 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail I 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail II
Laemmli-Ladepuffer (5x), pH 6,8	10 % SDS 50% Glycerin 300 mM Tris-HCl 0,05% Bromophenolblau 5% β-Mercaptoethanol
Laufpuffer (10x), pH 8,3	30 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS Auf 1l mit dH ₂ O auffüllen
PBS (10x), pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ Auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen
PBST	PBS (10x) 0,1% Tween-20
4 %iges PFA	20 ml 8 %iges PFA 20 ml PBS
Proteinase K-Puffer , pH 7,5	20 mM CaCl ₂ 10 mM Tris-Base 50 % Glycerin 1% Proteinase-K
Sammelgelpuffer , pH 6,8	0,5 M Tris-HCl Auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen
Stripping-Puffer , pH 2,0	25 mM Glycin 1 % SDS
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50x), pH 8,5	0,5 M EDTA 2 M Tris-Base 1 M Essigsäure

TBS (10x), pH 7,6	24,2 g Tris-Base 80 g NaCl Auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen
TBST	TBS (10x) 0,1 % Tween-20
Transferpuffer (10x), pH 8,3	30 g Tris 144 g Glycin Auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen
Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl Auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen.

1.5. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Firma
β-actin	1:2000	Maus	Sigma, Steinheim
Anti-Hase	1:2000	Ziege	Promega, Mannheim
Anti-Maus	1:2000	Schaf	GE Healthcare, München
Bcl-X _L	1:50	Hase	Cell Signaling, Frankfurt
Biotinylierter Anti-Hase	1:500	Ziege	Vector, Burlingame, USA
Biotinylierter Anti-Meerschweinchen	1:500	Ziege	Vector, Burlingame, USA
Biotinylierter Anti-Ratte	1:500	Hase	Vector, Burlingame, USA
CK-19	1:300	Ratte	Hybridoma Bank, Iowa City, USA
Cox-2	1:200	Ziege	Cayman, Ann Arbor, USA
Cyclin D1	1:100	Hase	Lab Vision, Dreieich
Glucagon	1:100	Meerschweinchen	Millipore, Schwalbach
Hsp-70	1:100	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Insulin	1:100	Meerschweinchen	Millipore, Schwalbach
Mcl-1	1:50	Hase	Epitomics, Burlingame, USA
MMP-2	1:50	Maus	Calbiochem, Gibbstown, USA
Muc5	1:200	Maus	Lab Vision, Dreieich
phospho-Jak2	1:100	Hase	Epitomics, Burlingame, USA

phospho-Stat1	1:1000	Hase	Cell Signaling, Frankfurt
phospho-Stat3 ^{Y705}	1:50 (IHC) 1:1000 (WB)	Hase	Cell Signaling, Frankfurt
Stat1	1:1000	Hase	Santa Cruz, Heidelberg
Stat3 ^{Y705}	1:500	Hase	Cell Signaling, Frankfurt
Stat3	1:1000	Hase	Santa Cruz, Heidelberg
Survivin	1:300	Maus	Santa Cruz, Heidelberg

Tabelle 5: Antikörper.

ICH=Immunhistochemie; WB=Western Blot.

1.6. Primer

Gen	Primername	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
<i>Stat3</i>	Stat-3-Pr-A	CCTGAAGACCAAGTTCATCTGTGTGAC
	Stat-3-Pr-B	CACACAAGCCATCAAACCTCTGGTCTCC
<i>Ptfla-cre</i>	Cre487	GTCCAATTTACTGACCGTACACCAA
	P48as1642	CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA
<i>Kras</i>	Kras 3	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC
	Kras 5	CGCAGACTGTAGAGCAGCG

Tabelle 6: Primer.

1.7. Mäuse

Maus	Kurzbezeichnung	Referenz
LSL- <i>Kras</i> ^{G12D}		(Jackson et al. 2001)
<i>Ptfla-cre</i> ^{ex1}		(Nakhai et al. 2007)
<i>Stat3</i> ^{Flox/Flox}	<i>Stat3</i> ^{F/F}	(Sano 1999)
LSL- <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Ptfla-cre</i> ^{ex1}	<i>Kras</i> ^{G12D}	Eigene Kreuzung
<i>Stat3</i> ^{F/F} ; <i>Ptfla-cre</i> ^{ex1}	<i>Stat3</i> ^{Δpanc}	Eigene Kreuzung
LSL- <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat3</i> ^{F/F} ; <i>Ptfla-cre</i> ^{ex1}	<i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat3</i> ^{Δpanc}	Eigene Kreuzung

Tabelle 7: Mäuse.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Resektion

Die für die Versuche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden nach exakt definierten Zeitpunkten mittels Isofluran-Narkose getötet und anschließend reseziert. Hierzu wurde das Abdomen der Tiere mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und danach mittels einer medianen Laparotomie eröffnet. Die Organe wurden entnommen und für die Immunhistochemie wie unter II.2.4.1. beschrieben behandelt. Teile von Kopf, Korpus und Schwanz des Pankreas wurden für die Proteinchemie in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Schwanzspitze der Mäuse wurde für die Genotypisierung verwendet. Gewicht, Alter, Geschlecht und Genotyp der Tiere sowie alle bei der Resektion beobachteten Auffälligkeiten wurden vermerkt.

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien des lokalen Tierschutzkomitees durchgeführt.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. DNA-Isolation aus der Mausschwanzspitze

Für die Isolation genomischer DNA aus der Mausschwanzspitze wurde das DirectPCR[®] Lysis Reagent verwendet. 0,5-0,6 cm große Schwanzstücke wurden bei 55 °C über Nacht in je 200-250 µl DirectPCR[®] Lysis Reagent, komplettiert mit 0,2-0,3 mg/ml Proteinase K, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 45 Minuten bei 85 °C erhitzt und anschließend für zehn Sekunden zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für die nachfolgende PCR verwendet.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung eines kurzen, definierten DNA-Abschnitts. Hierzu wird eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt, die in der Lage ist mit Hilfe zweier Oligonukleotidprimer einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang zu polymerisieren. Um eine ausreichende Menge an DNA zu erhalten sind 12-50 PCR-Zyklen nötig, die automatisiert in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung

des DNA-Doppelstranges, Anlagerung (Annealing) der Primer und Kettenverlängerung (Elongation) durch die Polymerase.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere angewendet.

Das Reaktionsgemisch wurde dabei jeweils wie folgt angesetzt:

- 100 ng/μl DNA
- 1,0 μl PrimerMix (siehe Tabelle 6)
- 12,5 μl RedTaq ReadyMix
- 10,5 μl ddH₂O

Die PCR-Proben wurden auf Eis vorbereitet und danach in den vorgeheizten Thermocycler überführt. Die Durchführung der PCR erfolgte bei folgenden Bedingungen:

1.	Initiale Denaturierung	93°C	5 min.	
2.	Denaturierung	93°C	1 min.	} 35x
	Annealing	65°C	1 min.	
	Elongation	72°C	2 min.	
3.	Terminale Elongation	72°C	10 min.	

Der Erfolg der DNA-Amplifizierung wurde anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der DNA-Größenbestimmung. Hierzu wird ein aus Agarosepolymeren vernetztes Gel benötigt, in dem die DNA-Moleküle nach Anlegen einer elektrischen Spannung bedingt durch ihre eigene negative Ladung von der Kathode zur Anode wandern. Je kleiner das jeweilige DNA-Molekül, desto schneller bewegt es sich durch die Gelmatrix, sodass eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. Die Agarosekonzentration des Gels, die anliegende Spannung und die Zeit, in der das elektrische Feld anliegt, beeinflussen hierbei die Trennschärfe. Um die aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren während der Elektrophorese zwischen den Basen der DNA, wodurch die Fluoreszenz der Substanz im ultravioletten Licht stark erhöht und

die daran gebundene DNA sichtbar gemacht wird. Ein gleichzeitig mit der DNA aufgetragener Größenstandard dient der Größenbestimmung der Fragmente.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung des Gels 2 % Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und so gelöst. Anschließend wurde pro 10 ml Gellösung 1 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach Verfestigung des Gels konnten je 15 µl der in der PCR amplifizierten DNA-Proben und der Größenstandard in die Geltaschen pipettiert werden. Das Gel lief bei einer Spannung von 3-6 V/cm. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mit einer LCD-Kamera festgehalten. Die Größenanalyse erfolgte mit Hilfe des Gel Doc XR-Systems.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Proteinextraktion aus Mauspankreasgewebe

Das bei der Obduktion der Mäuse gewonnene Pankreasgewebe wurde zunächst auf Eis aufgetaut und danach mit einem Skalpell zerkleinert. Um die Zellen aufzuspalten und die darin enthaltenen Proteine zu isolieren, wurde das Gewebe anschließend mit je 600 µl Lysispuffer resuspendiert und homogenisiert. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurden die Proben abschließend zehn Minuten lang bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand enthielt die extrahierten Proteine und wurde für die weitere Diagnostik verwendet.

2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Biorad Protein Assay nach der Bradfordmethode (Bradford 1976). Basis dieser Methode ist die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 durch Komplexbildung mit Proteinen sein Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm zu erhöhen. Diese Absorptionsänderung lässt sich photometrisch messen und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der eingesetzten Probe.

Auf einer 96-Well-Platte wurde jeweils 1 µl der Probe oder 1 µl des Standards mit 250 µl 1x Bradford-Lösung gemischt. Als Standard diente BSA, das verdünnt mit dH₂O in Form einer Standardreihe (1, 2, 4, 6, 10, 14, 16 und 20 mg/ml) eingesetzt wurde. Mit Hilfe eines Spektrophotometers wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die

Proteinkonzentration der Proben konnte anschließend durch den Vergleich mit einer aus den Konzentrationen der Standards gewonnenen Referenzkurve ermittelt werden.

2.3.3. Western Blot Analyse

Im Rahmen des Western Blots werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen („geblottet“), um sie immunhistochemisch detektierbar zu machen. Hierzu wird das Proteingemisch der eingesetzten Proben zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgt dann durch das Aufbringen spezifischer Primär- und Sekundärantikörper.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Grundlage dieser Methode ist eine aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehende Gelmatrix, in der Acrylamid unter Anwesenheit von Radikalen in einer Kettenreaktion lange Polymere bildet, die durch Bisacrylamid vernetzt werden. Als reaktionsbeschleunigend wirken hierbei TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und das Radikal APS (Ammoniumperoxiddisulfat). Das im Überschuss zugefügte Detergens SDS (Sodium Dodecylsulfat) bindet an die Proteine, die so negativ geladen und im angelegten elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Um eine optimale Bandenschärfe im untersuchten Größenbereich zu erzielen, wird die Elektrophorese diskontinuierlich durchgeführt. Hierzu wird die Gelmatrix in zwei horizontal getrennte Bereiche, das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel, eingeteilt. Je nach Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine wurden in dieser Arbeit Trenngele mit einem Acrylamidgehalt von 7,5 - 15 % verwendet, wobei sich der Anteil an Acrylamid umgekehrt proportional zur Proteingröße verhält. Die Mischverhältnisse der Reagenzien ergaben sich wie folgt:

	Trenngele				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	15 %	
dH ₂ O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,5 ml	3,0 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	1,3 ml
30 % Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	750 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	10 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen.

Als erstes wurde das Trenngel angesetzt, zwischen zwei durch einen Abstandhalter (Spacer) getrennte Glasplatten gegossen und mit dH₂O überschichtet. Nach etwa 30 Minuten war das Gel vollständig polymerisiert und dH₂O konnte abgegossen werden. Das Trenngel wurde mit dem Sammelgel überschichtet, in das ein Geltaschenkamm eingesetzt wurde. Nach weiteren 30 Minuten konnte der Kamm entfernt, die Geltaschen mit dH₂O ausgespült und die Gelmatrix in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt werden. Die Proteinproben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und zehn Sekunden bei 13 200 rpm zentrifugiert. Danach konnten die Proben in die Geltaschen pipettiert werden. Eine Tasche wurde mit dem Proteingrößenstandard belegt. Die Apparatur wurde mit Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese bei einer Spannung von 70 V im Sammelgel und 90-120 V im Trenngel durchgeführt.

Proteintransfer

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran zunächst in Methanol aktiviert, mit dH₂O gespült und zusammen mit Whatman-Filterpapieren und dem Gel in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel und die Membran wurden sandwichartig von sechs Whatman-Papieren umgeben in die Blotkassette eingelegt und in die mit Transferpuffer befüllte Blotkammer überführt. Der Transfer erfolgte auf Eis bei 350 mA für zwei Stunden.

Proteindetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in 5 % Magermilchpulver in TBST inkubiert. Dies diente der Blockade der freien Bindungsstellen auf der Membran. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichteten Primärantikörper in demselben Puffer bei 4 °C über Nacht auf dem Schwenktisch. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal fünf Minuten in TBST gewaschen, eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und erneut dreimal fünf Minuten gewaschen. Der Sekundärantikörper ist an ein bestimmtes Enzym, die Meerrettichperoxidase, gekoppelt, welche in Verbindung mit Luminol eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert. Dabei entsteht Licht, das auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu ECL-Lösung nach Angaben des Herstellerprotokolls verwendet und das Signal auf Hyperfilm mit dem Amersham

Hyperprocessor festgehalten. Die belichteten Stellen auf dem Film entsprachen dem gesuchten Protein.

Falls vom Hersteller im Primärantikörperprotokoll empfohlen, wurde PBST oder BSA anstelle von TBST verwendet.

Zur Demonstration der gleichmäßigen Proteinbeladung detektierten wir das ubiquitär vorkommende Zytoskelettprotein β -actin jeweils auf derselben Membran. Hierzu wurde die Membran 30 Minuten bei RT in Stripping-Puffer und danach eine Stunde in 5 % Magermilchpulver in TBST gewaschen. Anschließend konnte die Membran mit dem β -actin-Antikörper inkubiert werden.

2.4. Histochemische Methoden

2.4.1. Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten

Die bei der Resektion der Mäuse gewonnenen Organe wurden über Nacht in 4 %igem PFA fixiert. Das PFA wurde am nächsten Tag gegen PBS ersetzt und die Proben ins Institut für Pathologie der Technischen Universität München überführt. Dort erfolgte die weitere Behandlung und Einbettung der Organe in Paraffin. Die dabei entstandenen Paraffin-Gewebeblöcke wurden dann mit dem Mikrotom geschnitten, wobei 3-4 μ m dünne Schnitte angefertigt wurden. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in ein 40 °C heißes Wasserbad überführt, um das Paraffin zu strecken. Danach konnten sie auf einen Objektträger platziert und über Nacht luftgetrocknet werden.

2.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) dient der Anfärbung und Differenzierung einzelner Gewebe- und Zellkomponenten im feingeweblichen Schnitt. Hierfür werden zwei Farbstoffe benötigt: Hämatoxylin und Eosin. Der pflanzliche Farbstoff Hämatoxylin entwickelt seine färberischen Eigenschaften in Form des basischen Hämalauns. Dieses färbt alle sauren, basophilen Strukturen blau, insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA. Eosin, ein synthetischer saurer Farbstoff, färbt hingegen alle basischen, azidophilen Strukturen, wozu vor allem die Zytoplasmaproteine gehören, rot an.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Paraffin-Gewebeschnitte für die H.E.-Färbung zunächst zweimal fünf Minuten in HistoClear entwacht. Danach erfolgte die Inkubation in einer absteigende Alkoholreihe aus Ethanol (2x100 % – 2x96 % – 2x70 %) für jeweils drei Minuten gefolgt von der zehnminütigen Färbung mit Hämalaun. Anschließend wurden die

Schnitte zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und danach fünf Minuten mit 0,33 %igem ethanolischem Eosin gefärbt. Nach einer Spülung in 96 %igem Ethanol und Isopropanol für jeweils 25 Sekunden wurden die Proben abschließend zweimal drei Minuten mit HistoClear inkubiert. Danach konnten die Schnitte mit Pertex fixiert werden und über Nacht lufttrocknen.

2.4.3. Immunhistochemie

Das Verfahren der Immunhistochemie dient dem Proteinnachweis und der -lokalisation im histologischen Schnittpräparat. Hierzu werden spezifische, gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper verwendet. Diese sind an ein Detektionssystem gekoppelt, das die immunchemische Reaktion und somit das Protein im Präparat sichtbar macht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Enzym-Immunglobulin-Komplex-Methode mit Hilfe der Labeled-Strept-Avidin-Biotin-(LSAB) Technik angewendet. Die Methode basiert auf der starken Affinität des Vitamins Biotin zum Glykoprotein Avidin.

Zunächst wird ein an das zu detektierende Protein bindender Primärantikörper aufgetragen. Dieser reagiert in einem zweiten Schritt mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wiederum bindet an einen Avidin-Enzym-Komplex, welcher im dritten Schritt hinzugegeben wird. Durch die abschließende Inkubation mit einer chromogenen Substratlösung entsteht schließlich ein farbiges Reaktionsprodukt, welches das Protein sichtbar macht.

Zur Vorbereitung der Schnitte auf die immunhistochemische Färbung erfolgte zunächst die Deparaffinisierung in HistoClear für zweimal fünf Minuten, gefolgt von der Rehydratation in einer absteigende Alkoholreihe aus Ethanol (2x100 % – 2x96 % – 2x70 %) für jeweils drei Minuten. Da bei der Fixierung Quervernetzungen zwischen den Proteinen, also den Antigenen des Schnittpräparats, entstehen, ist eine Demaskierung der Antigene notwendig. Diese erfolgte mit Hilfe von Antigendemaskierungslösung in der Mikrowelle bei 600 W für zehn Minuten. Nach Abkühlung der Schnitte bei RT für 20 Minuten wurden sie zweimal fünf Minuten mit dH₂O gespült. Um die endogene Peroxidase zu blocken wurden die Proben anschließend bei RT für 15 Minuten mit 3 %igem H₂O₂ inkubiert und danach einmal fünf Minuten mit dH₂O und zweimal drei Minuten mit TBST gespült. Zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte anschließend in TBST mit 5 % Ziegen- oder Hasenserum, je nach Angaben des Primärantikörperprotokolls, für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper in demselben Puffer hinzugegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C

im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal drei Minuten mit TBST gespült und anschließend für eine Stunde bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper im Primärantikörperpuffer versetzt. Nach einer Waschung mit TBST für dreimal drei Minuten konnten die Proben für 30 Minuten mit Vectastain ABC-Lösung nach Angaben des Herstellerprotokolls inkubiert werden. Die Lösung enthält den Avidin-Biotinperoxidase-Komplex (ABC), der den biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Im Anschluss wurden die Proben dreimal drei Minuten mit TBST gewaschen und mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung nach Herstellerprotokoll für drei Minuten versetzt. DAB fungiert hierbei als chromogenes Substrat für die Biotinperoxidase und führt so zur Anfärbung des Immunkomplexes und darüber zur Detektion des Proteins. Abschließend wurden die Proben in dH₂O gewaschen, mit Hämatoxylin kurz gegengefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2x70 % – 2x96 % – 2x100 %) für je drei Minuten dehydriert. Nach Behandlung mit HistoClear für fünf Minuten konnten die Schnitte mit Pertex eingedeckt werden.

Falls vom Hersteller im Primärantikörperprotokoll empfohlen, wurde PBST anstelle von TBST verwendet.

III. ERGEBNISSE

1. Pankreasspezifische Inhibition des Stat3-Signalwegs in der Maus

1.1. Generierung einer pankreasspezifisch Stat3-defizienten Mauslinie *Stat3^{Δpanc}* unter Anwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems

Zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, welche Funktion der in konstitutiv aktiver Form bereits in humanen Pankreaskarzinomen nachgewiesene Transkriptionsfaktor STAT3 in der pankreatischen Onkogenese einnimmt. Zur Annäherung an die Beantwortung dieser Frage etablierten wir eine Maus, in der eine pankreasspezifische Inaktivierung des Stat3-Signalwegs vorliegt. In einem zweiten Schritt untersuchten wir dann den Effekt dieser Stat3-Ablation auf die PanIN-Entwicklung im murinen *Kras^{G12D}*-Tumormodell.

Die Aktivierung von Stat3 erfolgt durch die Jak-vermittelte Phosphorylierung des Proteins am Tyrosinrest 705 unter Bildung von phospho(p)-Stat3^{Y705} (Aaronson et al. 2002). Um die Expression von p-Stat3^{Y705} und darüber die Stat3-vermittelte Signaltransduktion spezifisch im Pankreas zu inhibieren, machten wir uns die unter I.2.1. beschriebene Cre/loxP-Strategie zu Nutze.

Es wurden zwei Mauslinien benötigt: Eine *Stat3^{Flox/Flox}* (*Stat3^{F/F}*)-Maus und eine die *Ptf1a*-Cre-Rekombinase exprimierende Maus (*Ptf1a-cre^{ex1}*). Die *Stat3^{F/F}*-Maus wurde uns von der Arbeitsgruppe um Akira zur Verfügung gestellt (Sano 1999). In dieser Maus wurden in allen kernhaltigen Zellen loxP-Sequenzen in die Introns 21 und 22 beider Allele des *Stat3*-Gens integriert. Die so modifizierten Allele werden jeweils als *Stat3^F* bezeichnet. Wie Abbildung 7 zeigt, flankieren die loxP-Sequenzen auf dem *Stat3^F*-Allel das Exon 21, das für den Tyrosinrest 705 des Stat3-Moleküls kodiert. Wir kreuzten die *Stat3^{F/F}*-Maus mit der unter I.2.2. bereits beschriebenen *Ptf1a-cre^{ex1}*-Maus (Nakhai et al. 2007). In den aus der Kreuzung dieser beiden Mauslinien hervorgehenden Nachkommen wurde die Exzision des loxP-markierten Exons 21 auf beiden *Stat3*-Allelen durch die Cre-Rekombinase erzielt (vergleiche Abbildung 7). Da die Cre-Rekombinase nur in Zellen aktiv ist, die den *Ptf1a*-Promotor exprimieren, wird die Bildung des durch das Exon 21 kodierten Tyrosins 705 des Stat3-Moleküls auf diesem Wege spezifisch und ausschließlich in Zellen des exokrinen und in Teilen des endokrinen Pankreas verhindert. Das durch das Fehlen des Tyrosinrests verkürzte Stat3-Protein wird auch als *Stat3^{Δpanc}* bezeichnet. Die resultierende Mauslinie *Stat3^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1}* wird *Stat3^{Δpanc}* genannt.

Über die Deletion des Tyrosinrests 705 geht die Phosphorylierungsstelle des Moleküls verloren, sodass kein p-Stat3^{Y705}-Protein mehr gebildet werden kann. Stat3 ist folglich nicht mehr in der Lage, in den Nukleus zu translozieren und dort als Initiator der Transkription bestimmter Zielgene zu fungieren. Somit konnten wir die Stat3-vermittelte Signaltransduktion unter Anwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems pankreasspezifisch im Mausmodell inaktivieren.

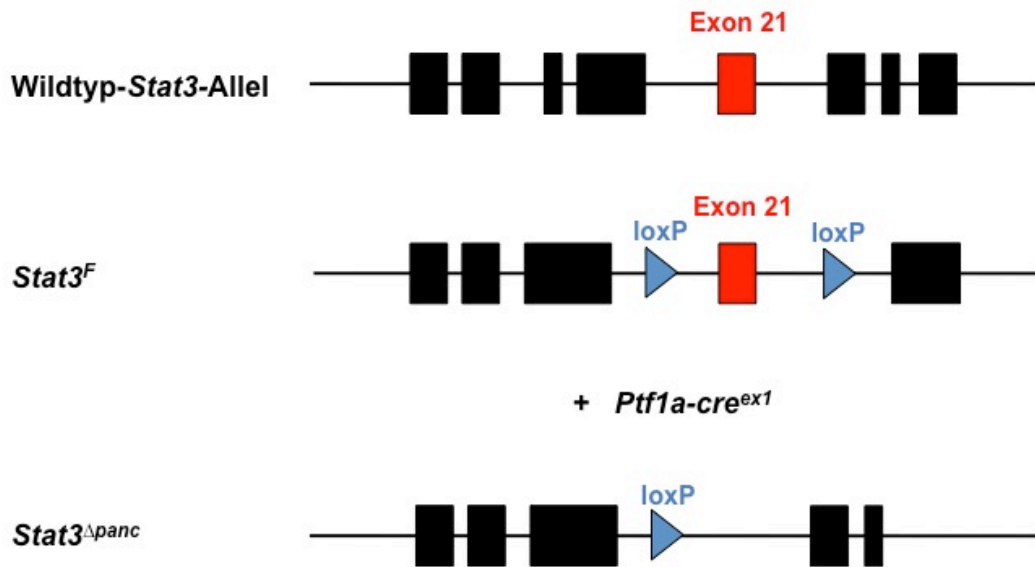


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der *Stat3*^{Δpanc}-Linie.

Um die Effizienz der *Ptf1a*-Cre-vermittelten *Stat3*-Mutation auf DNA-Ebene zu überprüfen, bestimmten wir mittels PCR den Genotyp der aus der Kreuzung von *Stat3*^{F/F}- und *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäusen hervorgehenden Nachkommen. Die DNA isolierten wir aus der Schwanzspitze der Mäuse. Verwendete Primer waren die *Stat3*-Primer A und B, die eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und am Exon 21 gefloxtem *Stat3*-Allel ermöglichen, sowie ein Primer, der das *Ptf1a-cre*-Transgen auf der DNA nachweist (vergleiche Tabelle 6).

Wie Abbildung 8 zeigt ergaben sich drei mögliche Genotyp-Kombinationen. Alle Mäuse sind homozygot für das *Ptf1a-cre*-Transgen. *Stat3*^{+/+};*Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäuse weisen in der PCR-Analyse nur die Bande für das *Stat3*-Wildtyp-Allel auf und sind daher homozygot für dieses Allel. Sie wurden in den folgenden Experimenten als Kontrollgruppe verwendet. *Stat3*^{+Δ};*Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäuse weisen auf einem *Stat3*-Allel den Wildtyp-Genotyp auf, wohingegen auf dem zweiten Allel Exon 21 gefloxt ist. Ziel unsere Verkreuzung waren die für das am Exon 21 gefloxtes *Stat3*-Allel homozygoten Mausnachkommen *Stat3*^{Δ/Δ};*Ptf1a-cre*^{ex1}, die kurz als *Stat3*^{Δpanc} bezeichnet werden. Nur in diesen Mäusen lässt

sich eine Deletion des Exons 21 auf beiden Allelen des *Stat3*-Gens spezifisch im Pankreas erzielen. Sie bildeten daher die Basis unserer weiteren Versuche.

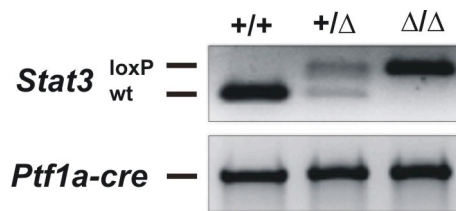


Abbildung 8: PCR-Analysen der genetisch modifizierten Allele in den aus der Kreuzung von *Stat3^{loxP/loxP}*- und *Ptf1a-cre^{ex1}*-Mäusen hervorgehenden Nachkommen. loxP=gefloxtes Allel; wt=Wildtyp-Allel.

1.2. Biochemische und morphologische Charakterisierung von *Stat3^{Δpanc}*-Mäusen

1.2.1. Proteinchemischer Nachweis fehlender pankreatischer *Stat3^{Y705}*-Expression

Um den Erfolg der *Ptf1a*-Cre-vermittelten Exzision des Exons 21 des *Stat3*-Gens auf Proteinebene zu validieren, verglichen wir aus dem Pankreasgewebe fünf Wochen alter *Stat3^{+/+};Ptf1a-cre^{ex1}* (*Stat3^{+/+}*)- und *Stat3^{Δ/Δ};Ptf1a-cre^{ex1}* (*Stat3^{Δpanc}*)-Mäuse gewonnene Proteinlysate im Western Blot.

Wie Abbildung 9 zeigt verwendeten wir hierbei zum Nachweis von Stat3 zwei unterschiedliche Antikörper. Der *Stat3^{Y705}*-Antikörper ist spezifisch gegen den am C-Terminus befindlichen Tyrosinrest 705 des Stat3-Proteins gerichtet. Durch die *Ptf1a*-Cre-vermittelte homozygote Deletion des Exons 21 des *Stat3*-Gens im exokrinen und in Teilen des endokrinen Pankreas der *Stat3^{Δpanc}*-Linie fehlt dem zugehörigen Stat3-Molekül dieser Tyrosinrest. Folglich kann der Antikörper dort kein Protein binden, woraus im Western Blot eine deutlich abgeschwächte pankreatische *Stat3^{Y705}*-Expression in *Stat3^{Δpanc}*- im Vergleich zu *Stat3^{+/+}*-Mäusen resultiert. Dies beweist, dass die Exzision des Exons 21 durch die *Ptf1a*-Cre-Rekombinase tatsächlich in einem Verlust des für die Proteinphosphorylierung essentiellen Tyrosinrests 705 in *Stat3^{Δpanc}*-Mäusen resultiert.

Der zweite verwendete Stat3-Antikörper ist gegen ein Peptid am N-Terminus des Stat3-Moleküls gerichtet. Er ist dazu in der Lage, das durch die *Ptf1a*-Cre-vermittelte *Stat3*-Genmutation unaffektierte Stat3-Restprotein nachzuweisen. Folglich ergibt sich, wie Abbildung 9 zeigt, bei Anwendung dieses Antikörpers im Western Blot ein annähernd gleich hohes Stat3-Proteinlevel im Pankreas der *Stat3^{Δpanc}*- im Vergleich zur *Stat3^{+/+}*-Linie.

Das Fehlen des Exons 21 in der *Stat3^{Δpanc}*-Maus resultiert somit nicht in einem kompletten Stat3-Protein-Verlust, sondern führt durch die fehlende Expression des Tyrosins 705 lediglich zur Expression eines verkürzten Stat3-Proteins, welches auch als Stat3^{Δpanc} bezeichnet wird.

Abbildung 9 veranschaulicht zudem ein gleich hohes Stat1-Proteinlevel im Pankreas beider Mauslinien. Dies beweist, dass die *Ptf1a*-Cre-vermittelte *Stat3*-Mutation in *Stat3^{Δpanc}*-Mäusen Stat3-spezifisch ist und die Expression anderer Proteine der Stat-Familie nicht beeinträchtigt.

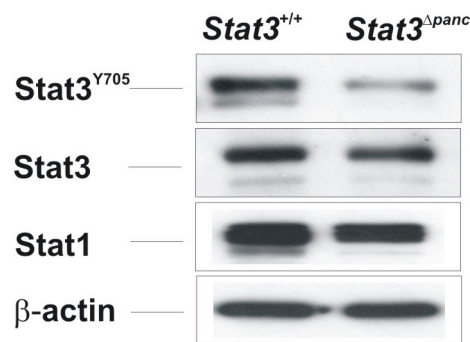


Abbildung 9: Nachweis der fehlenden Expression des Tyrosinrests 705 des Stat3-Proteins im Pankreas mit Hilfe eines C-terminal gerichteten Stat3^{Y705}-Antikörpers.

Western Blot Analyse der Stat3- und Stat1-Expression in pankreatischen Proteinlysaten fünf Wochen alter *Stat3^{+/+};Ptf1a-cre^{ex1}* (*Stat3^{+/+}*)- und *Stat3^{Δ/Δ};Ptf1a-cre^{ex1}* (*Stat3^{Δpanc}*)-Mäuse im Vergleich. Ein N-terminal gerichteter Antikörper diente dem Stat3-Restproteinnachweis. β-actin diente als Ladekontrolle.

1.2.2. Charakterisierung des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments

Um zu evaluieren, ob die Inhibition der Stat3^{Y705}-Expression in *Stat3^{Δpanc}*-Mäusen Auswirkungen auf Morphologie und Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments hat, fertigten wir von aus fünf Wochen alten *Stat3^{Δpanc}*- und *Stat3^{+/+}*-Mäusen isolierten Pankreata Paraffin-Schnitte an.

Zur Anfärbung und Differenzierung der einzelnen Gewebekomponenten wurden die Schnitte mit H.E. gefärbt; zur Detektion funktioneller Proteine wendeten wir die Methode der Immunhistochemie an.

Die in Abbildung 10 veranschaulichte H.E.-Färbung beweist, dass sich die Pankreasmorphologie der *Stat3^{Δpanc}*-Linie nicht von der der *Stat3^{+/+}*-Kontrollmaus unterscheidet. Das Gewebe der beiden exemplarisch dargestellten Tiere zeigt die pankreastypische Gliederung in Läppchen, welche durch Bindegewebssepten voneinander getrennt sind. In beiden Schnittpräparaten findet sich eine Fülle an exokrin aktiven

basophilen Azinuszellen und hellen zentroazinären Zellen. Man erkennt interlobuläre Ausführungsgänge sowie die endokrin aktiven Langerhans-Inseln. Daraus lässt sich schließen, dass die aus der *Ptf1a*-Cre-vermittelten *Stat3*-Mutation resultierende Inhibition der *Stat3*^{Y705}-Expression in der *Stat3*^{Δ*panc*}-Maus die Morphologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments nicht beeinflusst.

Um die Funktion des endokrinen Kompartiments zu prüfen, führten wir immunhistochemische Färbungen mit gegen Insulin und Glucagon gerichteten Primärantikörpern durch. Wie Abbildung 10 demonstriert, lassen sich im Pankreas der *Stat3*^{Δ*panc*}-Linie und der Kontrolle *Stat3*^{+/+} äquivalente Mengen an Insulin, das durch die 80 % der Inseln einnehmenden β-Zellen sezerniert wird, sowie an Glucagon, welches von den am Rand der Inseln lokalisierten α-Zellen produziert wird, nachweisen. Die endokrine Funktion der Langerhans-Inseln wird durch die *Stat3*-Mutation somit nicht beeinträchtigt.

Darüber hinaus wiesen wir ebenfalls immunhistochemisch das Intermediärfilament Cytokeratin-19 (CK-19), einen duktalem Epithelzellmarker, im Pankreasgewebe beider Mauslinien nach. Abbildung 10 zeigt, dass die Ausführungsgänge der exemplarisch abgebildeten *Stat3*^{Δ*panc*}-Maus eine mit der Kontrollmaus *Stat3*^{+/+} vergleichbare CK-19-Expression aufweisen.

Zusammenfassend beweisen die Ergebnisse somit, dass Morphologie und Funktion des exokrinen und endokrinen Pankreas durch eine organspezifische Inhibition der Expression von phosphorylierbarem *Stat3*^{Y705} und die daraus resultierende Inaktivierung der *Stat3*-abhängigen Signaltransduktion in der Maus nicht beeinflusst werden. Die *Stat3*^{Δ*panc*}-Linie lässt sich daher für die gentechnologisch basierte Analyse des *Stat3*-Signalwegs in der pankreatischen Onkogenese verwenden.

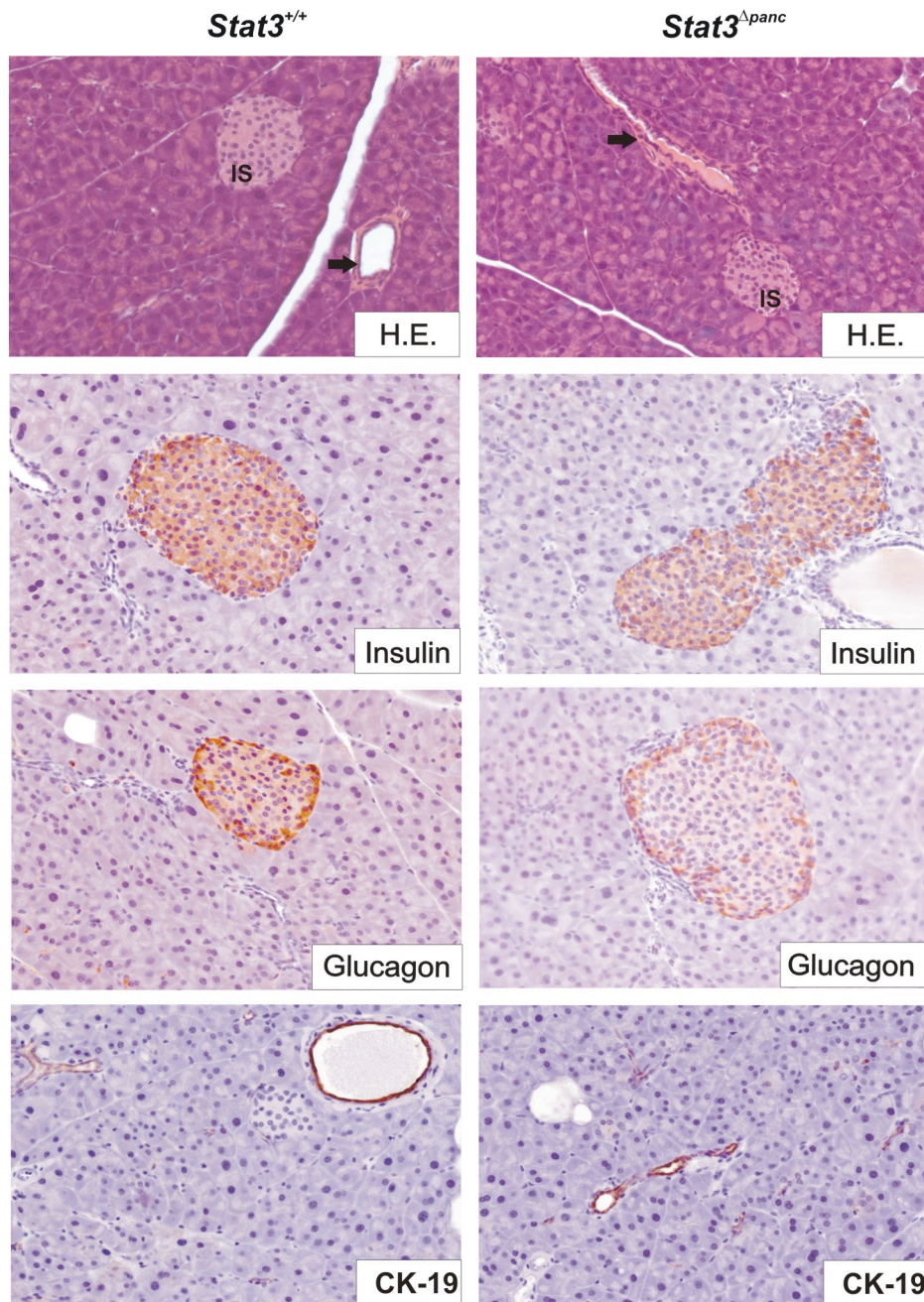


Abbildung 10: Charakterisierung des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments.

Morphologische (H.E.) und immunohistochemische (Insulin, Glucagon, CK-19) Analysen des Pankreasgewebes fünf Wochen alter *Stat3*^{+/+}; *Ptf1a-cre*^{ex1} (*Stat3*^{+/+})- und *Stat3*^{Δ/Δ}; *Ptf1a-cre*^{ex1} (*Stat3*^{Δpanc})-Mäuse im Vergleich. IS=Langerhans-Inseln; schwarze Pfeile kennzeichnen normale Pankreasgänge (200-fache Vergrößerung).

2. Nachweis der Aktivierung des Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell

2.1. Proteinchemischer Nachweis pankreatischer phospho-Stat3^{Y705}-Expression in *Kras*^{G12D}-Mäusen

Über die genaue Bedeutung des Stat3-Signalwegs in der Onkogenese des Pankreas ist bisher nichts bekannt. Um herauszufinden, ob Stat3 Einfluss auf die Entwicklung und Progression *Kras*^{G12D}-induzierter PanIN-Läsionen hat, untersuchten wir im Folgenden zunächst, ob der Stat3-Signalweg im *Kras*^{G12D}-Mausmodell überhaupt aktiviert ist.

Wir kreuzten die uns von Tuveson und Kollegen zur Verfügung gestellte LSL-*Kras*^{G12D}-Linie (Hingorani et al. 2003a) mit der *Ptfla-cre*^{ex1}-Maus (Nakhai et al. 2007). Es resultierte die unter I.2.2. beschriebene LSL-*Kras*^{G12D};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Tumormodellmaus. Diese entwickelt, wie unter I.2.2. dargelegt, alle drei PanIN-Stadien sowie nach einer längeren Latenzzeit auch invasive metastatische duktales Adenokarzinome (Hingorani et al. 2003a).

Im Western Blot konnten wir, wie Abbildung 11A veranschaulicht, sowohl im Pankreas neun als auch 13 Wochen alter *Kras*^{G12D}-Mäuse die Expression von p-Stat3^{Y705}- sowie von unphosphoryliertem Stat3-Protein nachweisen. Dieser Nachweis der Stat3-Präsenz im *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese führt zu der Annahme, dass Stat3 in die *Kras*^{G12D}-induzierte Entartung duktales Zellen involviert sein könnte.

2.2. Expression von Effektor- und Zielproteinen des Jak2/Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell

Im Folgenden überprüften wir die Aktivierung des Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell auf histochemischer Ebene.

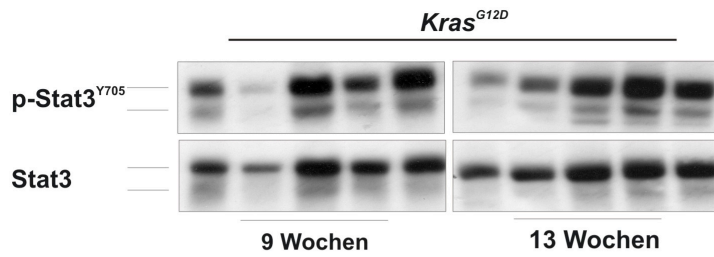
Das Pankreas 13 Wochen alter *Kras*^{G12D}-Mäuse offenbart pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) (vergleiche Abbildung 11B, schwarze Pfeile). Diese sind an einer lokalen Zunahme der Ausführungsgangzahl erkennbar. Die epithelialen Zellkörper dieser Gänge erscheinen verlängert und weisen einen erhöhten Anteil an supranukleärem muzinhaltigem Zytoplasma auf. Das normalerweise flache Wachstumsmuster geht zudem zunehmend in eine papilläre Architektur über. Diese Charakteristika führen am ehesten zur Klassifikation der Läsionen als PanIN-1A bis -B. Zusätzlich zeigt sich in den exemplarisch dargestellten Präparaten ein für das Pankreaskarzinom typisches, die PanIN-Läsionen umgebendes desmoplastisches Stroma.

Um zu prüfen, ob in diesen PanIN-Läsionen der *Kras*^{G12D}-Mauslinie eine Aktivierung des Stat3-Signalwegs nachweisbar ist, führten wir immunhistochemische Färbungen durch. Wie Abbildung 11B zeigt, exprimieren sowohl die duktaalen Zellen im Bereich der PanIN-Läsionen als auch Azinuszellen der exemplarisch dargestellten *Kras*^{G12D}-Maus am Tyrosin 705 phosphoryliertes und damit potentiell transkriptionell aktives Stat3-Protein (p-Stat3^{Y705}). Darüber hinaus lässt sich im Bereich der PanINs und in den umgebenden Azini (vergleiche Abbildung 11B, schwarze Sterne) das in der Signaltransduktion Stat3 vorgeschaltete phosphorylierte Jak2-Protein (p-Jak2) nachweisen.

Zudem veranschaulicht Abbildung 11B die Expression diverser Stat3-Zielproteine in 13 Wochen alten *Kras*^{G12D}-Mäusen. Die Transkription der für die jeweiligen Proteine kodierenden Gene wird durch p-Stat3^{Y705} induziert (Yu et al. 2009). Sowohl in PanIN-Läsionen als auch in Azinuszellen und teilweise in infiltrierenden Zellen konnten wir Cyclin D1, Survivin sowie die zur Bcl-2 (B-cell lymphoma-2)-Familie gehörigen Moleküle Bcl-X_L und Mcl-1 (myeloid cell lymphoma-1) nachweisen. Auch das pro-inflammatorische Protein Cox-2 (Cyclooxygenase-2) und das pro-angiogenetische Molekül MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2), die ebenfalls in ihrer Expression durch Stat3 gesteigert werden, ließen sich in präneoplastischen Läsionen und Azini 13 Wochen alter *Kras*^{G12D}-Mäusen detektieren. Darüber hinaus konnten wir die Bildung des ebenfalls Stat3-abhängigen Hsp (heat shock protein)-70 in PanINs der *Kras*^{G12D}-Linie demonstrieren (vergleiche Abbildung 11B).

Zusammenfassend belegen unsere Versuche erstmals, dass am Tyrosin 705 phosphoryliertes Stat3-Protein selbst, das in der Signaltransduktion Stat3 vorgeschaltete p-Jak2 sowie zahlreiche im Rahmen des Jak2/Stat3-Signalwegs in ihrer Expressionsrate gesteigerte Proteine in PanIN-Läsionen und pankreatischen Azinuszellen von *Kras*^{G12D}-Tumormodellmäusen induziert sind. Den Einfluss dieser Aktivität des Stat3-Signalwegs auf die *Kras*^{G12D}-vermittelten Entartung duktaaler Zellen beleuchteten wir in den folgenden Experimenten.

A



B

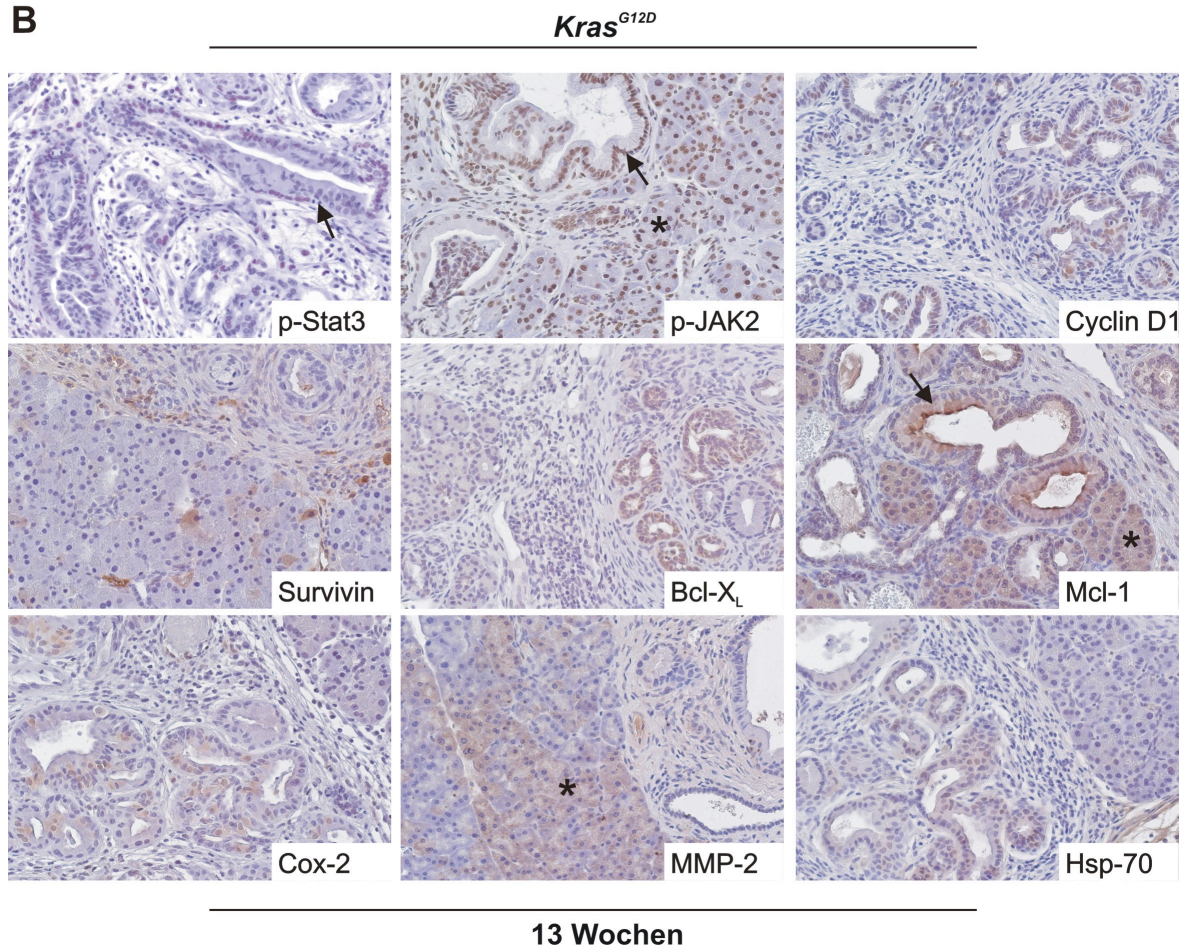


Abbildung 11: Nachweis der Aktivierung des Stat3-Signalwegs im *Kras^{G12D}*-Mausmodell.

A: Biochemischer Nachweis pankreatischer phospho(p)-Stat3^{Y705}- und Stat3-Expression im Pankreas neun und 13 Wochen alter *Kras^{G12D}*-Mäuse.

B: Immunhistochemischer Nachweis von p-Stat3, p-Jak2 sowie Stat3-abhängiger Proteinen in PanIN-Läsionen und Azinuszellen 13 Wochen alter *Kras^{G12D}*-Mäuse. Schwarze Pfeile kennzeichnen PanINs; schwarze Sterne kennzeichnen Azini (200-fache Vergrößerung).

3. Inaktivierung des Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell

3.1. Generierung der pankreasspezifisch Stat3-defizienten Tumormodellmaus *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}

Um die Auswirkungen der gezeigten Aktivität des Stat3-Signalwegs auf die *Kras*^{G12D}-vermittelte pankreatische Onkogenese im Mausmodell herausstellen zu können, etablierten wir im Folgenden eine pankreasspezifische Inaktivierung der Stat3-abhängigen Signaltransduktion in *Kras*^{G12D}-exprimierenden Mäusen.

Hierzu wurden erneut zwei Mauslinien benötigt: Die LSL-*Kras*^{G12D};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Tumormodellmauslinie, welche unter I.2.2. und III.2. charakterisiert wurde, sowie die unter Abschnitt III.1. dargestellte *Stat3*^{F/F};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Stat3*^{Δpanc})-Linie.

Aus der Kreuzung dieser beiden Mauslinien ging die LSL-*Kras*^{G12D};*Stat3*^{F/F};*Ptfla-cre*^{ex1}-Maus, die als *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc} bezeichnet wird, hervor. Diese Mauslinie sollte nun sowohl die pankreasspezifische *Kras*^{G12D}-Mutation, die zur Entwicklung der charakteristischen pankreatischen präneoplastischen Läsionen führt (Hingorani et al. 2003a), als auch die durch die *Ptfla*-Cre-vermittelte Deletion des Exons 21 des *Stat3*-Gens hervorgerufene fehlende Expression von phosphorylierbarem Stat3^{Y705} und die damit verbundene Inhibition der Stat3-abhängigen Signaltransduktion im Pankreas (vergleiche Abschnitt III.1.1.) aufweisen.

Um zu prüfen, ob diese Charakteristika tatsächlich auf die durch uns generierte *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus zutreffen, verglichen wir diese im Rahmen der folgenden Untersuchungen mit einer nicht Stat3-defizienten LSL-*Kras*^{G12D};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Kontrollmaus auf morphologischer und biochemischer Ebene.

3.2. Biochemische und morphologische Charakterisierung von *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen

3.2.1. Proteinchemischer Nachweis fehlender pankreatischer Stat3^{Y705}-Expression

Zunächst analysierten wir das Pankreasgewebe neun Wochen alter *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse auf die Expression von Stat3-Protein im Western Blot. Der verwendete Stat3-Primärantikörper war der unter III.1.2. beschriebene, C-terminal gerichtete Stat3^{Y705}-Antikörper, der spezifisch an den durch das Exon 21 kodierten Tyrosinrest 705 des Stat3-Moleküls bindet.

Wie Abbildung 12A veranschaulicht, exprimieren neun Wochen alte *Kras*^{G12D}-Kontrolltiere Stat3^{Y705}-Protein im Pankreas. Im Vergleich dazu weist das Gewebe der gleich alten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse ein deutlich reduziertes Stat3^{Y705}-Proteinlevel auf. Dies beweist den Erfolg der pankreasspezifischen, *Ptf1a*-Cre-vermittelten Exzision des für den Tyrosinrest 705 kodierenden Exons 21 des *Stat3*-Gens in der von uns generierten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie.

3.2.2. Proteinchemischer Nachweis von konstitutiv aktivem K-Ras-Protein

Die *Kras*^{G12D}-Mutation führt über die reduzierte Umwandlung von aktivem, GTP-gebundenem K-Ras in die inaktive, GDP-korrelierte Form zu einer konstitutiven, zellproliferativen K-Ras-Proteinaktivität (Bos 1989).

Um herauszufinden, ob die Ausprägung der G12D-Mutation durch die zusätzliche Deletion des Exons 21 des *Stat3*-Gens im Pankreas der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus beeinträchtigt wird, führten wir das Ras-Aktivierungsassay mit Hilfe des Ras Activation Assay Kits durch. Das Assay beruht auf der hochspezifischen Bindung der Ras-bindenden Domäne (RBD) des Proteins Raf-1 an GTP-korreliertes Ras-Protein.

Nach Angaben des Herstellerprotokolls wurden pankreatische Proteinlysate beider Mauslinien jeweils mit dem Raf-1 RBD Agarose enthaltenden Ras Assay Reagenz versetzt. Danach erfolgte die Detektion des Ras-RBD-Komplexes mit Hilfe eines Ras-Antikörpers im Western Blot. Auf diesem Wege ließ sich aktives, GTP-gebundenes Ras-Protein im Pankreas detektieren. Zum Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung analysierten wir die Lysate zusätzlich ohne die Zugabe von Raf-1 RBD Agarose auf die Expression von ungebundenem Ras-Protein (panRas).

Abbildung 12B veranschaulicht die Western Blot-Ergebnisse des Assays. Neun Wochen alte *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse zeigen eine nahezu gleich hohe Expression von RBD- und damit GTP-gebundenem Ras-Protein im Pankreas. Die etwas schwächere Ras-RBD-Expression in der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie lässt sich auf eine, an der panRas-Expression ablesbare, leicht reduzierte Proteinbeladung im Vergleich zu den Kontrollmäusen erklären. Die Ras-Aktivität ist demnach in beiden Mäusen gleich hoch. Daraus lässt sich schließen, dass die zusätzliche pankreasspezifische Mutation des *Stat3*-Gens in der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus keinen Einfluss auf die Expression von PanIN-induzierendem, konstitutiv aktivem, GTP-gebundenem K-Ras-Protein hat.

3.2.3. Untersuchungen zur Stat3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705

Wie Abbildung 12A beweist, bewirkt die *Ptf1a*-Cre-vermittelte Deletion des Exons 21 des *Stat3*-Gens eine fehlende Expression des Tyrosinrests 705 des Stat3-Moleküls im Pankreas der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie. Dieser Tyrosinrest wird im Rahmen des Stat3-Signalwegs normalerweise p-Jak2-abhängig phosphoryliert, wodurch die Dimerisierung und anschließende Translokation von Stat3 in den Nukleus ermöglicht wird. Im Zellkern agiert p-Stat3^{Y705} als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression bestimmter Zielgene (Schindler et al. 2007).

Mittels Western Blot analysierten wir die Expression von am Tyrosin 705 phosphoryliertem Stat3-Protein. Abbildung 12C demonstriert das nahezu vollständige Fehlen der frühzeitigen, nach neun und 13 Wochen nachweisbaren, Stat3-Phosphorylierung in pankreatischen Proteinlysaten von *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen im Vergleich zu *Kras^{G12D}*-Kontrolltieren. Dies beweist, dass die fehlende Expression von Stat3^{Y705} tatsächlich in einer Inhibition der Phosphorylierung des Proteins im Pankreas der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie resultiert.

Am Tyrosinrest 701 phosphoryliertes Stat1-Protein hingegen lässt sich, wie Abbildung 12C veranschaulicht, in neun und 13 Wochen alten Tiere sowohl der *Kras^{G12D}*- als auch der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie nachweisen. Die etablierte genetische Mutation ist demnach *Stat3*-spezifisch und beeinträchtigt die Phosphorylierung anderer Proteine der Stat-Familie nicht.

3.2.4. Analyse des makroskopischen Pankreasaspekts

Um erste Hinweise auf das Ausmaß der Entwicklung pankreatischer Neoplasien in *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen zu gewinnen, verglichen wir die Pankreata von LSL-*Kras^{G12D}*, *Kras^{G12D}*- und *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen 13 Wochen postpartum makroskopisch miteinander. Tiere der LSL-*Kras^{G12D}*-Linie sind nicht dazu in der Lage konstitutiv aktives, onkogenes K-Rras-Protein zu exprimieren und entwickeln folglich auch keine präneoplastischen Läsionen und Karzinome im Pankreas (Hingorani et al. 2003a).

Abbildung 12D veranschaulicht ein im Vergleich zur LSL-*Kras^{G12D}*-Maus nahezu auf das Doppelte vergrößertes sowie fokal noduläres und lobuliertes Pankreas der Tumormodellmaus *Kras^{G12D}*. Diese Veränderungen lassen sich auf die Entwicklung präneoplastischer Läsionen bis hin zu Pankreasadenokarzinomen in pankreasspezifisch *Kras^{G12D}*-exprimierenden Mäusen zurückführen (Hingorani et al. 2003a). Das invasive

Wachstum des neoplastischen Gangepithels und die fibrotische Begleitreaktion sind hierbei für den raumfordernen Effekt verantwortlich.

Die exemplarisch dargestellte *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus hingegen offenbart, obwohl sie ebenfalls die onkogene *Kras*^{G12D}-Mutation und das gleiche Alter, wie die *Kras*^{G12D}-Kontrollmaus aufweist, ein ähnlich großes Pankreas wie die LSL-*Kras*^{G12D}-Linie. Auch ermangelt es ihr an der für das *Kras*^{G12D}-Mausmodell typischen nodulären und lobulierten Parenchymstruktur. Makroskopisch lassen sich somit in der von uns generierten Stat3-defizienten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus keine Hinweise auf die Entwicklung präneoplastischer oder neoplastischer Veränderungen im Pankreas finden.

Da der einzige Unterschied zwischen der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}- und der *Kras*^{G12D}-Linie, wie Abbildung 12A-C beweist, die fehlende Expression von transkriptionell aktivem p-Stat3^{Y705} ist, liegt die Annahme nahe, dass eine Inaktivierung des Stat3-Signalwegs einen maßgeblichen Effekt auf die maligne Progression im murinen *Kras*^{G12D}-Tumormodell haben könnte. Diese Hypothese galt es im Rahmen der folgenden Experimente zu prüfen.

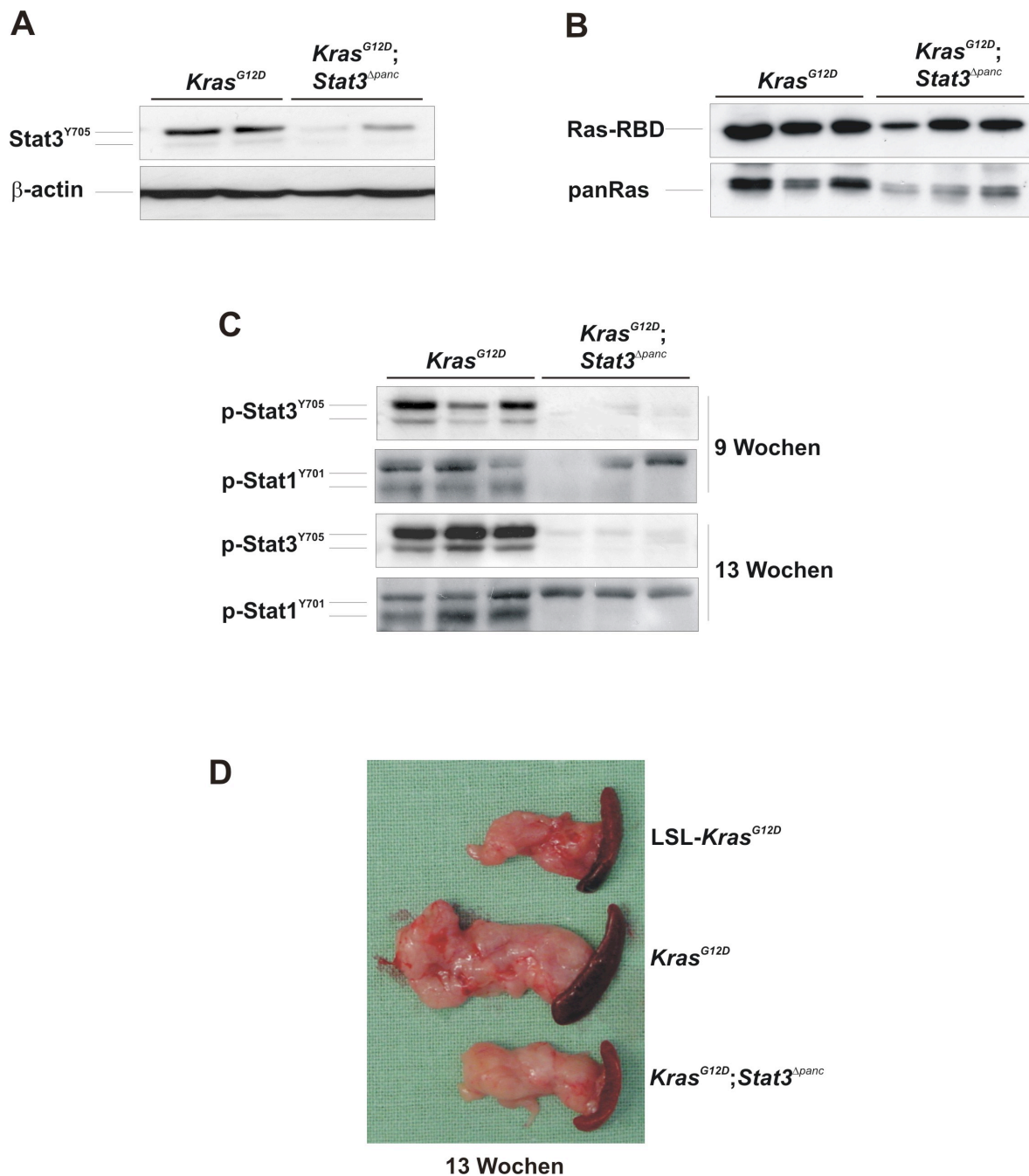


Abbildung 12: Biochemische und morphologische Charakterisierung Stat3-defizienter *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäuse im Vergleich zur *Kras^{G12D}*-Kontrolltieren.

A: Nachweis der pankreasspezifischen Deletion des Tyrosinrests 705 des Stat3-Proteins mit Hilfe eines C-terminal gerichteten Stat3^{Y705}-Antikörpers. Western Blot Analyse der Stat3^{Y705}-Expression im Pankreas neun Wochen alter Mäuse. β-actin diente als Ladekontrolle.

B: Nachweis von konstitutiv aktivem K-Ras-Protein. Western Blot Analyse der Ras-RBD- und der panRas-Expression im Pankreas mit Hilfe des Ras-Aktivierungsassays zum Zeitpunkt von neun Wochen.

C: Nachweis fehlender Stat3-Phosphorylierung am Tyrosin 705. Western Blot Analyse der p-Stat3^{Y705}- und p-Stat1^{Y701}-Expression in neun und 13 Wochen alten Mäusen.

D: Makroskopischer Aspekt des Pankreas beider Mauslinien im Vergleich zur LSL-*Kras^{G12D}*-Linie zum Zeitpunkt von 13 Wochen.

4. Einfluss der Inaktivierung von Stat3 auf die PanIN-Entwicklung im *Kras*^{G12D}-Mausmodell

4.1. Verzögerte PanIN-Progression in *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen

4.1.1. Morphologische Charakterisierung der PanIN-Läsionen

Mäuse des *Kras*^{G12D}-Modells entwickeln zeitabhängig präneoplastische Läsionen als Vorläufer invasiver Adenokarzinome im Pankreas. Diese treten erstmals zum Zeitpunkt von neun Wochen in Form einzelner PanIN-1A und -1B-Läsionen neben reaktiven Ausführungsgängen auf. Mit steigendem Alter der Tiere nimmt sowohl der PanIN-Grad als auch das Ausmaß der fibrotischen Begleitreaktion des umgebenden Pankreasgewebes deutlich zu. Ab einem Alter von etwa 18 Wochen treten die ersten PanIN-3-Läsionen in *Kras*^{G12D}-Mäusen auf (Hingorani et al. 2003a).

Im Folgenden wollten wir den Einfluss der aus der fehlenden Expression von p-Stat3^{Y705} resultierenden Inaktivierung des Stat3-Signalwegs auf diese altersabhängige PanIN-Progression in der unter III.3. charakterisierten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus untersuchen. Hierzu analysierten wir zunächst die Pankreasmorphologie der beiden Mauslinien *Kras*^{G12D} und *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc} im Vergleich. Abbildung 13A präsentiert H.E. gefärbte Gewebepräparate neun, 13 und 18 Wochen alter Mäuse jeweils in zehnfach- und 100-facher Vergrößerung.

Das Pankreas der exemplarisch dargestellten neun Wochen alten *Kras*^{G12D}-Maus lässt bereits in zehnfacher Vergrößerung einige auffällige Areale, charakterisiert durch die lokalisierte Zunahme des eosinophilen duktales Gewebes zwischen den basophilen Azinuszellen, erkennen. Die höhere Vergrößerung eines dieser Areale offenbart, dass es sich um eine frühe PanIN-Läsion handelt. Die Zahl an Ausführungsgängen ist an dieser Stelle stark erhöht, was auf ein neoplastisches duktales Geschehen hindeutet. Zudem ist das Stroma um die Gangstrukturen herum vermehrt, was auf eine pankreaskarzinomtypische fibrotische Begleitreaktion hinweist. Zum Zeitpunkt von 13 Wochen lässt sich eine deutliche Zunahme der PanIN-Dichte im Vergleich zur neun Wochen alten Maus beobachten. Die zehnfache Vergrößerung zeigt, dass nahezu die Hälfte des Organs von PanIN-Läsionen eingenommen ist, wodurch das azinäre Drüsengewebe stark verdrängt wird. Die 100-fache Vergrößerung eines dieser PanIN-Areale (vergleiche Abbildung 13A, schwarzer Pfeil) veranschaulicht darüber hinaus die Zunahme an papillär wachsenden Ausführungsgängen und fibrotischem Stroma, welches

sich immer weiter zwischen die Azinuszellen vorschiebt. Das Pankreas der in Abbildung 13A präsentierten 18 Wochen alten *Kras*^{G12D}-Maus weist schließlich eine weitere Progression der PanIN-Dichte und des Neoplasiegrades auf. Nahezu das gesamte Organ ist von präneoplastischen Läsionen und desmoplastischem Stroma eingenommen. Es finden sich kaum noch normale Azinuszellen. Die 100-fache Vergrößerung zeigt zudem zahlreiche luminal Nekrosen, weshalb ein Teil der Läsionen sicherlich bereits dem PanIN-Stadium 3 zugeordnet werden kann. Die dargestellten *Kras*^{G12D}-Mäuse offenbaren somit die typische, altersabhängige PanIN-Progression.

Im Vergleich dazu weist das Pankreasgewebe der in Abbildung 13A dargestellten Stat3-defizienten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Tiere im zeitlichen Verlauf nur marginale morphologische Veränderungen auf. Zum Zeitpunkt von neun Wochen präsentiert sich das Organ nahezu unverändert. Es lassen sich lediglich vereinzelte reaktiv verbreiterte duktale Gewebsareale detektieren. Auch die exemplarisch abgebildete 13 Wochen alte *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus zeigt eine weitestgehend unauffällige Pankreasmorphologie. Die Zahl der reaktiven Areale hat leicht zugenommen. Die 100-fache Vergrößerung demonstriert, dass es sich hierbei nicht um PanINs, sondern, gerade im Vergleich zu den Läsionen der *Kras*^{G12D}-Maus, tatsächlich lediglich um fibrotische Reaktionen in der Umgebung einzelner Ausführungsgänge handelt (vergleiche Abbildung 13A, weißer Pfeil). PanIN-typischer Charakteristika fehlen, da die Ausführungsgänge weder numerisch erhöht sind noch morphologische Atypien aufweisen. Im Pankreasgewebe 18 Wochen alter *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse hat die Zahl der Gänge und die sie umgebende Fibrose im Vergleich zum Zeitpunkt von 13 Wochen leicht zugenommen. In der 100-fachen Vergrößerung lässt sich die dargestellte Läsion jedoch maximal als PanIN-1-Stadium (vergleiche Abbildung 13A, schwarzer Pfeil) klassifizieren.

Somit treten zwar frühe präneoplastische Läsionen im Pankreas der Stat3-defizienten *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie auf, allerdings erst nach 18 Wochen und daher mit einer extremen Verzögerung im Vergleich zu *Kras*^{G12D}-Kontrolltieren. Die normalerweise im *Kras*^{G12D}-Mausmodell beobachtete altersabhängige PanIN-Progression ist in *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen auf mikro-morphologischer Ebene somit nicht nachweisbar. Die *Kras*^{G12D}-vermittelte PanIN-Initiierung lässt sich durch die Inaktivierung des Stat3-Signalwegs jedoch nicht verhindern.

Zur genaueren Charakterisierung der dukталen Strukturen in 13 Wochen alten *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen führten wir zusätzlich immunhistochemische Färbungen

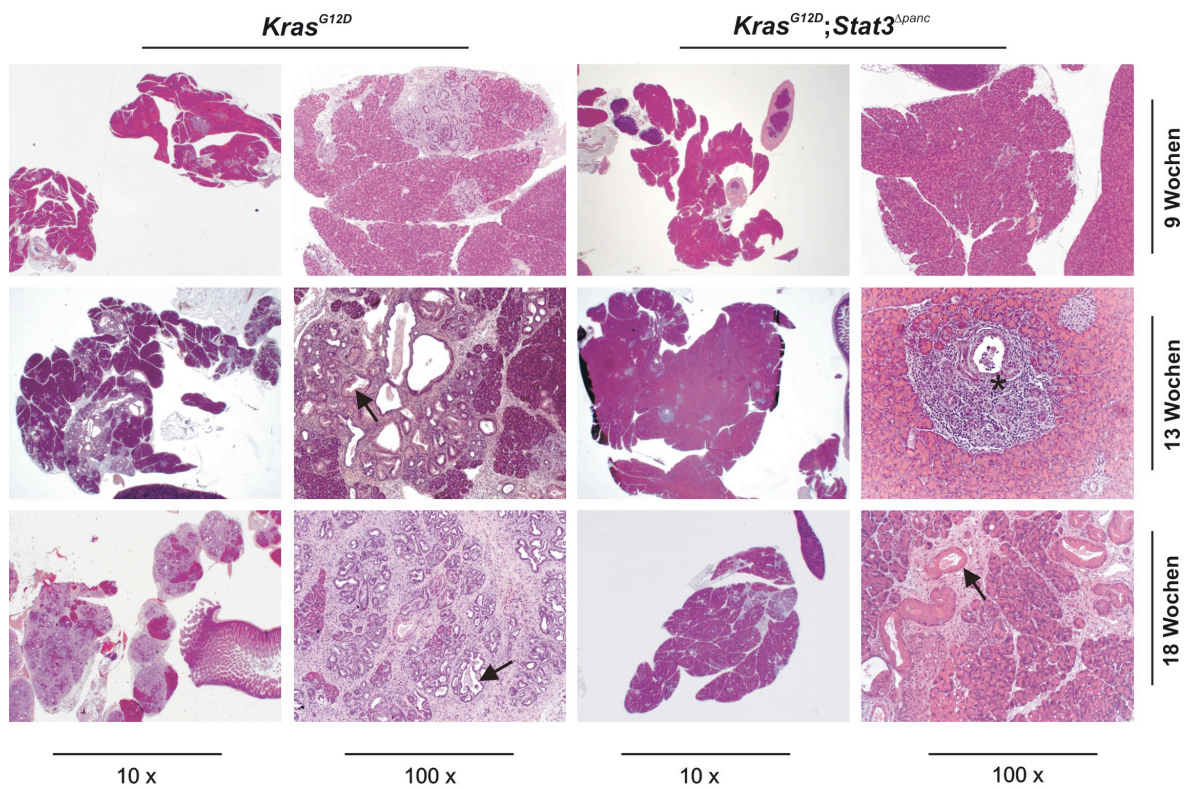
mit gegen Muc5 (Mucin 5) und CK-19 (Cytokeratin-19) gerichteten Primärantikörpern durch.

Bei Muc5 handelt es sich um ein Glykoprotein, das typischerweise in PanINs und Adenokarzinomen selbst vermehrt sezerniert wird. Das Pankreas der in Abbildung 13B dargestellten *Kras*^{G12D}-Maus weist zahlreiche Muc5-exprimierende Gänge auf. Im Vergleich dazu lassen sich im Gewebe der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus kaum Muc5-positive Gangstrukturen detektieren. Das Intermediärfilament CK-19 stellt einen duktalem Epithelzellmarker dar. Wie Abbildung 13B veranschaulicht, lassen sich im Pankreas der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie ebenfalls weitaus weniger CK-19-exprimierende Ausführungsgänge als im Gewebe der *Kras*^{G12D}-Linie nachweisen.

Diese reduzierte Expression PanIN-spezifischer Markerproteine in der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie unterstützt die bereits aus Abbildung 13A gewonnenen Ergebnisse: Stat3-defiziente *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse weisen eine deutliche Verzögerung der Entwicklung *Kras*^{G12D}-typischer präneoplastischer Läsionen im Pankreas auf.

Zusammenfassend lassen die gewonnenen Ergebnisse somit den Schluss zu, dass die aus der fehlenden p-Stat3^{Y705}-Expression resultierende Inaktivierung des Stat3-Signalwegs die altersabhängige Progression von PanIN-Läsionen in der *Kras*^{G12D}-vermittelten murinen pankreatischen Onkogenese hemmt. Die grundsätzliche Initiierung präneoplastischer Läsionen bleibt jedoch trotz der Ablation Stat3-abhängiger Signalkaskaden zeitverzögert erhalten.

A



B

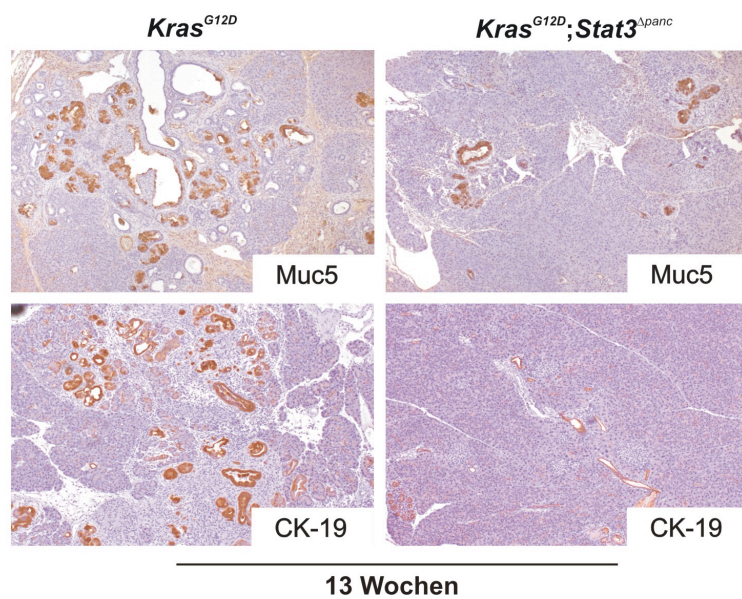


Abbildung 13: Morphologische Charakterisierung der PanIN-Läsionen in Stat3-defizienten *Kras*^{G12D};Stat3^{Δpanc}-Mäusen im Vergleich zu *Kras*^{G12D}-Kontrolltieren.

A: H.E.-Färbungen des Pankreas neun, 13 und 18 Wochen alter Tiere in zehn- und 100-facher-Vergrößerung. Schwarze Pfeile kennzeichnen PanIN-Läsionen; der schwarze Stern kennzeichnet einen reaktiven Gang.

B: Immunhistochemische Darstellung der veränderten Gänge mit Muc5 und CK-19 zum Zeitpunkt von 13 Wochen (100-fache Vergrößerung).

4.1.2. Quantitative Auswertung der PanIN-Läsionen

Um den Effekt der Inaktivierung des Stat3-Signalwegs auf die PanIN-Progression noch exakter beurteilen zu können, analysierten wir die duktales Strukturen im Pankreas von *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen im Vergleich zu *Kras^{G12D}*-Kontrolltieren abschließend quantitativ. Hierzu verglichen wir zunächst die Gesamtzahl an Ausführungsgängen in pankreatischen Gewebeschnitten 13 Wochen alter *Kras^{G12D}*- und *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäuse bei 200-facher Vergrößerung.

Abbildung 14A veranschaulicht eine Zahl von im Mittel 28 Gängen pro zehn Gesichtsfelder im Pankreas der *Kras^{G12D}*-Linie. Im Vergleich dazu weist das pankreatische Gewebe der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäuse mit im Mittel 14 Gängen pro zehn Gesichtsfelder nur halb so viele duktales Strukturen auf. Da PanINs neoplastisches Gangepithel darstellen, korreliert die Zahl der Ausführungsgänge mit der PanIN-Dichte des Gewebes. Die reduzierte Zahl duktales Strukturen in der Stat3-defizienten *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie bestätigt somit, dass die Entwicklung präneoplastischer Läsionen durch die Ablation Stat3-abhängiger Signalkaskaden im *Kras^{G12D}*-Mausmodell gehemmt wird.

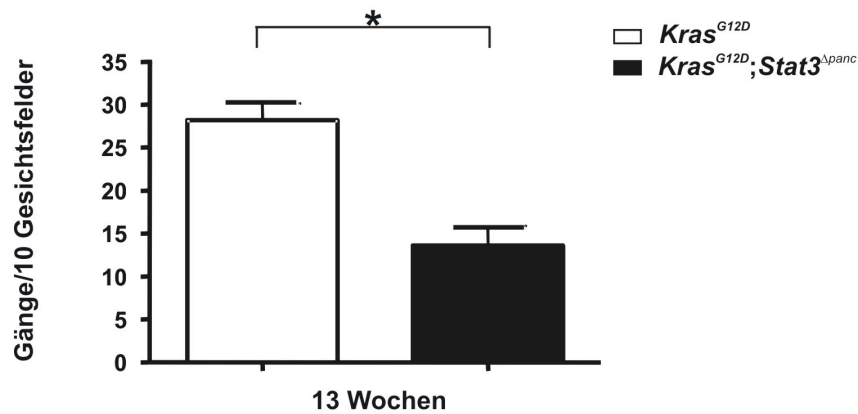
Wie unter Abschnitt I.1.2. beschrieben, wurde auf molekulargenetischer und histopathologischer Basis ein definiertes Progressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms entwickelt. Hiernach werden die dem invasiven Karzinom vorausgehenden präneoplastischen Läsionen in die PanIN-Stadien 1-3 eingeteilt (Hruban et al. 2004). Um zu prüfen, ob diese stufenweise PanIN-Progression durch die Inhibition der p-Stat3^{Y705}-Expression in *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen tatsächlich verlangsamt wird, quantifizierten wir abschließend normale Ausführungsgänge und PanIN-Läsionen 1-3 in 200-fach vergrößerten Gewebeschnitten 13 Wochen alter Tiere.

Abbildung 14B demonstriert eine reduzierte Zahl normaler Ausführungsgänge in *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*- im Vergleich zu nicht Stat3-defizienten *Kras^{G12D}*-Mäusen.

In nicht Stat3-defizienten *Kras^{G12D}*-Tieren lässt sich die durch konstitutiv aktives K-Ras-Protein induzierte PanIN-Progression nachvollziehen. Zum Zeitpunkt von 13 Wochen offenbart das Pankreas dieser Maus vornehmlich PanIN-1B-Läsionen. Es treten auch erste PanIN-2-Läsionen auf. Im Vergleich dazu gehen die im Pankreas der Stat3-defizienten *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie detektierbaren PanINs nicht über das Stadium 1 hinaus.

Zusammenfassend legen unsere quantitativen Analysen nahe, dass die Stat3-Inaktivierung in der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Maus in einer deutlichen Verlangsamung der für das *Kras^{G12D}*-*in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese typischen, altersabhängigen PanIN-Progression resultiert.

A



B

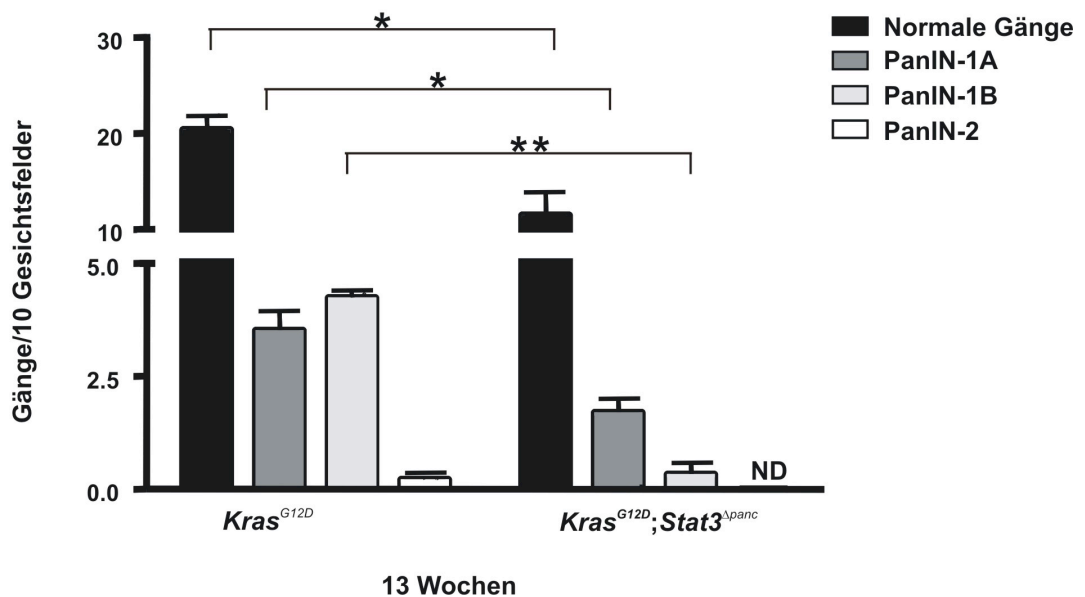


Abbildung 14: Quantitative Auswertung der PanIN-Läsionen in Stat3-defizienten *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen im Vergleich zu *Kras^{G12D}*-Kontrolltieren.

A: Analyse der Gesamtzahl an Ausführungsgängen pro zehn Gesichtsfelder in mindestens 15 sequentiellen Gewebsschnitten 13 Wochen alter Tiere bei 200-facher Vergrößerung. Mittelwert ± Standardabweichung ($n \geq 4$), * $p < 0,05$.

B: Quantifizierung normaler Gänge und PanIN-Läsionen 1A, 1B und 2 pro zehn Gesichtsfelder in mindestens 15 sequentiellen Schnitten bei 200-facher Vergrößerung zum Zeitpunkt von 13 Wochen. Mittelwert ± Standardabweichung ($n \geq 4$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. ND = nicht detektierbar.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen sich im Hinblick auf die unter I.4. formulierte Zielsetzung wie folgt zusammenfassen:

- 1) In PanIN-Läsionen von LSL-*Kras*^{G12D};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Tumormodellmäusen lässt sich eine Aktivierung des Stat3-Signalwegs nachweisen.
- 2) Unter Zuhilfenahme der Cre/loxP-Technologie konnten wir eine pankreasspezifische Deletion des für den Tyrosinrest 705 kodierenden Exons 21 des *Stat3*-Gens unter Generierung der LSL-*Kras*^{G12D};*Stat3*^{F/F};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc})-Maus erzielen. Über die fehlende Expression von Stat3^{Y705}-Protein wird die Jak2-vermittelte Stat3-Phosphorylierung und darüber die Stat3-abhängige Signaltransduktion in dieser Maus inhibiert. Morphologie und Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreas werden durch die Inaktivierung des Stat3-Signalwegs nicht beeinflusst. Ebenso wird die Expression von PanIN-induzierendem, konstitutiv aktivem K-Ras-Protein durch die *Stat3*-Genmutation in *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen nicht gestört.
- 3) Morphologische und biochemische Analysen des Pankreas der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Linie im Vergleich zu *Kras*^{G12D}-Kontrolltieren offenbaren eine deutliche Verzögerung der für das *Kras*^{G12D}-Mausmodell typischen, altersabhängigen PanIN-Entwicklung und -Progression.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassend schließen, dass eine Inaktivierung des Stat3-Signalwegs die Progression präneoplastischer Läsionen im *Kras*^{G12D}-Mausmodell verzögert. Die *Kras*^{G12D}-vermittelte PanIN-Initiierung kann durch die fehlende Expression von p-Stat3^{Y705} jedoch nicht verhindert werden.

Der Transkriptionsfaktor Stat3 stellt somit offensichtlich einen essentiellen Regulator der Progression präneoplastischer Läsionen im murinen *in-vivo*-Modell der pankreatische Onkogenese dar.

IV. DISKUSSION

1. Stat3 hat keinen Einfluss auf Morphologie und Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments

Ein ubiquitärer Knockout des *Stat3*-Gens mit Hilfe konventioneller Gen-Targeting-Methoden führt im Mausmodell zu einer frühen embryonalen Letalität mit einer raschen Degeneration der Embryonen zwischen Embryonaltag 6,5 und 7,5 (Takeda et al. 1997). Um die Rolle des Stat3-Signalwegs in der Pankreaskarzinogenese *in-vivo* untersuchen zu können, war es konsequenterweise notwendig eine gewebespezifische Stat3-Inaktivierung im Mausmodell zu etablieren. Wie bereits andere Forschungsgruppen zuvor (Takeda et al. 1998; Sano 1999; Takeda et al. 1999; Schweizer et al. 2002; Fornek et al. 2006) machten wir uns hierbei die Cre/loxP-Strategie (Gu et al. 1994) zunutze. Wir generierten die *Stat3^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} (Stat3^{Δpanc})*-Linie, in der die Stat3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 und darüber die Aktivierung des Proteins pankreasspezifisch inhibiert wird (vergleiche Abschnitt III.1.). Morphologie und Funktion des Pankreas sollten durch das Fehlen von phosphorylierbarem Stat3-Protein und die damit einhergehende Ablation Stat3-abhängiger Signalkaskaden in *Stat3^{Δpanc}*-Mäusen jedoch nicht beeinträchtigt werden. Nur so war eine valide, gentechnologisch basierte Analyse des Signalwegs in der pankreatischen Onkogenese möglich.

Unsere immunhistochemischen Evaluationen (vergleiche Abbildung 10) zeigen, dass sich aus *Stat3^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} (Stat3^{Δpanc})*-Mäusen isolierte Pankreata morphologisch nicht von *Stat3^{+/+};Ptf1a-cre^{ex1} (Stat3^{+/+})*-Kontrollorganen unterscheiden. Sowohl das exokrine Kompartiment, die Azini, als auch das endokrine Kompartiment, die Langerhans-Inseln, bleiben in ihrer Entwicklung unbeeinflusst. Die Ausprägung der verdauungsenzymdrainierenden duktaalen Strukturen wird durch die Ausschaltung der Stat3-Phosphorylierung ebenfalls nicht beeinträchtigt, was die in beiden Mauslinien äquivalente Expression des duktaalen Epithelzellmarkers CK-19 beweist. Auch das Verteilungsmuster der Peptidhormone Insulin und Glukagon im Bereich der Langerhans-Inseln stellt sich in *Stat3^{+/+}* und *Stat3^{Δpanc}*-Tieren gleich dar. Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass die Inaktivierung des Stat3-Signalwegs Morphologie und Funktion des exokrinen und endokrinen Pankreas nicht beeinflusst.

Eine mögliche Rolle von Stat3 in der Organogenese des Pankreas wurde bisher kaum untersucht. Einige Studien der letzten Jahre beschäftigten sich jedoch, speziell im Hinblick auf die endokrine Erkrankung Diabetes mellitus, mit dem Einfluss des Stat3-Signalwegs auf die Ausbildung und Funktion der Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhans-Inseln. Hierzu wurden, wie auch in unseren Untersuchungen (vergleiche Abschnitt III.1.), mittels Cre/loxP-Technik gentechnologisch veränderte Mäuse generiert.

Die Arbeitsgruppen um Gorogawa (Gorogawa et al. 2004) und Cui (Cui et al. 2004) etablierten über die Kreuzung von *RIP (Rat Insulin Promotor)-Cre* transgenen Mäusen (Postic et al. 1999) mit *Stat3^{F/F}*-Mäusen (Takeda et al. 1998) eine gewebespezifische Deletion des Exons 21 des *Stat3*-Gens in den β -Zellen des Pankreas. Die auch als *Stat3-insKO* bezeichneten Mäuse sind, ebenso wie unsere *Stat^{Δpanc}*-Tiere, nicht dazu in der Lage p-Stat3^{Y705} zu exprimieren, wodurch der Stat3-Signalweg in den β -Zellen inaktiviert wird. Die Tiere zeigten zum Zeitpunkt von fünf Wochen bereits eine Glukoseintoleranz und eine Dysfunktion der frühen Insulinsekretion. Acht Wochen alte Mäuse waren zunehmend adipös (Gorogawa et al. 2004). Allerdings sind diese Beobachtungen wohl hauptsächlich auf die gleichzeitige Stat3-Inaktivierung in Leptin-Rezeptor positiven Neuronen im Hypothalamus, welche ebenfalls den RIP exprimieren, zurückzuführen. Durch die Verwendung eines Promotors, der nicht ausschließlich in pankreatischen β -Zellen, sondern auch im Hypothalamus gebildet wird, lassen sich die durch einen veränderten Glucosemetabolismus verursachten Effekte somit nicht sicher auf die Stat3-Defizienz im endokrinen Pankreaskompartiment zurückführen (Cui et al. 2004). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (vergleiche Abbildung 10) blieb der Insulin-Gehalt der Langerhans-Inseln sowie die Insel-Gesamtmasse durch die Stat3-Inaktivierung entsprechend unbeeinflusst. Lediglich zeigte sich eine leicht veränderte Morphologie in Form eines vermehrten Vorkommens von α -Zellen im Zentrum der Langerhans-Inseln (Gorogawa et al. 2004).

In zwei weiteren experimentellen Studien wurde über die Kreuzung von *Stat3^{F/F}*-Mäusen mit *Pdx-1-Cre* transgenen Mäusen eine Inaktivierung von Stat3 ausschließlich und spezifisch im endokrinen Pankreaskompartiment erzielt (Lee et al. 2005; Kostromina et al. 2010). Pdx-1 ist für die Differenzierung von pankreatischen Vorläuferzellen in Inselzellen essentiell und wird in adulten Mäusen spezifisch in β -Zellen exprimiert (Jonsson et al. 1994; Offield et al. 1996). Lee und Kollegen konnten zeigen, dass diese als *Stat3^{F/F},PC* bezeichneten Mäuse im direkten Gegensatz zu *RIP-Cre* transgenen Mäusen über einen Beobachtungszeitraum von sechs Monaten weder eine Glucoseintoleranz, noch eine

Adipositas entwickelten (Lee et al. 2005). Dies bestätigt, dass die von Gorogawa und Cui beobachteten metabolischen Effekte auf die Inaktivierung von Stat3 im Hypothalamus und nicht auf eine defiziente Insulinsekretion der β -Zellen durch dort fehlendes Stat3 zurückzuführen sind.

Corcoran und Kollegen kreuzten ebenfalls *Pdx-1-Cre* transgene Mäusen mit *Stat3^{F/F}*-Mäusen (bei ihnen als *Stat3^{lox/lox}* bezeichnet) und etablierten so eine spezifische Stat3-Inaktivierung im endokrinen Pankreas. In Einklang mit unseren histologischen Evaluationen der *Stat3^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1}* (*Stat3^{Δpanc}*)-Linie (vergleiche Abbildung 10), offenbarte das Pankreas Stat3-defizienter *Pdx1-Cre;Stat3^{lox/lox}*-Mäuse in der H.E.-Färbung keinerlei morphologische Veränderungen, weder im Bereich des endokrinen noch im exokrinen Kompartiment (Corcoran et al. 2011).

Damit in Übereinstimmung stehen auch die jüngsten Untersuchungen von Fukuda und Kollegen. Sie verwendeten in ihren Experimenten genau wie wir *Ptf1a-Cre;Stat3^{F/F}*-Mäuse und konnten zeigen, dass diese zum Zeitpunkt der Geburt sowie nach sechs Wochen trotz der Stat3-Defizienz im exokrinen Kompartiment morphologisch unauffällige Pankreata aufweisen (Fukuda et al. 2011).

Sowohl unsere als auch in anderen Studien gewonnene Ergebnisse lassen somit zusammenfassend den Schluss zu, dass Stat3 weder einen Einfluss auf die Morphologie noch auf die Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments hat. Eine organspezifische Stat3-Inaktivierung sollte somit einen legitimen Ansatzpunkt zur Analyse dieses Signalwegs im Mauspankreas darstellen.

2. Die Aktivität des Stat3-Signalwegs im *Kras^{G12D}*-Mausmodell

Aktivierende Mutationen des *Kras*-Onkogens zählen zu den frühesten genetischen Veränderungen in der pankreatischen Onkogenese. Sie lassen sich in etwa 36 % der PanIN-1A-, in 44 % der PanIN-1B, in 87 % der PanIN-2-3-Läsionen (Löhr et al. 2005) und in bis zu 100 % der fortgeschrittenen duktaalen Adenokarzinome nachweisen (Almoguera et al. 1988; Smit et al. 1988; Rozenblum et al. 1997). Die zentrale Rolle von K-Ras in der Initiierung und Progression maligner Neoplasien im exokrinen Pankreas lässt sich anhand gentechnisch veränderter Mäuse *in-vivo* nachvollziehen (Hruban et al. 2006).

In dem in dieser Arbeit verwendeten *Kras^{G12D}*-Mausmodell (vergleiche Abschnitt I.2.2.) konnte allein über die pankreasspezifische Etablierung der häufigsten *Kras*-Mutation, einer aktivierenden Glycin-zu-Aspartat-Punktmutation auf dem Kodon 12 (G12D) des Exons 1, die Entwicklung aller PanIN-Stadien bis hin zu invasiven Karzinomen im Mauspankreas

induziert werden (Hingorani et al. 2003a). Damit stellt das Modell eine ideale Plattform zur systematischen Analyse weiterer, an der K-Ras-induzierten PanIN-Progression möglicherweise beteiligter molekularer Faktoren und Signalwege dar.

Beispielsweise konnte über die zusätzliche Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *INK4A/ARF* in *Kras*^{G12D}-Mäusen eine Beschleunigung der PanIN-Entstehung, sowie eine frühere Invasivität und Metastasierung der Tumoren beobachtet werden (Aguirre et al. 2003). Ebenso führte die Kreuzung von *Kras*^{G12D}- mit *Trp53*^{R172H}-Tieren, welche eine zur Mutation in humanen Pankreaskarzinomen orthologe Missensmutation des Tumorsuppressorgens *TP53* aufweisen (Lang et al. 2004), zu einer beschleunigten Entwicklung lokal invasiver sowie metastasierter Adenokarzinome (Hingorani et al. 2005).

Wie bereits unter Abschnitt I.3. dargelegt, fungiert das Protein Stat3 intranukleär als wichtiger transkriptioneller Regulator von Genen, deren zugehörige Proteine in fundamentale biologische Zellprozesse, wie Apoptose, Proliferation, Inflammation und Angiogenese, involviert sind. Konsequenterweise birgt eine konstitutive Aktivität des Stat3-Signalwegs die Gefahr einer Dysregulation dieser Prozesse, verbunden mit einer potentiellen zellulären Entartung (Bowman et al. 2000; Bromberg et al. 2000; Yu et al. 2004; Haura et al. 2005; Groner et al. 2008; Yu et al. 2009).

Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass konstitutiv aktives STAT3-Protein in den letzten Jahren in zahlreichen humanen Tumorzelllinien und Primärtumoren nachgewiesen werden konnte. Hierzu zählen sowohl solide Tumore wie Mammakarzinome (Sartor et al. 1997; Garcia et al. 2001), Kopf- und Halstumore (Song et al. 2000; Xi et al. 2003), Prostatakarzinome (Lou et al. 2000; Mora et al. 2002) oder Magenkarzinome (Kanda et al. 2004) als auch Leukämien (Coffer et al. 2000), Lymphome (Weber-Nordt et al. 1996) und Multiple Myelome (Catlett-Falcone et al. 1999).

Auch in humanen Pankreaskarzinomzelllinien und -geweben wurde eine abnorme STAT3-Aktivierung dokumentiert (Scholz et al. 2003; Trevino et al. 2006; Hutzen et al. 2009; Glienke et al. 2010; Lin et al. 2010b). Die genaue Funktion und Bedeutung des Onkogens *STAT3* in der pankreatischen Onkogenese *in-vivo* blieb bisher jedoch unbeleuchtet.

Im Rahmen unserer experimentellen Untersuchungen konnten wir Stat3 und potentiell transkriptionell aktives p-Stat3^{Y705} proteinchemisch im Pankreas neun und 13 Wochen alter *Kras*^{G12D}-Mäuse nachweisen (vergleiche Abbildung 11A). Immunhistochemisch offenbarte das Pankreas von *Kras*^{G12D}-Tieren zum Zeitpunkt von 13 Wochen p-Stat3 und p-Jak2 positive PanIN-Läsionen (vergleiche Abbildung 11B). Die Tyrosinkinase p-Jak2 ist

in der Signaltransduktion Stat3 vorgeschaltet und katalysiert die Stat3^{Y705}-Phosphorylierung (Levy et al. 2002; Schindler et al. 2007).

Des Weiteren ließen sich ebenfalls immunhistochemisch Stat3-abhängige Zielproteine, deren zugehörige Gene transkriptionell durch Stat3 induziert werden, in PanINs der *Kras*^{G12D}-Mauslinie detektieren (vergleiche Abbildung 11B).

Die hierbei nachgewiesenen Proteine Survivin, Bcl-X_L und Mcl-1 wurden in experimentellen Studien der letzten Jahre als anti-apoptotische Mediatoren identifiziert über deren Hochregulation Stat3 zum Überleben entarteter Zellen in humanen Krebszelllinien beiträgt (Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 2002; Aoki et al. 2003; Gritsko et al. 2006). Auch in humanen Pankreaskarzinomzelllinien konnte über die Inhibition von STAT3 die Transkriptionsrate von *bcl-x_L* und *survivin* herabgesetzt und Apoptose induziert werden. Zudem resultierte die STAT3-Inhibition in einer herabgesetzten Expression des Zell-Zyklus-Regulators Cyclin D1 (Lin et al. 2010a), dessen zugehöriges Gen ebenfalls durch Stat3 transkriptionell reguliert wird (Sinibaldi et al. 2000). Kawesha und Kollegen demonstrierten ebenso eine Überexpression von Cyclin D1 in Proben humaner Pankreasadenokarzinome (Kawesha et al. 2000). Auch wir konnten Cyclin D1 immunhistochemisch in PanIN-Läsionen von *Kras*^{G12D}-Mäusen nachweisen. Eine Überexpression dieses Moleküls kann zu einer beschleunigten Progression entarteter Zellen von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus beitragen, was erklärt, warum Cyclin D1 neben dem Pankreaskarzinom auch in zahlreichen anderen Tumoren nachgewiesen werden konnte (Knudsen et al. 2006; Kim et al. 2009).

In *Kras*^{G12D}-induzierten präneoplastischen pankreatischen Läsionen konnten wir desweiteren immunhistochemisch das Enzym Cox-2 detektieren. Cox-2 wird durch Stat3 in seiner Expression gesteigert und trägt über die Produktion von Prostaglandinen zu einer chronischen Entzündung bei (Dalwadi et al. 2005). Inflammatorische Umgebungsfaktoren sind erwiesenermaßen maßgeblich an der Initiation und/oder Progression einer Vielzahl von Tumoren beteiligt (Mantovani et al. 2008). Auch in der Pankreaskarzinogenese scheinen inflammatorische Mechanismen eine entscheidende Rolle zu spielen. Beispielsweise konnte über die Induktion einer chronischen Pankreatitis in Mäusen, die onkogenes *Kras*^{G12D} azinuszellspezifisch exprimieren, die PanIN-Progression und Karzinomentwicklung beschleunigt werden (Guerra et al. 2007). Über die Aktivierung pro-onkogener inflammatorischer Signalwege fungiert Stat3 erwiesenermaßen als ein zentraler Regulator tumor-assoziiertes Entzündung (Yu et al. 2009; Grivennikov et al. 2010). Die durch uns demonstrierte Anwesenheit des pro-inflammatorischen Stat3-Zielproteins Cox-2

im *Kras*^{G12D}-Mausmodell könnte ein Hinweis darauf sein, dass Stat3 auch im Pankreas über entzündungsmodulierende Mechanismen zur Onkogenese beiträgt.

Als weiteres Protein, dessen Expression im Rahmen der Stat3-Signalkaskade gesteigert wird, wiesen wir Hsp-70 (Madamanchi et al. 2001) in PanINs der *Kras*^{G12D}-Mauslinie nach. Hsp-70 fungiert als zytoprotektives Molekül, das insbesondere über anti-apoptotische Mechanismen das Überleben von Karzinomzellen ermöglichen kann (Garrido et al. 2006; Jago et al. 2010).

Das Molekül MMP-2 stellt ein proteolytisches Enzym dar, das über Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen unterstützen kann (Curran et al. 1999). Zudem trägt MMP-2 zur Angiogenese bei, wodurch die weitere Ausbreitung entarteter Zellen im Organismus begünstigt wird (Moses 1997). Das für MMP-2 kodierende Gen wird ebenfalls durch Stat3 transkriptionell reguliert (Xie et al. 2004). Unsere immunhistochemischen Evaluationen demonstrieren die Anwesenheit von MMP-2 in PanINs der *Kras*^{G12D}-Mauslinie.

Bisher konnte die Aktivität von STAT3 nur in humanen Pankreaskarzinomzelllinien und -geweben nachgewiesen werden (Scholz et al. 2003; Trevino et al. 2006; Hutzen et al. 2009; Glienke et al. 2010; Lin et al. 2010b). Über den Nachweis von p-Jak2, p-Stat3 sowie diverser Proteine, deren zugehörige Gene transkriptionell durch Stat3 induziert werden, konnten wir im Rahmen unserer Untersuchungen erstmals die Präsenz des Stat3-Signalwegs im murinen *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese belegen.

Die Stat3-Zielproteine, die in PanIN-Läsionen der *Kras*^{G12D}-Mauslinie durch uns detektiert werden konnten, tragen in ihrer Funktion, wie in diesem Abschnitt diskutiert, auf zellulärer Ebene potentiell zu apoptotischer Resistenz, kontinuierlicher Proliferation, Invasivität und Metastasierung, Angiogeneseinduktion sowie Tumor-begünstigender Inflammation bei. Damit können prinzipiell alle Kernattribute einer Tumorzelle durch diese Moleküle vermittelt werden (Hanahan et al. 2011). Ob und inwieweit Stat3, möglicherweise eben durch die Aktivierung dieser tumor-förderlichen Mechanismen, zu Überleben und Proliferation *Kras*^{G12D}-exprimierender duktaler Zellen beiträgt, beleuchteten unsere weiterführenden Experimente.

3. Die Funktion von Stat3 in der *Kras*^{G12D}-induzierten pankreatischen Onkogenese

Der Nachweis der Aktivität des Stat3-Signalwegs im murinen *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese führte zu der Frage, welchen Einfluss Stat3 auf die durch mutiertes *Kras* vermittelte Initiation und Progression präneoplastischer Läsionen im Pankreas hat.

Zur Annäherung an die Beantwortung dieser Frage generierten wir unter Verwendung der *Stat3*^{F/F};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Stat3*^{Δ_{panc}})- und der LSL-*Kras*^{G12D};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Mauslinie gemischt mutierte Mäuse, die neben der onkogenen *Kras*^{G12D}-Mutation zusätzlich eine spezifische Inaktivierung des Stat3-Signalwegs im exokrinen und in Teilen des endokrinen Pankreas aufweisen. Diese LSL-*Kras*^{G12D};*Stat3*^{F/F};*Ptfla-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}})-Mäuse exprimieren den Tyrosinrest 705 des Stat3-Moleküls nicht, sodass die Phosphorylierung und darüber Aktivierung von Stat3 im Pankreas dieser Tiere unmöglich ist (vergleiche Abschnitt III.3.).

Im direkten Vergleich zu normalen *Kras*^{G12D}-Mäusen, die, wie in Abbildung 11 gezeigt und unter IV.2. diskutiert, aktives Stat3 im Pankreas aufweisen, demonstrierte das Pankreas Stat3-defizienter *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}}-Tiere 13 Wochen postpartum bereits makroskopisch ein Fehlen des für die *Kras*^{G12D}-Linie typischen Erscheinungsbildes. Demnach zeigte sich weder eine Organvergrößerung noch eine Veränderung des Parenchyms hin zu einer fokal nodulären und lobulierten Struktur. Vielmehr ähnelte das *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}}-Pankreas dem der kein onkogenes *Kras*^{G12D}-exprimierenden LSL-*Kras*^{G12D}-Linie (vergleiche Abbildung 12D).

Auf histologischer Ebene konnte in *Kras*^{G12D}-Mäusen die für das *Kras*^{G12D}-Mausmodell typische zeitabhängige Entwicklung progressiver PanIN-Läsionen (Hingorani et al. 2003a) nachvollzogen werden. Das Pankreas Stat3-defizienter *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}}-Mäuse hingegen offenbarte im zeitlichen Verlauf lediglich vereinzelte reaktive Gänge bis hin zu geringgradigen PanINs (PanIN1), die allerdings erst zum Zeitpunkt von 18 Wochen postpartum auftraten (vergleiche Abbildung 13A).

Die quantitative Auswertung der PanIN-Läsionen im Pankreas von *Kras*^{G12D}- und *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}}-Mäusen bestätigte unsere mikro- und makromorphologischen Beobachtungen. Im Gegensatz zur *Kras*^{G12D}-, wiesen 13 Wochen alte Tiere der *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δ_{panc}}-Linie sowohl weniger duktale Strukturen insgesamt als auch eine reduzierte Anzahl präneoplastischer Läsionen auf. Zudem gingen die in

Kras^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäusen detektierten PanINs nicht über das Stadium 1 hinaus (vergleiche Abbildung 14).

Zusammenfassend offenbaren unsere Ergebnisse erstmals, dass eine Inaktivierung der Stat3-abhängigen Signaltransduktion über die Inhibition der Expression von p-Stat3^{Y705} in einer Verlangsamung der PanIN-Progression im *Kras*^{G12D}-Mausmodell resultiert. Daraus lässt sich ableiten, dass Stat3 offenbar eine zentrale Rolle als Regulator des Voranschreitens präneoplastischer duktaler Läsionen in der durch konstitutiv aktives K-Ras-Protein induzierten pankreatischen Onkogenese einnimmt.

Zwei experimentelle Studien der letzten Monate beschäftigten sich ebenfalls mit der Rolle von Stat3 in der pankreatischen Onkogenese im *Kras*^{G12D}-Mausmodell.

Sowohl die Arbeitsgruppe um Corcoran als auch Fukuda und Kollegen konnten in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen (vergleiche Abbildung 11) die Expression von p-Stat3 in *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D}- (Corcoran et al. 2011) bzw. in *Ptf1a-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D}-Tumormodellmäusen (Fukuda et al. 2011) nachweisen.

Zu erwähnen sei hierbei, dass die in den Untersuchungen von Corcoran und Kollegen verwendeten *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D}-Tiere, in denen onkogenes K-Ras über die Kopplung der Expression der Cre-Rekombinase an den pankreasspezifischen *Pdx-1*-Promotor spezifisch in pankreatischen Inselzellen exprimiert wird, genau wie die bereits eingehend beschriebene *LSL-Kras*^{G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D})-Modellmaus (vergleiche Abschnitt I.2.2.) zeitabhängig das komplette Spektrum an PanIN-Läsionen bis hin zu invasiven Karzinomen im Pankreas entwickeln (Hingorani et al. 2003a).

Beide Arbeitsgruppen konnten somit in Konsens mit unseren Ergebnissen p-Stat3-Protein im murinen *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese detektieren. Allerdings demonstrieren unsere immunhistochemischen Evaluationen darüber hinaus die Expression Stat3-abhängiger Zielproteine im Pankreas der *Kras*^{G12D}-Maus (vergleiche Abbildung 11B), was beweist, dass die Präsenz von p-Stat3 auch tatsächlich in einer Induktion der Transkription der durch Stat3 regulierten Gene resultiert. Dieser Nachweis ist bisher einzigartig und wurde durch die anderen Arbeitsgruppen so nicht erbracht.

Corcoran und Kollegen etablierten in ihren weiteren Experimenten über die Kreuzung von *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D}-Tieren mit Mäusen, die ein konditionales *Stat3*-Knockout-Allel (*Stat3*^{lox}) enthalten, eine spezifische Stat3-Defizienz im endokrinen Pankreaskompartiment der *Kras*^{G12D}-Tumormodellmaus. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden *Pdx1-Cre*;*LSL-Kras*^{G12D};*Stat3*^{lox/lox}-Mäuse zeigten im Gegensatz zu unseren *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Tieren, die bedingt durch die fehlende Expression des

Tyrosins 705 lediglich kein p-Stat3^{Y705} und ein verkürztes Stat3-Protein (Stat3^{Δpanc}) exprimieren (vergleiche Abbildung 12A und C), einen kompletten Verlust von p-Stat3 und Stat3 im Pankreas. Zum Zeitpunkt von zwölf Wochen präsentierte sich das Pankreas der *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{lox/lox}*-Linie im Vergleich zu *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{lox/+}*-Kontrolltieren mit einer 6,6fach erniedrigten PanIN-Dichte (Corcoran et al. 2011). Dies deckt sich mit unseren histologischen Evaluationen, die zu den Zeitpunkten von neun, 13 und 18 Wochen, jeweils im Vergleich zur typischen zeitabhängigen PanIN-Progression in *Kras^{G12D}*-Tieren, in Stat3-defizienten *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Mäusen entweder keine PanIN-Läsionen, lediglich reaktive Gangstrukturen oder sehr frühe PanIN-Läsionen demonstrieren (vergleiche Abbildung 13A).

Fukuda und Kollegen etablierten genau wie wir eine spezifische Inaktivierung des Stat3-Signalwegs über die Inhibition der Expression von p-Stat3^{Y705} im exokrinen Pankreas der *Kras^{G12D}*-Maus. Sie färbten histologische Schnitte von aus sechs Wochen alten *Ptf1a-Cre;Kras^{G12D};Stat3^{ff}*-Mäusen (bei uns als *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}* bezeichnet) isolierten Pankreata mit Alcianblau. Da Alcianblau einen Marker intestinaler Mucin-Akkumulation darstellt, welche wiederum als ein PanIN-Charakteristikum gilt, konnte die Arbeitsgruppe auf diesem Wege PanIN-Läsionen in pankreatischen Schnittpräparaten detektieren. Im direkten Vergleich zu *Ptf1a-Cre;LSL-Kras^{G12D}*-Tumormodellmäusen zeigte sich in Stat3-defizienten *Ptf1a-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{ff}*-Mäusen hierbei prozentual ein deutlich geringerer Anteil des normalen Pankreasgewebes durch PanIN-Läsionen ersetzt (Fukuda et al. 2011).

Auch diese Ergebnisse decken sich mit unseren histologischen Evaluationen im Rahmen derer wir, analog zum Prinzip der Alcianblau-Färbung, mit einem gegen das PanIN-spezifische Glykoprotein Muc5 gerichteten Antikörper präneoplastische Läsionen im Pankreas der *Kras^{G12D};Stat3^{Δpanc}*-Linie detektieren konnten. Hierbei zeigte sich analog zu den Evaluationen von Fukuda und Kollegen eine deutlich verminderte PanIN-Dichte im Vergleich zu *Kras^{G12D}*-Kontrolltieren (vergleiche Abbildung 13B).

Über den Nachweis einer reduzierten PanIN-Ausprägung in Stat3-defizienten *Kras^{G12D}*-Tumormodellmäusen konnten sowohl Corcoran als auch Fukuda und Kollegen somit in Übereinstimmung mit unseren Daten rückschließen, dass Stat3 eine wichtige Rolle in der durch onkogenes *Kras* induzierten PanIN-Formation einnimmt. Im Gegensatz zu unserem experimentellen Vorgehen evaluierten beide Arbeitsgruppen die PanIN-Entwicklung in Stat3-defizienten *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{lox/lox}*- (Corcoran et al. 2011) bzw.

Ptfla-Cre;LSL-*Kras*^{G12D};Stat3^{fl/fl}-Mäusen (Fukuda et al. 2011) aber weder im zeitlichen Verlauf noch klassifizierten sie die PanIN-Läsionen quantitativ in die einzelnen Grade. Damit können ihre Ergebnisse im Gegensatz zu unseren Untersuchungen nicht demonstrieren, dass über die Inaktivierung des Stat3-Signalwegs die für das *Kras*^{G12D}-Mausmodell typische zeitabhängige Progression der PanIN-Läsionen über die Grade 1 bis 3 tatsächlich deutlich verlangsamt wird.

Konsequenterweise ergibt sich aus unseren Ergebnissen die weiterführende Frage, wie genau Stat3 zur Progression präneoplastischer Läsionen im *Kras*^{G12D}-*in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese beiträgt. Wie unter IV.2. diskutiert lassen sich Hinweise auf mögliche molekulare Mechanismen, über die der Stat3-Signalweg zur Entartung duktaler Zellen führen könnte, aus den Funktionen der durch Stat3 in ihrer Expression gesteigerten Proteine ableiten. Diese tragen, wie bereits beschrieben, potentiell zu apoptotischer Resistenz, kontinuierlicher Proliferation, Invasivität und Metastasierung, Angiogeneseinduktion sowie Tumor-begünstigender Inflammation bei (vergleiche Abschnitt IV.2.).

In den an die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen anschließenden, in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten evaluierten wir diese molekularen Mechanismen, unter anderem über die Detektion entsprechender Markerproteine, genauer. Im Vergleich zu *Kras*^{G12D}-Mäusen zeigte das Pankreas Stat3-defizienter *Kras*^{G12D};Stat3^{Δpanc}-Tiere hierbei immunhisto- und/oder proteinchemisch eine vermehrte Expression apoptotischer Marker, einen deutlich niedrigeren Proliferationsindex, eine verminderte Expression proliferationsfördernder Proteine sowie eine fehlende Expression des proinflammatorischen Enzyms Cox-2. Damit konnten wir beweisen, dass Stat3 tatsächlich über die Regulation von Apoptose, Proliferation und Inflammation die *Kras*^{G12D}-abhängige maligne Entartung duktaler Zellen fördert (Lesina et al. 2011).

Der Nachweis von aktivem Stat3 sowohl in humanen Pankreasadenokarzinomen (Scholz et al. 2003; Trevino et al. 2006; Hutzen et al. 2009; Glienke et al. 2010; Lin et al. 2010b) als auch in murinen PanINs (Corcoran et al. 2011; Fukuda et al. 2011; Lesina et al. 2011) führt konsequenterweise zu der Frage, wie Stat3 im Rahmen der pankreatischen Onkogenese aktiviert wird. Hierbei könnten entweder zell-autonome Mechanismen oder eine parakrine bzw. autokrine Stimulation der dukталen Zellen in einer Stat3-Aktivierung resultieren.

Unsere immunhistochemischen Evaluationen der *Kras*^{G12D}-Tumormodellmaus veranschaulichen die Expression von p-Stat3-Protein sowohl in malignen Zellen im

Bereich der PanIN-Läsionen als auch in infiltrierenden Zellen und teilweise in umgebenden Azini (vergleiche Abbildung 11B). Diese weitverbreitete Phosphorylierung von Stat3 im Pankreas der *Kras^{G12D}*-Linie weist eher auf eine parakrine oder autokrine als auf eine zell-autonome Aktivierung des Signalwegs hin. Für eine nicht-zell-autonome Stat3-Aktivierung spricht außerdem der ebenfalls in Abbildung 11B veranschaulichte Nachweis von p-Jak2 im Pankreas des *Kras^{G12D}*-Mausmodells. Jak2 ist im Rahmen des Stat3-Signalwegs Stat3 vorgeschaltet und katalysiert in seiner phosphoryliert aktiven Form die Stat3-Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 (Aaronson et al. 2002; Levy et al. 2002). Die Phosphorylierung von Jak2 wiederum erfolgt über die Aktivierung des ubiquitär exprimierten gp130-Rezeptors durch spezifische Liganden. Hierbei handelt es sich häufig um Zytokine des IL-6-Typs, wozu IL-6 selbst, aber auch LIF (leukemia inhibitor factor), IL-11, OSM (Oncostatin M), CNTF (ciliary neurotrophic factor) und IL-27 zählen (Heinrich et al. 1998). Der gleichzeitige Nachweis von p-Stat3 und p-Jak2 im *Kras^{G12D}*-Modell legt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung des Stat3-Signalwegs in der pankreatischen Onkogenese eben über die vermehrte Expression dieser gp130-Rezeptorliganden erfolgen könnte. Hierfür sprechen beispielsweise auch die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien, die zeigen konnten, dass die Höhe der IL-6-Serumwerte bei am Pankreasadenokarzinom erkrankten Patienten signifikant mit dem Krankheitsausgang korrelierte (Ebrahimi et al. 2004; Talar-Wojnarowska et al. 2009).

Daraus ergibt sich wiederum die Frage, ob die über die Bindung an den gp130-Rezeptor zur Stat3-Aktivierung führenden Zytokine durch onkogenes *Kras^{G12D}*-exprimierende pankreatische Zellen selbst, im Sinne eines autokrinen Mechanismus, oder durch Zellen in der Umgebung der PanIN-Läsionen, in Form einer parakrinen Stimulation, gebildet werden.

Fukuda und Kollegen induzierten mit Hilfe des Cholezystokinin-Analogons Caerulein in Stat3-defizienten *Ptfla-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{fl/fl}*-Mäusen sowie in *Ptfla-Cre;LSL-Kras^{G12D}*-Kontrolltieren eine akute Pankreatitis. Einen Tag nach Caerulein-Injektion konnten sie mit Hilfe quantitativer PCR nachweisen, dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine und gp130-Rezeptor-Liganden *IL-6* und *IL-11* in aus *Ptfla-Cre;LSL-Kras^{G12D};Stat3^{fl/fl}*- isolierten Pankreata deutlich niedriger war als in aus *Ptfla-Cre;LSL-Kras^{G12D}*-Mäusen gewonnenen Organen. Da Azinuszellen erwiesenermaßen eine epitheliale Quelle von Zytokinen im Rahmen einer Caerulein-induzierten Pankreatitis darstellen (Grady et al. 1997; Blinman et al. 2000; Bhatia et al. 2002), maßen die Forscher zusätzlich die Expression von *IL-6* und *IL-11* in primär

kultivierten, mit Caerulein behandelten Azini, die aus Kontroll- sowie aus Stat3-defizienten *Ptf1a-Cre;Stat3^{fl/fl}*-Mäusen isoliert wurden. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression sowohl von *IL-6* als auch von *IL-11* in den Azini, die kein p-Stat3^{Y705} bilden (Fukuda et al. 2011). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass *IL-6* und *IL-11* wiederum selbst Stat3-Zielgene darstellen (Sumimoto et al. 2006; Ernst et al. 2008), lässt sich aus den Ergebnissen von Fukuda und Kollegen rückschließen, dass Stat3 vermutlich in Form eines autokrinen Mechanismus über die Steigerung der Expression der gp130-Rezeptor-Liganden *IL-6* und *IL-11* in pankreatischen Azinuszellen selbst zur Aktivierung des Jak2/Stat3-Signalwegs im *Kras^{G12D}*-*in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese beiträgt.

Hinweise auf eine parakrine Stat3-Aktivierung in der pankreatischen Onkogenese lieferten hingegen weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In Übereinstimmung mit Fukuda und Kollegen konnten wir über die Messung der mRNA-Expression verschiedener gp130-Rezeptor-Liganden zeigen, dass *Kras^{G12D}*-Tumormodellmäuse im Vergleich zu *LSL-Kras^{G12D}*-Kontrolltieren insbesondere eine erhöhte mRNA-Expression des gp130-Rezeptor-Liganden *IL-6* aufweisen. Zudem konnte unserer Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die Stimulation primärer, aus *Kras^{G12D}*-Mäusen stammender Pankreaskarzinomzelllinien mit *IL-6* in einer starken Stat3^{Y705}-Phosphorylierung resultiert (Lesina et al. 2011). Dies beweist, dass *IL-6* tatsächlich, vermutlich eben über die Bindung an den gp130-Rezeptor, dazu in der Lage ist den Stat3-Signalweg im *Kras^{G12D}*-Mausmodell zu aktivieren.

Das Vorliegen einer Stromalen Desmoplasie stellt ein morphologisches Kerncharakteristikum des Pankreaskarzinoms dar. Die Komponenten dieses die neoplastischen Gangstrukturen umgebenden Stromas prägen in ihrer Gesamtheit ein für das Pankreaskarzinom charakteristisches, komplexes „Tumor-Mikroenvironment“. Hieran beteiligt sind unter anderem inflammatorische Zellen und Makrophagen, die Chemokine und eben Zytokine wie *IL-6* freisetzen (Algül et al. 2007b). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte im Rahmen weiterführender immunhistochemischer Evaluationen konsequenterweise, ob möglicherweise Zellen in der Umgebung der PanIN-Läsionen in *Kras^{G12D}*-Mäusen für die Produktion des Stat3-aktivierenden *IL-6* verantwortlich sind. Tatsächlich konnten wir infiltrierende Makrophagen als Quelle der *IL-6*-Expression herausstellen (Lesina et al. 2011). Dies bestätigt die Vermutung, dass die Aktivierung von Stat3 im *in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese eben nicht über zell-autonome Mechanismen, sondern über eine direkte Interaktion zwischen *Kras^{G12D}* exprimierenden

duktalen Zellen und umgebenden Makrophagen als Teil des „Tumor-Mikroenvironments“ über die Freisetzung von IL-6 erfolgt.

Die oben diskutierten Ergebnisse von Fukuda und Kollegen offenbaren, dass Stat3 wohl in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor selbst die Bildung der gp130-Rezeptor-Liganden IL-6 und IL-11 induziert und so zusätzlich zur parakrinen Stimulation einen autokrinen Mechanismus zur Aktivierung des Jak2/Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell aufrecht erhält.

Darüber hinaus verdeutlichen sowohl die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe als auch die Ergebnisse von Fukuda und Kollegen, dass Inflammation und Karzinogenese im Pankreas eng miteinander verstrickt sind.

Neben der Regulation von Apoptose und Proliferation scheint Stat3 in seiner Funktion als Induktor proinflammatorischer Mediatoren über die Etablierung einer tumor-förderlichen Entzündung zur Progression präneoplastischer Läsionen in der *Kras*^{G12D}-vermittelten pankreatischen Onkogenese beizutragen (Fukuda et al. 2011; Lesina et al. 2011). Zudem wird Stat3 selbst in onkogenes *Kras*^{G12D}-exprimierenden duktalen Zellen durch aus infiltrierenden Makrophagen stammende Zytokine aktiviert (Lesina et al. 2011). Die Makrophagen sind Bestandteil des für das Pankreaskarzinom charakteristischen „Mikroenvironments“, das sich aus unterschiedlichen Zelltypen, extrazellulären Matrixproteinen und neugebildeten Blutgefäßen zusammensetzt (Algül et al. 2007b).

Die genauere Beleuchtung der Rolle inflammatorischer Mechanismen bietet somit möglicherweise einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur weiteren Analyse des Stat3-Signalwegs im *Kras*^{G12D}-*in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese.

4. Ausblick

Die für die experimentellen Untersuchungen des Stat3-Signalwegs in dieser Arbeit verwendeten *Kras*^{G12D}-Mäuse entwickeln zeitabhängig präneoplastische Läsionen im Pankreas, die identisch zu humanen PanINs sind (Hingorani et al. 2003a). Konstitutiv aktives, phosphoryliertes STAT3-Protein konnte in humanen Pankreasadenokarzinomen detektiert werden (Scholz et al. 2003). Wir konnten zeigen, dass p-Stat3^{Y705}-Protein auch in murinen, *Kras*^{G12D}-exprimierenden PanIN-Läsionen nachweisbar ist. Zudem konnten wir Stat3 als einen essentiellen Regulator der zeitabhängigen Progression dieser PanINs im *Kras*^{G12D}-Mausmodell herausstellen. Folglich erscheint es wahrscheinlich, dass eine

abnorme Aktivierung des STAT3-Signalwegs auch in der humanen pankreatischen Onkogenese maßgeblich zur malignen Progression beiträgt.

Experimentelle Untersuchungen der letzten Jahre führten zur Entwicklung diverser molekularer Stat3-Inhibitoren. Diese kleinen Moleküle blockieren die Stat3-abhängige Signaltransduktion beispielsweise auf der Ebene der Stat3-Dimerisierung (Siddiquee et al. 2007), der Stat3-Phosphorylierung (Lin et al. 2010a) oder über die Inhibition von Jak2 (Hedvat et al. 2009). Zahlreiche andere selektive Kinase-Inhibitoren werden bereits zur effizienteren Behandlung bestimmter Krebserkrankungen, die auf konventionelle Behandlungsstrategien nur gering ansprechen, eingesetzt (McDermott et al. 2009). Auch die in der Regel frustrane Behandlung des Pankreasadenokarzinoms könnte über die Identifikation von Patienten, deren Tumorzellen konstitutiv aktives STAT3-Protein exprimieren, mit Hilfe der beschriebenen STAT3-Inhibitoren im Sinne einer personalisierten Krebstherapie möglicherweise deutlich verbessert werden. Die Beleuchtung des STAT3-Signalwegs als spezifischen und vielversprechenden Ansatzpunkt hin zu einer verbesserten Therapie des hochaggressiven Pankreasadenokarzinoms sollte daher das Ziel weiterführender klinischer Untersuchungen sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Pankreaskarzinom belegt in der Liste der tumorbedingten Todesursachen in der westlichen Welt Platz vier (Jemal et al. 2010). Bedingt durch späte Diagnosestellung, frühe Metastasierung und mangelnde therapeutische Optionen ist die Prognose des Pankreaskarzinoms mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5 % ausgesprochen schlecht (Hidalgo 2010).

Auf histopathologischer und molekulargenetischer Ebene wurde ein definiertes Progressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms entwickelt. Hiernach entsteht das invasive Karzinom auf dem Boden spezifischer, präneoplastischer Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs), die in die Stadien 1-3 eingeteilt werden. Mit steigendem Stadium nehmen die zellulären und architektonischen Atypien im Bereich der duktales Strukturen zu. Parallel dazu lassen sich den einzelnen PanIN-Läsionen auch bestimmte Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgen zuweisen (Hruban 2000).

Unter Anwendung der Cre/loxP-Technologie entwickelten die Forscher David Tuveson und Tyler Jacks ein Mausmodell, in dem über die pankreasspezifische Etablierung einer aktivierenden G12D-Mutation des Exons 1 des *Kras*-Onkogens das komplette PanIN-Spektrum in der Maus rekapituliert werden kann (Hingorani et al. 2003a). Spezifische Signalwege, die die *Kras*^{G12D}-vermittelte PanIN-Progression vorantreiben, sind bisher weitgehend unbekannt.

Das Protein Stat3 fungiert auf zellulärer Ebene als wichtiger transkriptioneller Regulator von Genen, deren zugehörige Proteine in fundamentale biologische Zellprozesse, wie Apoptose, Proliferation, Inflammation und Angiogenese, involviert sind. Eine konstitutive Aktivität des STAT3-Signalwegs, wie sie bereits in zahlreichen humanen Tumoren nachgewiesen werden konnte, erhöht das Risiko einer zellulären Entartung über eine Dysregulation dieser Zellprozesse (Yu et al. 2004; Groner et al. 2008). Auch in humanen Pankreaskarzinomzelllinien und -geweben wurde eine abnorme STAT3-Aktivität dokumentiert (Scholz et al. 2003; Hutzen et al. 2009). Die genaue Funktion des Stat3-Signalwegs in der pankreatischen Onkogenese wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst zu prüfen, ob der Stat3-Signalweg auch im murinen *Kras*^{G12D}-*in-vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese aktiv ist. Protein- und immunhistochemisch konnten wir potentiell transkriptionell aktives, phosphoryliertes

Stat3-Protein sowie Stat3-abhängige Zielproteine in PanIN-Läsionen von *Kras*^{G12D}-Mäusen nachweisen.

Um den Einfluss dieser Stat3-Aktivität auf die *Kras*^{G12D}-vermittelte PanIN-Progression beurteilen zu können, etablierten wir mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems eine pankreasspezifische Deletion des für den Tyrosinrest 705 des Stat3-Moleküls kodierenden Exons 21 des *Stat3*-Gens. In der resultierenden *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Maus wird so die Bildung von p-Stat3^{Y705} im exokrinen und in Teilen des endokrinen Pankreas verhindert und damit die Stat3-abhängige Signaltransduktion inaktiviert.

Die Inaktivierung des Stat3-Signalwegs hat keinen Einfluss auf Morphologie und Physiologie des exokrinen und endokrinen Pankreas. Auch beeinträchtigt die Stat3-Defizienz nicht die Ausprägung der pankreasspezifischen, onkogenen *Kras*^{G12D}-Mutation in *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Tieren.

Morphologische und biochemische Analysen des Pankreas Stat3-defizienter *Kras*^{G12D};*Stat3*^{Δpanc}-Mäuse im Vergleich zu *Kras*^{G12D}-Kontrolltieren offenbaren eine deutliche Verzögerung der für das *Kras*^{G12D}-Mausmodell typischen, altersabhängigen PanIN-Progression. Die grundsätzliche Initiierung präneoplastischer Läsionen im Pankreas kann durch die Inaktivierung der Stat3-abhängigen Signaltransduktion jedoch nicht verhindert werden.

Stat3 stellt somit offensichtlich einen essentiellen Regulator der Progression präneoplastischer Läsionen im murinen in-vivo-Modell der pankreatischen Onkogenese dar.

Da die in *Kras*^{G12D}-Mäusen detektierbaren PanIN-Läsionen identisch mit humanen PanINs sind, erscheint es wahrscheinlich, dass eine abnorme Aktivierung des STAT3-Signalwegs auch in der humanen Pankreaskarzinogenese maßgeblich zur Progression präneoplastischer Läsionen beiträgt.

Der STAT3-Signalwegs stellt somit möglicherweise einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der bisher weitestgehend frustrierten Therapie des Pankreaskarzinoms dar und sollte im Rahmen klinischer Studien weiter beleuchtet werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Aaronson D. S., Horvath C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. Science **296**, 1653-5.

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**, 3112-26.

Algül H., Treiber M., Lesina M., Schmid R. M. (2007b). Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas--a potential role for pancreatic stellate cells? Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **4**, 454-62.

Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N., Perucho M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell **53**, 549-54.

Aoki Y., Feldman G. M., Tosato G. (2003). Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. Blood **101**, 1535-42.

Bardeesy N., DePinho R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. Nat Rev Cancer **2**, 897-909.

Becker S., Groner B., Muller C. W. (1998). Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. Nature **394**, 145-51.

Bhatia M., Brady M., Kang Y. K., Costello E., Newton D. J., Christmas S. E., Neoptolemos J. P., Slavin J. (2002). MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **282**, G77-85.

Blinman T. A., Gukovsky I., Mouria M., Zaninovic V., Livingston E., Pandol S. J., Gukovskaya A. S. (2000). Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. Am J Physiol Cell Physiol **279**, C1993-2003.

Bos J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res **49**, 4682-9.

Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. (2000). STATs in oncogenesis. Oncogene **19**, 2474-88.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**, 248-54.

Bromberg J., Darnell J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. Oncogene **19**, 2468-73.

Bromberg J. F., Wrzeszczynska M. H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R. G., Albanese C., Darnell J. E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. Cell **98**, 295-303.

- Buettner R., Mora L. B., Jove R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. Clin Cancer Res **8**, 945-54.
- Burriss H. A., 3rd, Moore M. J., Andersen J., Green M. R., Rothenberg M. L., Modiano M. R., Cripps M. C., Portenoy R. K., Storniolo A. M., Tarassoff P., Nelson R., Dorr F. A., Stephens C. D., Von Hoff D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol **15**, 2403-13.
- Campbell S. L., Khosravi-Far R., Rossman K. L., Clark G. J., Der C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene **17**, 1395-413.
- Catlett-Falcone R., Landowski T. H., Oshiro M. M., Turkson J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernandez-Luna J. L., Nunez G., Dalton W. S., Jove R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity **10**, 105-15.
- Coffer P. J., Koenderman L., de Groot R. P. (2000). The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. Oncogene **19**, 2511-22.
- Corcoran R. B., Contino G., Deshpande V., Tzatsos A., Conrad C., Benes C. H., Levy D. E., Settleman J., Engelman J. A., Bardeesy N. (2011). STAT3 Plays a Critical Role in KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. Cancer Res,
- Cui Y., Huang L., Eleftheriou F., Yang G., Shelton J. M., Giles J. E., Oz O. K., Pourbahrami T., Lu C. Y., Richardson J. A., Karsenty G., Li C. (2004). Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. Mol Cell Biol **24**, 258-69.
- Curran S., Murray G. I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol **189**, 300-8.
- Dalwadi H., Krysan K., Heuze-Vourc'h N., Dohadwala M., Elashoff D., Sharma S., Cacalano N., Lichtenstein A., Dubinett S. (2005). Cyclooxygenase-2-dependent activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-6 in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res **11**, 7674-82.
- Ebrahimi B., Tucker S. L., Li D., Abbruzzese J. L., Kurzrock R. (2004). Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. Cancer **101**, 2727-36.
- Ernst M., Najdovska M., Grail D., Lundgren-May T., Buchert M., Tye H., Matthews V. B., Armes J., Bhathal P. S., Hughes N. R., Marcusson E. G., Karras J. G., Na S., Sedgwick J. D., Hertzog P. J., Jenkins B. J. (2008). STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. J Clin Invest **118**, 1727-38.
- Feldmann G., Beaty R., Hruban R. H., Maitra A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. J Hepatobiliary Pancreat Surg **14**, 224-32.
- Fornek J. L., Tygrett L. T., Waldschmidt T. J., Poli V., Rickert R. C., Kansas G. S. (2006). Critical role for Stat3 in T-dependent terminal differentiation of IgG B cells. Blood **107**, 1085-91.

- Fukuda A., Wang S. C., Morris J. P. t., Folias A. E., Liou A., Kim G. E., Akira S., Boucher K. M., Firpo M. A., Mulvihill S. J., Hebrok M. (2011). Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. Cancer Cell **19**, 441-55.
- Garcia R., Bowman T. L., Niu G., Yu H., Minton S., Muro-Cacho C. A., Cox C. E., Falcone R., Fairclough R., Parsons S., Laudano A., Gazit A., Levitzki A., Kraker A., Jove R. (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. Oncogene **20**, 2499-513.
- Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E., Kroemer G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. Cell Cycle **5**, 2592-601.
- Glienke W., Maute L., Wicht J., Bergmann L. (2010). Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. Cancer Invest **28**, 166-71.
- Gorogawa S., Fujitani Y., Kaneto H., Hazama Y., Watada H., Miyamoto Y., Takeda K., Akira S., Magnuson M. A., Yamasaki Y., Kajimoto Y., Hori M. (2004). Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. Biochem Biophys Res Commun **319**, 1159-70.
- Grady T., Liang P., Ernst S. A., Logsdon C. D. (1997). Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. Gastroenterology **113**, 1966-75.
- Gritsko T., Williams A., Turkson J., Kaneko S., Bowman T., Huang M., Nam S., Eweis I., Diaz N., Sullivan D., Yoder S., Enkemann S., Eschrich S., Lee J. H., Beam C. A., Cheng J., Minton S., Muro-Cacho C. A., Jove R. (2006). Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. Clin Cancer Res **12**, 11-9.
- Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. Cell **140**, 883-99.
- Groner B., Lucks P., Borghouts C. (2008). The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. Semin Cell Dev Biol **19**, 341-50.
- Gu H., Marth J. D., Orban P. C., Mossmann H., Rajewsky K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science **265**, 103-6.
- Guerra C., Schuhmacher A. J., Canamero M., Grippo P. J., Verdaguer L., Perez-Gallego L., Dubus P., Sandgren E. P., Barbacid M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. Cancer Cell **11**, 291-302.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell **144**, 646-74.
- Haura E. B., Turkson J., Jove R. (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. Nat Clin Pract Oncol **2**, 315-24.

- Hedvat M., Huszar D., Herrmann A., Gozgit J. M., Schroeder A., Sheehy A., Buettner R., Proia D., Kowolik C. M., Xin H., Armstrong B., Beberitz G., Weng S., Wang L., Ye M., McEachern K., Chen H., Morosini D., Bell K., Alimzhanov M., Ioannidis S., McCoon P., Cao Z. A., Yu H., Jove R., Zinda M. (2009). The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. Cancer Cell **16**, 487-97.
- Heinrich P. C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J **334 (Pt 2)**, 297-314.
- 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**, 1218-49.
- Hidalgo M. (2010). Pancreatic cancer. N Engl J Med **362**, 1605-17.
- 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. (2003a). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell **4**, 437-50.
- Hingorani S. R., Tuveson D. A. (2003b). Ras redux: rethinking how and where Ras acts. Curr Opin Genet Dev **13**, 6-13.
- 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**, 469-83.
- Hruban R. H., Adsay N. V., Albores-Saavedra J., Anver M. R., Biankin A. V., Boivin G. P., Furth E. E., Furukawa T., Klein A., Klimstra D. S., Kloppel G., Lauwers G. Y., Longnecker D. S., Luttges J., Maitra A., Offerhaus G. J., Perez-Gallego L., Redston M., Tuveson D. A. (2006). Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. Cancer Res **66**, 95-106.
- Hruban R. H., Goggins M., Parsons J., Kern S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. Clin.Cancer Res. **6**, 2969-2972.
- Hruban R. H., Takaori K., Klimstra D. S., Adsay N. V., Albores-Saavedra J., Biankin A. V., Biankin S. A., Compton C., Fukushima N., Furukawa T., Goggins M., Kato Y., Kloppel G., Longnecker D. S., Luttges J., Maitra A., Offerhaus G. J., Shimizu M., Yonezawa S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. Am J Surg Pathol **28**, 977-87.
- Hruban R. H., van Mansfeld A. D., Offerhaus G. J., van Weering D. H., Allison D. C., Goodman S. N., Kensler T. W., Bose K. K., Cameron J. L., Bos J. L. (1993). K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. Am J Pathol **143**, 545-54.

- Hutzen B., Friedman L., Sobo M., Lin L., Cen L., De Angelis S., Yamakoshi H., Shibata H., Iwabuchi Y., Lin J. (2009). Curcumin analogue GO-Y030 inhibits STAT3 activity and cell growth in breast and pancreatic carcinomas. Int J Oncol **35**, 867-72.
- 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**, 3243-8.
- Jego G., Hazoume A., Seigneuric R., Garrido C. (2010). Targeting heat shock proteins in cancer. Cancer Lett,
- Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. (2010). Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin **60**, 277-300.
- Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature **371**, 606-9.
- Kanda N., Seno H., Konda Y., Marusawa H., Kanai M., Nakajima T., Kawashima T., Nanakin A., Sawabu T., Uenoyama Y., Sekikawa A., Kawada M., Suzuki K., Kayahara T., Fukui H., Sawada M., Chiba T. (2004). STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. Oncogene **23**, 4921-9.
- 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**, 128-34.
- Kawesha A., Ghaneh P., Andren-Sandberg A., Ograed D., Skar R., Dawiskiba S., Evans J. D., Campbell F., Lemoine N., Neoptolemos J. P. (2000). K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16(INK4A), p21(WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. Int J Cancer **89**, 469-74.
- Kim J. K., Diehl J. A. (2009). Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. J Cell Physiol **220**, 292-6.
- Kim S. K., MacDonald R. J. (2002). Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. Curr Opin Genet Dev **12**, 540-7.
- Knudsen K. E., Diehl J. A., Haiman C. A., Knudsen E. S. (2006). Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. Oncogene **25**, 1620-8.
- Kostromina E., Gustavsson N., Wang X., Lim C. Y., Radda G. K., Li C., Han W. (2010). Glucose intolerance and impaired insulin secretion in pancreas-specific signal transducer and activator of transcription-3 knockout mice are associated with microvascular alterations in the pancreas. Endocrinology **151**, 2050-9.
- Krapp A., Knofler M., Ledermann B., Burki K., Berney C., Zoerkler N., Hagenbuchle O., Wellauer P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. Genes Dev **12**, 3752-63.

- Kubo M., Hanada T., Yoshimura A. (2003). Suppressors of cytokine signaling and immunity. Nat Immunol **4**, 1169-76.
- Lang G. A., Iwakuma T., Suh Y. A., Liu G., Rao V. A., Parant J. M., Valentin-Vega Y. A., Terzian T., Caldwell L. C., Strong L. C., El-Naggar A. K., Lozano G. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. Cell **119**, 861-72.
- Lee J. Y., Hennighausen L. (2005). The transcription factor Stat3 is dispensable for pancreatic beta-cell development and function. Biochem Biophys Res Commun **334**, 764-8.
- Leonard W. J., O'Shea J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol **16**, 293-322.
- Lesina M., Kurkowski M. U., Ludes K., Rose-John S., Treiber M., Kloppel G., Yoshimura A., Reindl W., Sipos B., Akira S., Schmid R. M., Algül H. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. Cancer Cell **19**, 456-69.
- Levy D. E., Darnell J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol **3**, 651-62.
- Lin L., Hutzen B., Li P. K., Ball S., Zuo M., DeAngelis S., Foust E., Sobo M., Friedman L., Bhasin D., Cen L., Li C., Lin J. (2010a). A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells. Neoplasia **12**, 39-50.
- Lin L., Hutzen B., Zuo M., Ball S., Deangelis S., Foust E., Pandit B., Ihnat M. A., Shenoy S. S., Kulp S., Li P. K., Li C., Fuchs J., Lin J. (2010b). Novel STAT3 phosphorylation inhibitors exhibit potent growth-suppressive activity in pancreatic and breast cancer cells. Cancer Res **70**, 2445-54.
- 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**, 17-23.
- Lou W., Ni Z., Dyer K., Tweardy D. J., Gao A. C. (2000). Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway. Prostate **42**, 239-42.
- Lowe S. W., Sherr C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. Curr Opin Genet Dev **13**, 77-83.
- Lowenfels A. B., Maisonneuve P. (2006). Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**, 197-209.
- Madamanchi N. R., Li S., Patterson C., Runge M. S. (2001). Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway. J Biol Chem **276**, 18915-24.
- Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. (2008). Cancer-related inflammation. Nature **454**, 436-44.

- McDermott U., Settleman J. (2009). Personalized cancer therapy with selective kinase inhibitors: an emerging paradigm in medical oncology. J Clin Oncol **27**, 5650-9.
- Metzger D., Feil R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. Curr Opin Biotechnol **10**, 470-6.
- Mora L. B., Buettner R., Seigne J., Diaz J., Ahmad N., Garcia R., Bowman T., Falcone R., Fairclough R., Cantor A., Muro-Cacho C., Livingston S., Karras J., Pow-Sang J., Jove R. (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. Cancer Res **62**, 6659-66.
- Moses M. A. (1997). The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Stem Cells **15**, 180-9.
- Nagy A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genesis **26**, 99-109.
- Nakhai H., Sel S., Favor J., Mendoza-Torres L., Paulsen F., Duncker G. I., Schmid R. M. (2007). Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. Development **134**, 1151-60.
- Niu G., Bowman T., Huang M., Shivers S., Reintgen D., Daud A., Chang A., Kraker A., Jove R., Yu H. (2002). Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. Oncogene **21**, 7001-10.
- Offield M. F., Jetton T. L., Labosky P. A., Ray M., Stein R. W., Magnuson M. A., Hogan B. L., Wright C. V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. Development **122**, 983-95.
- Postic C., Shiota M., Niswender K. D., Jetton T. L., Chen Y., Moates J. M., Shelton K. D., Lindner J., Cherrington A. D., Magnuson M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. J Biol Chem **274**, 305-15.
- Redston M. S., Caldas C., Seymour A. B., Hruban R. H., da Costa L., Yeo C. J., Kern S. E. (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. Cancer Res **54**, 3025-33.
- Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S. A., Panzer S., Zahurak M., Goodman S. N., Sohn T. A., Hruban R. H., Yeo C. J., Kern S. E. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. Cancer Res **57**, 1731-4.
- Sano S., Itami S., Takeda K., Tarutani M., Yamaguchi Y., Miura H., Yoshikawa K., Akira S., Takeda J. (1999). Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. The EMBO Journal **18**, No. 17, 4657-4668.
- Sartor C. I., Dziubinski M. L., Yu C. L., Jove R., Ethier S. P. (1997). Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. Cancer Res **57**, 978-87.

- Sauer B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. Methods **14**, 381-92.
- Sauer B., Henderson N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A **85**, 5166-70.
- Schindler C., Levy D. E., Decker T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. J Biol Chem **282**, 20059-63.
- Schneider G., Schmid R. M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. Mol Cancer **2**, 15.
- Scholz A., Heinze S., Detjen K. M., Peters M., Welzel M., Hauff P., Schirner M., Wiedenmann B., Rosewicz S. (2003). Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. Gastroenterology **125**, 891-905.
- Schweizer U., Gunnensen J., Karch C., Wiese S., Holtmann B., Takeda K., Akira S., Sendtner M. (2002). Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. J Cell Biol **156**, 287-97.
- Shaib Y., Davila J., Naumann C., El-Serag H. (2007). The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study. Am J Gastroenterol **102**, 1377-82.
- Shi C., Hruban R. H., Klein A. P. (2009). Familial pancreatic cancer. Arch Pathol Lab Med **133**, 365-74.
- Shuai K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. Oncogene **19**, 2638-44.
- Siddiquee K., Zhang S., Guida W. C., Blaskovich M. A., Greedy B., Lawrence H. R., Yip M. L., Jove R., McLaughlin M. M., Lawrence N. J., Sebt S. M., Turkson J. (2007). Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A **104**, 7391-6.
- Sinibaldi D., Wharton W., Turkson J., Bowman T., Pledger W. J., Jove R. (2000). Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. Oncogene **19**, 5419-27.
- Smit V. T., Boot A. J., Smits A. M., Fleuren G. J., Cornelisse C. J., Bos J. L. (1988). KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. Nucleic Acids Res **16**, 7773-82.
- Song J. I., Grandis J. R. (2000). STAT signaling in head and neck cancer. Oncogene **19**, 2489-95.
- Sumimoto H., Imabayashi F., Iwata T., Kawakami Y. (2006). The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. J Exp Med **203**, 1651-6.

- Takeda K., Clausen B. E., Kaisho T., Tsujimura T., Terada N., Forster I., Akira S. (1999). Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity **10**, 39-49.
- Takeda K., Kaisho T., Yoshida N., Takeda J., Kishimoto T., Akira S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. J Immunol **161**, 4652-60.
- Takeda K., Noguchi K., Shi W., Tanaka T., Matsumoto M., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. Proc Natl Acad Sci U S A **94**, 3801-4.
- Talar-Wojnarowska R., Gasiorowska A., Smolarz B., Romanowicz-Makowska H., Kulig A., Malecka-Panas E. (2009). Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) gene polymorphism and IL-6 serum level in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. Dig Dis Sci **54**, 683-9.
- Trevino J. G., Gray M. J., Nawrocki S. T., Summy J. M., Lesslie D. P., Evans D. B., Sawyer T. K., Shakespeare W. C., Watowich S. S., Chiao P. J., McConkey D. J., Gallick G. E. (2006). Src activation of Stat3 is an independent requirement from NF-kappaB activation for constitutive IL-8 expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. Angiogenesis **9**, 101-10.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000). Surfing the p53 network. Nature **408**, 307-10.
- Warshaw A. L., Fernandez-del Castillo C. (1992). Pancreatic carcinoma. N Engl J Med **326**, 455-65.
- Weber-Nordt R. M., Egen C., Wehinger J., Ludwig W., Gouilleux-Gruart V., Mertelsmann R., Finke J. (1996). Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. Blood **88**, 809-16.
- Xi S., Zhang Q., Dyer K. F., Lerner E. C., Smithgall T. E., Gooding W. E., Kamens J., Grandis J. R. (2003). Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Biol Chem **278**, 31574-83.
- Xie T. X., Wei D., Liu M., Gao A. C., Ali-Osman F., Sawaya R., Huang S. (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. Oncogene **23**, 3550-60.
- Yeo T. P., Hruban R. H., Leach S. D., Wilentz R. E., Sohn T. A., Kern S. E., Iacobuzio-Donahue C. A., Maitra A., Goggins M., Canto M. I., Abrams R. A., Laheru D., Jaffee E. M., Hidalgo M., Yeo C. J. (2002). Pancreatic cancer. Curr Probl Cancer **26**, 176-275.
- Yu H., Jove R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. Nat Rev Cancer **4**, 97-105.
- Yu H., Pardoll D., Jove R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nat Rev Cancer **9**, 798-809.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<u>Abbildung 1:</u> Morphologisches Progressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms.	3
Abbildung 2: Progressionsmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms mit Darstellung der genetischen Alterationen.	4
<u>Abbildung 3:</u> Gewebespezifische Gendeletion in der Maus mit Hilfe des Cre/loxP-Systems.	7
<u>Abbildung 4:</u> Schematische Darstellung der Generierung der <i>Kras</i> ^{G12D} -Linie.	9
<u>Abbildung 5:</u> Domänenstruktur des Stat3-Moleküls.	10
<u>Abbildung 6:</u> Schematische Darstellung des IL-6/gp130/STAT3/SOCS3-Signalwegs.	12
<u>Abbildung 7:</u> Schematische Darstellung der Generierung der <i>Stat3</i> ^{Δpanc} -Linie.	29
<u>Abbildung 8:</u> PCR-Analysen der genetisch modifizierten Allele in den aus der Kreuzung von <i>Stat3</i> ^{Flox/Flox} - und <i>Ptfla-cre</i> ^{ex1} -Mäusen hervorgehenden Nachkommen.	30
<u>Abbildung 9:</u> Nachweis der fehlenden Expression des Tyrosinrests 705 des Stat3-Proteins im Pankreas.	31
<u>Abbildung 10:</u> Charakterisierung des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments.	33
<u>Abbildung 11:</u> Nachweis der Aktivierung des Stat3-Signalwegs im <i>Kras</i> ^{G12D} -Mausmodell.	36
<u>Abbildung 12:</u> Biochemische und morphologische Charakterisierung Stat3-defizienter <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat3</i> ^{Δpanc} -Mäuse im Vergleich zur <i>Kras</i> ^{G12D} -Kontrolltieren.	41
<u>Abbildung 13:</u> Morphologische Charakterisierung der PanIN-Läsionen in Stat3-defizienten <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat3</i> ^{Δpanc} -Mäusen im Vergleich zu <i>Kras</i> ^{G12D} -Kontrolltieren.	45
<u>Abbildung 14:</u> Quantitative Auswertung der PanIN-Läsionen in Stat3-defizienten <i>Kras</i> ^{G12D} ; <i>Stat3</i> ^{Δpanc} -Mäusen im Vergleich zu <i>Kras</i> ^{G12D} -Kontrolltieren.	47

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tabelle 1:</u> Geräte und Hilfsmittel.	15
<u>Tabelle 2:</u> Chemikalien.	16
<u>Tabelle 3:</u> Kommerziell erhältliche Kits.	16
<u>Tabelle 4:</u> Puffer und Lösungen.	18
<u>Tabelle 5:</u> Antikörper.	19
<u>Tabelle 6:</u> Primer.	19
<u>Tabelle 7:</u> Mäuse.	19
<u>Tabelle 8:</u> Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen.	23

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Hana Algül, der mir das überaus interessante und herausfordernde Thema dieser Dissertation zur Verfügung stellte. Er ermöglichte es mir in seiner Arbeitsgruppe auf fachlich höchstem Niveau Einblicke in die medizinische Grundlagenforschung zu erhalten. Herr PD Dr. med. Hana Algül stand mir dabei stets mit uneingeschränktem Engagement sowohl während der experimentellen Arbeitsphase im Labor als auch beim Anfertigen dieses Manuskripts zur Seite. Seine konstruktive und verlässliche Kritik waren für das Fertigstellen der Dissertation unerlässlich. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. R.M. Schmid danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Frau Marina Lesina und Frau Karen Dlubatz danke ich dafür, dass sie mich mit höchster fachlicher Kompetenz und Geduld in die experimentelle Arbeit im Gastroenterologischen Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik eingeführt haben und mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Allen anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Gastroenterologischen Forschungslabors sowie meine Mitdoktoranden danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern Frau Dr. med. Ibtisam und Herrn Dr. ing. Michael Ludes danke ich für ihre Liebe und Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Promotion nie möglich gewesen wären. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

Herrn Jürgen Glatz danke ich für das Korrekturlesen dieses Manuskripts und dafür, dass er es immer wieder schafft, mich aus dem Tunnel herauszuholen.