

Technische Universität München

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Roland M. Schmid)

**Die selektive Aktivierung des PI3K Signalwegs im Pankreas
induziert metastasierende duktale Adenokarzinome**

Marlena Braun

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. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dieter K.M. Saur
2. Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 27.07.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	1
1.2 Karzinogenese im Pankreas	1
1.3 Phosphatidylinositol 3 Kinasen	3
1.3.1 Rolle des PI3K Signalwegs bei der Krebsentstehung	5
1.3.2 Der PI3K Signalweg im Pankreaskarzinom	5
1.3.3 Die <i>PIK3CA</i> ^{H1047R} -Mutation	6
1.4 Mausmodelle	7
1.4.1 genetisch definierte Mausmodelle	7
1.4.2 Transgene Mausmodelle	7
1.4.3 Konditionale Rekombinationssysteme zur zeit- und ortsspezifischen Manipulation der Genexpression <i>in vivo</i>	8
1.5 Fragestellung	10
2 Materialien	11
2.1 Reagenzien	11
2.2 Enzyme	14
2.3 Lösungen und Puffer	15
2.4 Kommerziell erhältliche Reagenziensätze	17
2.5 Verbrauchsmaterialien	18
2.6 Geräte	19
2.7 Primer	21
2.8 Plasmide	24
2.9 Antikörper	25
2.10 Bakterienstämme	25
2.11 Zelllinien	25
2.12 Zellkulturreagenzien und Medien	26
2.13 Software	27
3 Methoden	28
3.1 Klonierung	28

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	28
3.1.2 Amplifikation von <i>PIK3CA</i> ^{H1047R}	28
3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA	29
3.1.4 Generierung eines Adenosinüberhangs („A-tailing“)	29
3.1.5 Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA	29
3.1.6 Klonierung in den pCR®-XL-TOPO® Vektor	30
3.1.7 Ligation	30
3.1.8 Klonasereaktion	30
3.1.9 Transformation kompetenter Bakterien	31
3.1.10 Screening-PCR zur Überprüfung der transformierten Bakterien	32
3.1.11 Plasmidpräparation	33
3.1.12 Kryokonservierung der Bakterienstämme	33
3.1.13 Restriktionsendonukleasen	33
3.1.14 Exzision der Stopp-Kassette mittels Cre-Rekombinase	34
3.2 Embryonale Stammzellen	34
3.2.1 Kultur der embryonalen Stammzellen	34
3.2.2 Vorbereitung des Targeting-Vektors	35
3.2.3 Transiente Transfektion der embryonalen Stammzellen mittels Elektroporation	36
3.2.4 Selektion und Expansion positiver homolog rekombinierter ES-Zellklone	36
3.2.5 Nachweis der homologen Rekombination der ES-Zellen mittels Screening- PCR	37
3.2.6 Isolation genomischer ES-Zell DNA	37
3.2.7 Southern Blot Analyse	38
3.2.8 Mykoplasmen-Test	40
3.2.9 Blastozysteninjektion	40
3.3 Tierexperimente	40
3.3.1 Tierhaltung und Mauslinien	40
3.3.2 Genotypisierung anhand genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien	41
3.3.3 Sektion der Mäuse mit Organ- und Probenentnahme	42
3.4 Histologie	43
3.4.1 Herstellung von Paraffin-Schnitten	43
3.4.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H&E) der Gewebe-Schnitte	43

3.4.3 Alcian blue Färbung der Gewebe-Schnitte	43
3.4.4 β -Galaktosidase Färbung von Organen und Gewebeschnitten.....	44
3.5 Zellkultur.....	44
3.5.1 Zellkulturbedingungen	44
3.5.2 Transiente Transfektion von HEK293FT-Zellen	44
3.6 Protein- und DNA-Isolation und Detektion	45
3.6.1 Protein-Isolation.....	45
3.6.2 Protein-Detektion mittels Western Blot.....	45
3.6.3 DNA-Isolation	46
3.7 Statistische Analyse	46
4 Ergebnisse	47
4.1 Klonierung von $PIK3CA^{H1047R}$ und $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ zur Generierung zweier neuer <i>Rosa26</i> -knock-in Mauslinien	47
4.1.1 Klonierung $PIK3CA^{H1047R}$ in <i>Rosa26</i> Targeting-Vektor	48
4.1.2 Klonierung $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ in <i>Rosa26</i> Targeting-Vektor	51
4.2 Überprüfung des $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ -Konstruktes <i>in vitro</i>	56
4.3 Generierung der embryonalen Stammzellen mit knock-in von $PIK3CA^{H1047R}$ und $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ im <i>Rosa26</i> Locus	58
4.4 Charakterisierung und Analyse der $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mauslinie	61
5 Diskussion.....	70
6 Zusammenfassung	76
7 Literaturverzeichnis.....	77
8 Erklärung	84
9 Curriculum vitae	85
10 Publikationsliste	86
11 Danksagung	88

Abkürzungsverzeichnis

ADM	Azinär-duktales Metaplasie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
att	attachment
aqua dest.	Destilliertes Wasser (aqua destillata)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
Cre	causes recombination
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-FCS	Fötale Kälberserum für embryonale Stammzellen
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
ES-Zellklone	Embryonale Stammzellklone
et al.	und andere (et alii)
F	Farad
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
fmol	Femtomol
g	Gramm
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-

	ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaar
KCM	Kalium-/ Calcium-/ Magnesiumchlorid
kDa	Kilodalton
KPC Modell	<i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>LSL-Trp53</i> ^{R172H/f} Modell
Kras	V-Ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
LB	lysogeny broth
LIF	Leukämie inhibierender Faktor (leukemia inhibitory factor)
loxP	locus of crossing over in P1
LSL	loxP-stop-loxP
m	Milli (10 ⁻³)
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	Multiple cloning site
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
Min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mTOR	mammalian target of rapamycin
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
n	Nano (10 ⁻⁹)
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
neo	Neomycin

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
NSG Mäuse	NOD-SCID-IL2R γ Mäuse
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierungsstelle
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDK1	Phospho-Inositid-abhängige Kinase 1
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglycerokinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3 Kinase, katalytische Untereinheit α
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
P/S	Penicillin/Streptomycin
Ptf1a/p48	Pankreastranskriptionsfaktor 1a- Untereinheit 48
R26	Rosa26-Lokus
RNA	Ribonukleinsäure
ROSA	reverse orientation splice acceptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s.	siehe
SA	Spleiß-Akzeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Sek.	Sekunden
SPF	spezifiziert Pathogenfrei
SSC	Standard Saline- Citrat- Puffer
SV40	Simian Virus 40

TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp53	transformation related protein 53
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phosphatidylinositol 3 Kinase Isoformen	4
Tabelle 2: Reagenzien	11
Tabelle 3: Enzyme	14
Tabelle 4: Lösungen und Puffer.....	15
Tabelle 5: Gele für Western Blot.....	17
Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Reagenziensätze	17
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 8: Geräte	19
Tabelle 9: Primer	21
Tabelle 10: Plasmide	24
Tabelle 11: Antikörper.....	25
Tabelle 12: Bakterienstämme	25
Tabelle 13: Zelllinien	25
Tabelle 14: Zellkulturreagenzien.....	26
Tabelle 15: Medien	26
Tabelle 16: Software.....	27
Tabelle 17: Reaktionsansatz zur Amplifikation von PIK3CA ^{H1047R}	28
Tabelle 18: PCR-Bedingungen zur Amplifikation von PIK3CA ^{H1047R}	28
Tabelle 19: Reaktionsansatz für Ligation.....	30
Tabelle 20: Reaktionsansatz für Screening-PCR	32
Tabelle 21: PCR-Bedingungen für Screening-PCR.....	32
Tabelle 22: Spezifische Reaktionsbedingungen für Screening-PCR.....	32
Tabelle 23: Reaktionsansatz für Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	34
Tabelle 24: Reaktionsansatz für Screening-PCR der ES-Zellklone.....	37
Tabelle 25: Reaktionsbedingungen für Screening-PCR der ES-Zellklone	37
Tabelle 26: Sonden für Southern Blot.....	39
Tabelle 27: Waschzeiten und -puffer für Southern Blot Membran nach Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.....	39
Tabelle 28: Spezifische Reaktionsbedingungen für Genotypisierungs-PCRs	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologisch-genetisches Progressionsmodell von PanINs zum Adenokarzinom des Pankreas.....	3
Abbildung 2: 1. Klonierungsschritt: Einklonierung von PIK3CA ^{H1047R} in pCR-XL-TOPO®.....	48
Abbildung 3: 2. Klonierungsschritt: Ligation von PIK3CA ^{H1047R} mit pENTR-LSL nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease PfoI	49
Abbildung 4: 3. Klonierungsschritt: Klonasereaktion von LSL-PIK3CA ^{H1047R} in Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA	50
Abbildung 5: 1. Klonierungsschritt: Ligation von PIK3CA ^{H1047R} mit pCR®-Blunt II-TOPO®.....	51
Abbildung 6: 2. Klonierungsschritt: Verdau von pCR®-Blunt II-TOPO®-PIK3CA ^{H1047R} mit der Restriktionsendonuklease PspOMI und anschließende Religation.....	52
Abbildung 7: 3. Klonierungsschritt: Ligation von PIK3CA ^{H1047R} mit pBluescript-ER ^{T2} nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen ApaI und XhoI	53
Abbildung 8: 4. Klonierungsschritt: Ligation von PIK3CA ^{H1047R-ERT2} mit pENTR-LSL nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease PfoI.....	54
Abbildung 9: 5. Klonierungsschritt: Klonasereaktion von LSL-PIK3CA ^{H1047R-ERT2} in Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA.....	55
Abbildung 10: Exzision der loxP-flankierten Stopp-Kassette mittels Cre-Rekombinase	56
Abbildung 11: Klonasereaktion von PIK3CA ^{H1047R-ERT2} in pcDNA3.2/V5-DEST	57
Abbildung 12: Western Blot-Analyse von phospho-AKT (pAKT) von HEK293FT-Zellen nach transienter Transfektion mit pcDNA3.2/V5-DEST-PIK3CA ^{H1047R-ERT2}	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung des gezielt genetisch veränderten Rosa26 Locus mit loxP-Stop-loxP-PIK3CA ^{H1047R} Expressionskassette.....	59
Abbildung 14: Southern Blot-Analyse von DNA aus embryonalen Wildtyp-Stammzellen (WT) und gezielt genetisch veränderten embryonalen Stammzellen.....	60
Abbildung 15: Pankreasspezifische Cre-Rekombination führt zur Expression von PIK3CA ^{H1047R}	62

Abbildung 16: Genotypisierungs-Strategie für LSL-PIK3CA ^{H1047R} Mäuse mittels Screen auf Homo-/Heterozygotie bei intakter Stopp-Kassette	63
Abbildung 17: Genetische Strategie zur Analyse der Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-R26 ^{lacZ/+} Mäuse	63
Abbildung 18: PCR zur Analyse des Rekombinationserfolgs bei Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL- PIK3CA ^{H1047R/+} Mäusen	64
Abbildung 19: Analyse der pankreasspezifischen Deletion der Stopp-Kassette bei Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-PIK3CA ^{H1047R/+} Mäusen	64
Abbildung 20: Western Blot-Analyse der p110 α Expression im Pankreas	65
Abbildung 21: Repräsentative Bilder und Gewicht der Pankreata von Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL- PIK3CA ^{H1047R/+} Mäusen im Vergleich zu Pankreata von Kontrolltieren und Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} Mäusen	66
Abbildung 22: Histologische Analyse der Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-PIK3CA ^{H1047R/+} Maus	67
Abbildung 23: Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-PIK3CA ^{H1047R/+} Mäuse entwickeln metastasierende PDACs	68
Abbildung 24: Kaplan-Meier Überlebenskurven von PIK3CA ^{H1047R/+} Mäusen, Kras ^{G12D/+} Mäusen und Kontrolltieren	68
Abbildung 25: Repräsentative Bilder von H&E gefärbten histologischen Schnitten von PDACs von Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-PIK3CA ^{H1047R/+} Mäusen (PIK3CA ^{H1047R/+}) oder Ptf1a ^{Cre/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} Mäusen (Kras ^{G12D/+}) und resezierten humanen PDAC-Proben	69

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das duktale Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Krebs assoziierte Todesursache in der westlichen Welt dar (Siegel et al., 2012). In Deutschland erkranken jährlich etwa 16.000 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs, was 3,2 bzw. 3,6% aller Krebsneuerkrankungen entspricht (Kaatsch, 2013). Bedingt durch die extrem hohe Letalitätsrate gehört das Pankreaskarzinom zu den tödlichsten Tumorerkrankungen und ist für 6 - 7% aller Krebstodesfälle in der westlichen Welt verantwortlich (Siegel et al., 2012; Vincent et al., 2011). Die Erkrankungsrate in Deutschland liegt bei 10-13,8 /100.000 Personen bei einer Sterberate von 9,4-12,9/100.000 (Kaatsch, 2013). Die 5-Jahres-Überlebensrate über alle Stadien liegt bei <5%. Einer Studie zufolge, die die Daten des finnischen Krebsregisters reevaluierte überlebten weniger als 1% die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung (Carpelan-Holmstrom et al., 2005).

Einer der Gründe für die extrem schlechte Prognose ist die oftmals sehr späte Diagnosestellung in bereits metastasiertem Zustand. Durch das Fehlen von frühen spezifischen Symptomen, fehlenden Früherkennungsmaßnahmen, die retroperitoneale Lage des Pankreas und die geringe Größe der Vorläuferstadien wird das Pankreaskarzinom in 80-85% erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem keine operative Therapie mehr möglich ist (Vincent et al., 2011).

Zudem ist das Ansprechen des Pankreaskarzinoms auf konventionelle Chemotherapie und Bestrahlung extrem schlecht. Das mediane Überleben bei Patienten mit metastasiertem Tumorstadium unter Chemotherapie mit FOLFIRINOX (Folinsäure/5-FU/Irinotecan/Oxaliplatin) konnte von 6,8 auf 11,1 Monate angehoben werden (Conroy et al., 2011). Um die Therapie und Prognose des Pankreaskarzinoms verbessern zu können, sind neben einer früheren Diagnosestellung dringend neue Therapiekonzepte von Nöten. Daher ist es essentiell die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung des Pankreaskarzinoms führen im Detail zu verstehen.

1.2 Karzinogenese im Pankreas

Unter den Tumoren der Bauchspeicheldrüse stellt das duktale Adenokarzinom (PDAC) mit >85% die größte Entität dar, das sich durch ein infiltratives lokales Wachstum und häufige Metastasierung, vor allem in Leber und Lunge, sowie eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion auszeichnet (Hezel et al., 2006). In nahezu

allen humanen PDACs finden sich onkogene *KRAS* Mutationen und es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass eine Mutation im *KRAS*-Gen als Auslöser für die Karzinomentstehung im Pankreas gesehen werden kann (Hidalgo, 2010; Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010). Hiervon ausgehend kommt es zu einer Reihe von genetischen und in der Folge histologischen Veränderungen im Pankreas, wie der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) und prämaligen Vorläuferstadien, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und schließlich zum invasiven Karzinom. Mittels Pyrosequencing-Analysen konnte gezeigt werden, dass verschiedene *KRAS*-Mutationen bereits in 96,4% aller PanINs zu finden sind (Kanda et al., 2012). So findet sich eine *KRAS*-Mutation im Codon 12 in 92% der PanIN-1A und mit weiter zunehmender Häufigkeit in PanIN-1B, PanIN-2 und PanIN-3 mit 92,3%, 93,3% bzw. 95,4% (Kanda et al., 2012).

Parallel zum zunehmendem Grad der Dysplasie kommt es zu einer Akkumulation von Mutationen, mit Inaktivierung der Tumor-Suppressorgene *CDKN2A* (das u.a. für p16/Ink4a codiert), *TP53*, *BRCA2* und *DPC4* (*SMAD4*) (Hidalgo, 2010; Yeo et al., 2002).

Die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien werden nach zunehmendem Grad der zellulären Atypie in verschiedene Stadien unterteilt. Beginnend mit PanIN-1A, wo sich große columnare Zellen mit basal lokalisiertem Nukleus mit reichlich Muzin finden lassen und PanIN-1B bei denen sich zunehmend eine papilläre oder basal pseudostratifizierte Architektur zeigt, aber keine nukleäre Atypie. Bei PanIN-2 finden sich moderate nukleäre Atypien, wie Verlust der zellulären Polarität, vergrößerte Nuklei und hyperchromatische Kerne. PanIN-3 repräsentieren ein Carcinoma in situ mit deutlicher Atypie mit Verlust der Kernpolarität, dystrophen Becherzellen und abnormalen Mitosen, sie weisen papilläre oder mikropapilläre Läsionen auf, ein sog. Budding off (Abschnürung kleiner epithelialer Zellverbände in das Lumen) und luminal Nekrosen (siehe Abbildung 1). (Hruban et al., 2001; Tuveson et al., 2005)

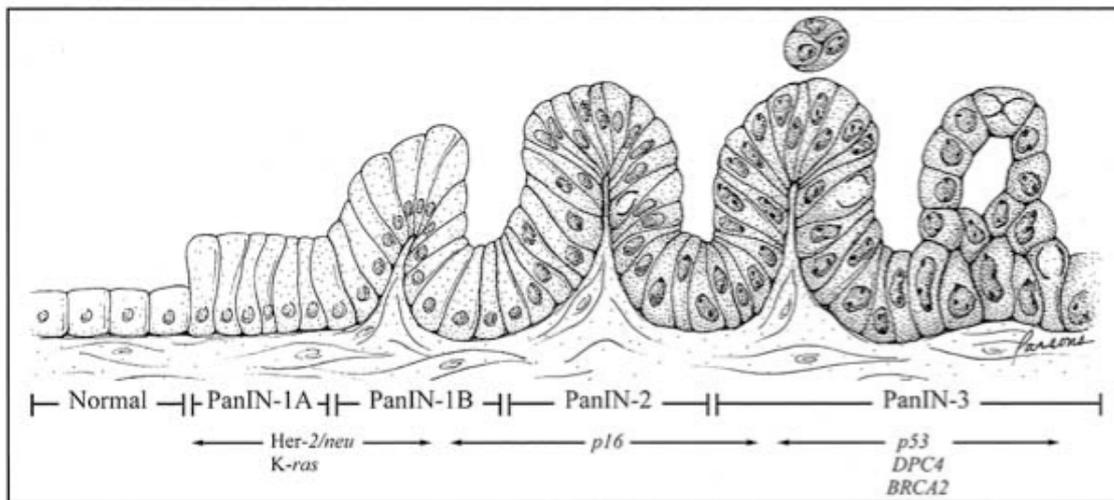


Abbildung 1: Histologisch-genetisches Progressionsmodell von PanINs zum Adenokarzinom des Pankreas

(Yeo et al., 2002): Ausgehend von normalem Gangepithel kommt es durch genetische Alterationen zu progredienten histologischen Veränderungen. Über Vorläuferläsionen, die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs), entwickeln sich invasive Pankreaskarzinome.

PanIN Progressionsmodell

Diese Veränderungen können im Mausmodell nachvollzogen werden, indem $Kras^{G12D}$ oder $Kras^{G12V}$ im murinen Pankreas exprimiert wird. Hierdurch kommt es zu einer Dedifferenzierung der azinären Zellen, einer azinär-duktalem Metaplasie (ADM) und pankreatischen intraepithelialen Neoplasien, die dann zu einem metastasierenden duktalem Adenokarzinom des Pankreas fortschreiten. Somit rekapituliert das murine Modell die menschliche Erkrankung in vielen Aspekten (Guerra et al., 2007; Hingorani et al., 2003; Seidler et al., 2008). Durch die Aktivierung von onkogenem Kras wird eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert, unter anderem RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, RalGDS/p38 MAPK (Hezel et al., 2006; Pylayeva-Gupta et al., 2011). Welche Rolle diese Signalwege im Einzelnen spielen und welche von ihnen die Progression zum Karzinom bewirken war bislang jedoch unklar (Morris et al., 2010; Pylayeva-Gupta et al., 2011). Eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs ist sowohl in humanen Pankreaskarzinomen als auch in Kras-getriggerten Mausmodellen zu sehen (Jimeno et al., 2008; Kennedy et al., 2011; Ying et al., 2011).

1.3 Phosphatidylinositol 3 Kinasen

Die Phosphatidylinositol 3 Kinasen (PI3K) sind eine Familie von heterodimeren Lipidkinasen, die Signalwege regulieren, die für Zellproliferation, Adhäsion, Überleben und Motilität wichtig sind. Zu ihr gehören mehrere strukturell verwandte

Enzyme, die die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen und einigen Phosphoinositiden katalysieren. In Säugetieren existieren Gene für acht katalytische und sechs regulatorische Untereinheiten. Nach der Proteindomänenstruktur der katalytischen Untereinheit werden drei Klassen unterschieden. Klasse I PI3Ks werden noch einmal in die Subklassen A und B unterteilt.

Tabelle 1: Phosphatidylinositol 3 Kinase Isoformen

Klasse	Katalytische Untereinheit	Regulatorische Untereinheit	Expression
IA	p110 α	p85 α,β ,	ubiquitär
	p110 β	p55 α,γ oder	ubiquitär
	p110 δ	p50 α	Leukozyten, Neurone, Melanozyten, Brust
IB	p110 γ	p101, p87, p84	Leukozyten, Herz, Pankreas, Leber, Skelettmuskel
II	PI3K-C2 α		ubiquitär
	PI3K-C2 β		ubiquitär
	PI3K-C2 γ		Leber, Prostata, Brust, Speicheldrüse
III	Vps34	Vps15	ubiquitär

(Kok et al., 2009; Vogt et al., 2006)

Besonders die Klasse IA spielt eine wichtige Rolle in der Zellreplikation, Migration und dem Zellüberleben, wobei innerhalb dieser Klasse besonders die katalytische Untereinheit p110 α und ihre regulatorische Untereinheit p85 bei der Regulation von Zellwachstum und Überleben und folglich auch in der Karzinogenese eine besondere Rolle spielen (Kang et al., 2005b).

Klasse I A PI3 Kinasen werden unter anderem durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Sie sind Heterodimere aus einer 110 kDa katalytischen Untereinheit (p110) und einer regulatorischen Untereinheit. Von der p110 Untereinheit sind vier Isoformen bekannt (p110 α , p110 β , p110 δ und p110 γ), während es von den regulatorischen Untereinheiten acht Proteine (p85 α , p85 β , p55 γ und ihre Spleißvarianten) gibt.

Bedingt durch eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren wird p110 zur Zellmembran rekrutiert und über Interaktion mit der SH2 (Src-homology 2)-Domäne

von p85 und die Phosphotyrosin-Motive der stimulierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Die aktivierte Untereinheit p110 bewirkt hier eine Phosphorylierung der 3'OH Position des Inositolringes des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) und damit die Konversion zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). Dies dient als Andockstelle für Signalproteine, die Pleckstrin-Homologie Domänen enthalten, unter anderem die Serin-Threonin Kinase AKT und die Phospho-Inositid-abhängige Kinase 1 (PDK1). PDK1 phosphoryliert und aktiviert AKT, der der Haupteffektor von PI3K ist und Überleben, Wachstum, Proliferation und Transformation der Zelle beeinflusst. (Kok et al., 2009; Liu et al., 2006)

1.3.1 Rolle des PI3K Signalwegs bei der Krebsentstehung

Es findet sich in vielen Karzinomen eine Hochregulation und Aktivierung des PI3K-Signalwegs. In fast 30% aller soliden Tumoren findet sich eine Mutation in *PIK3CA*, dem Gen, das für die katalytische Untereinheit der Klasse I PI3K p110 α codiert, oftmals in Form einer gain of function Mutation (Kang et al., 2005b). Fast 80% aller *PIK3CA* Mutationen werden in einem der drei hot spots gefunden, nämlich in der helikalen Domäne in der Position E542K und E545K und in dem C-terminalen Bereich der Kinase-Domäne in der Position H1047R (Gymnopoulos et al., 2007). Darüber hinaus gibt es noch mehrere, seltene und Karzinom-spezifische Mutationen, die in der gesamten codierenden Sequenz von p110 α vorkommen können (Gymnopoulos et al., 2007). Hot spot Mutationen werden dadurch erklärt, dass sie der Zelle einen entscheidenden Selektionsvorteil bieten. Die Onkogenität dieser drei hot spot Mutationen, die mit einer erhöhten Lipidkinase-Aktivität des mutierten p110 α einhergehen, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Bader et al., 2006; Ikenoue et al., 2005; Kang et al., 2005a). In Zellen, die die entsprechenden Mutanten exprimieren, kann eine Aktivierung der darunter liegenden Signalwege festgestellt werden, was sich durch eine erhöhte Phosphorylierung von AKT, S6K, 4EBP und GSK3 β zeigt (Zhao et al., 2008a).

1.3.2 Der PI3K Signalweg im Pankreaskarzinom

In >90% aller PDACs findet sich eine aktivierende *KRAS* Mutation, die dann zu einer Aktivierung von MAPK, PI3K und Ral GDS Signalwegen führt (Jaffee et al., 2002; Ying et al., 2011). Genanalysen haben gezeigt, dass sich in PDACs oftmals zusätzlich Alterationen im PI3K Signalweg auf verschiedenen Ebenen finden (Tuveson et al., 2005), was die Rolle des PI3K Signalwegs nochmals unterstreicht. Aktivierungen im PI3K Signalweg beinhalten aktivierende Mutationen in *PIK3CA*, Mutationen in der regulatorischen Untereinheit p85 α , Amplifikationen von *AKT2*

sowie verminderte *PTEN* Expression, einer Lipidphosphatase, die PI3K negativ reguliert, indem sie PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert (Kennedy et al., 2011; Samuels et al., 2005; Ying et al., 2011).

Ying et al. konnten in Gewebs Microarray Analysen von 54 humanen PDACs zeigen, dass sich in 70% keine oder nur eine geringe Expression von *PTEN* fand und in 68,5% eine moderate bis hohe AKT Phosphorylierung. Zudem fanden sich in komparativen genomischen Hybridisierungen (aCGH) von 61 Patientenproben in 32,8% der Fälle entweder eine *PTEN* Deletion oder eine *AKT2* Amplifikation (20/61). (Ying et al., 2011)

1.3.3 Die *PIK3CA*^{H1047R}-Mutation

Aufgrund ihrer Onkogenität und ihrer Häufigkeit sind die hot spot Mutationen von *PIK3CA* in der Karzinogenese von besonderer Bedeutung. Bei der H1047R Mutation kommt es zu einem Aminosäuren-Austausch von Histidin (H) gegen Arginin (R) und damit zu einer Konformationsänderung des Proteins, was sich in einer erhöhten Lipidkinase-Aktivität auswirkt (Zhao et al., 2008b).

Die Arbeitsgruppe um Peter K. Vogt konstruierte ein Plasmid, das die galline *PIK3CA* enthält und fügten die H1047R Mutation ein. Dieses Konstrukt zeigte eine erhöhte Lipidkinase-Aktivität, aktivierte den AKT Signalweg in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und war in der Lage eine Transformation in embryonalen Fibroblasten vom Huhn auszulösen. (Kang et al., 2005a)

Dass *PIK3CA*^{H1047R} auch *in vivo* onkogen und transformierend wirkt, konnte unter anderem in einer Arbeit von Bader et al. gezeigt werden. Sie brachten die H1047R hot spot Mutation in das *PIK3CA* Gen vom Huhn ein und konnten somit Tumoren in der Chorioallantoismembran von Huhn-Embryonen induzieren sowie Hämangiosarkome im Huhn auslösen. Die H1047R Mutation stellte sich verglichen mit der E542K und E545K Mutation als die potenteste der drei hot spot Mutation heraus. (Bader et al., 2006)

Zhao et al. zeigten die Onkogenität der H1047R Mutation in humanen Zellen. Dazu fügten sie eine H1047R Mutation in das humane Wildtyp *PIK3CA* Gen von humanen epithelialen Brustzellen ein und fanden eine hohe Lipidkinase-Aktivität, gemessen an den phospho-AKT Spiegeln sowie eine transformierende Wirkung, was sich an einem Wachstum in Soft-Agar bemerkbar machte. (Zhao et al., 2005)

1.4 Mausmodelle

1.4.1 genetisch definierte Mausmodelle

Genetisch definierte Mausmodelle spielen besonders in der Forschung solcher Erkrankungen eine große Rolle, die ein sehr komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren beinhaltet wie bei Krebserkrankungen. Die Kombination genetischer Alterationen, Zellumgebung, Angiogenese, Energiehaushalt der Zelle und vielen weiteren Faktoren lässt sich nur in einem lebenden Organismus studieren.

Die ersten Mausmodelle sind um 1984 entstanden durch Überexpression viraler und zellulärer Onkogene (Becher et al., 2006; Brinster et al., 1984).

Dass die Maus als Modellorganismus sehr beliebt ist, hat mehrere Gründe. Das Genom der Maus ist dem Genom des Menschen in 99% ähnlich, zudem gibt es viele molekulare Werkzeuge für die Verwendung in der Maus. Des Weiteren ermöglichen ihre Größe und ihr Reproduktionsverhalten die Durchführung von Studien mit großer Fallzahl. Auch für Therapiestudien und Dosisfindungsstudien haben sie einen großen Nutzen. Die Heterogenität in Bezug auf Frequenz des Auftretens von Tumoren, ihre Latenz und ihr Wachstum kann als Nachteil des Mausmodells gewertet werden (Vandamme, 2014). Sie spiegelt in diesen Punkten aber auch den natürlichen biologischen Verlauf der humanen Erkrankung wider und kann insofern sicher auch als Vorteil verstanden werden. Obwohl genetisch definierte Mausmodelle unter histologischen und genetischen Gesichtspunkten akkurate Modelle von Krebs im Menschen sind, kann ein Mausmodell natürlich keinen humanen Organismus ersetzen. (Vandamme, 2014)

1.4.2 Transgene Mausmodelle

Um ein Genkonstrukt in das Genom des Modellorganismus einzubringen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Es kann eine ungerichtete Integration stattfinden, was auch als transgen bezeichnet wird oder ein gezielter knock-in in einen definierten genetischen Locus. Bei der zufälligen Integration ins Wirtsgenom kann es zur Zerstörung relevanter Gene kommen, wodurch möglich ist, dass ein beobachteter Effekt nicht mehr zweifelsfrei zuzuordnen ist, zum anderen kann es zu starken Unterschieden in der Genexpression kommen, in Abhängigkeit von dem Integrationslocus und dem Promotor unter dem es exprimiert wird, sowie der integrierten Kopienzahl. Zudem ist die Effizienz nach Mikroinjektionen in den Pronukleus eines Einzell-Embryos mit 1-3% sehr gering. Im Rahmen des gerichteten knock-ins wird das Genkonstrukt mittels homologer Rekombination in den gewünschten Locus eingebracht. (Houdebine, 2005)

Die ersten Mausmodelle, die dazu beitragen sollten, die Entstehung des Pankreaskarzinoms besser verstehen zu können, entstanden 1987 als transgene Mäuse. Hras und SV40 T-antigen wurden unter der Kontrolle des Elastase-Promotors und damit in azinären pankreatischen Zellen exprimiert, wodurch zwar Pankreas-Tumore entstanden, aber keine klassischen duktales Adenokarzinome. Seit evident wurde, dass Kras im Pankreaskarzinom eine essentielle Rolle zu spielen scheint, entstanden die ersten Kras-Mausmodelle. 2003 entstanden durch Mikroinjektion die ersten transgenen Kras-Mausmodelle, in denen mutiertes Kras unter Kontrolle pankreasspezifischer Promotoren entweder nur in azinären oder nur in duktales Zellen exprimiert wurde. Diese entwickelten aber keine PDACs und nur vereinzelt präinvasive neoplastische Läsionen. So entwickelten Mäuse, die mutiertes Kras unter einem Elastase-Promotor nur in azinären Zellen exprimierten eine azinäre Zellhyperplasie und -dysplasie sowie vereinzelt präinvasive neoplastische Läsionen mit duktales Morphologie (Grippo et al., 2003) und Mäuse, die mutiertes Kras unter einem Cytokeratin 19 Promotor nur in duktales Zellen exprimierten zeigen eine periduktales lymphozytäre Infiltration (Brembeck et al., 2003).

Hingorani et al. gelang es 2003 ein knock-in Mausmodell zu entwickeln, indem er eine G12D Mutation in den endogenen *Kras*-Locus einbrachte, dem ein lox-stop-lox Konstrukt vorangestellt ist (Hingorani et al., 2003). Durch Verpaarung der *LSL-KRAS^{G12D}* Mäuse mit Tieren, die die Cre-Rekombinase unter dem pankreasspezifischen Promotor *PDX-1* oder *Ptf1a/P48* exprimieren, erfolgte die Expression des mutierten Allels, indem die geflochte Stopp-Kassette deletiert wurde. Diese Mäuse entwickelten PanINs und schließlich duktales Adenokarzinome, die zentrale Aspekte der Pathophysiologie von humanen PDACs widerspiegeln und waren damit das erste Mausmodell, in dem das menschliche PDAC adäquat rekapituliert wird. (Hingorani et al., 2003; Tuveson et al., 2005)

Hingorani vermutet, dass das Zusammenwirken der resultierenden RAS Expressionslevel und des zellulären Kontextes das biologische Outcome bestimmt und damit der Grund für die Unterschiede im *Kras^{G12D}*-knock-in Modell verglichen mit den transgenen Kras-Modellen ist (Hingorani et al., 2003).

1.4.3 Konditionale Rekombinationssysteme zur zeit- und ortsspezifischen Manipulation der Genexpression *in vivo*

Durch die Entwicklung konditionaler Rekombinationssysteme, wie dem Cre-loxP-System, ist es möglich eine zeit- und ortsspezifische Expression zu erreichen. Die Cre-Rekombinase (Cre-causes recombination) ist ein Enzym, das ursprünglich aus

dem Bakteriophagen P1 stammt und eine Rekombination an bestimmten Stellen, den sog. loxP-Stellen, die aus 34 Basenpaaren bestehen, bewirkt. Wenn ein bestimmter DNA-Abschnitt von den loxP-Stellen flankiert wird („flanked by loxP-sites“, gefloxt) kommt es zu einer Exzision dieses Abschnitts, wenn die loxP-Stellen in die gleiche Richtung orientiert sind. (Sauer et al., 1988) Wenn zwischen den loxP-Stellen ein Gen liegt kommt es zu einem knock-out, wenn sich dazwischen eine Stopp-Kassette befindet, die einem Gen vorangestellt ist, kann dieses Gen gezielt aktiviert werden, indem die Stopp-Kassette entfernt wird.

Eine gewebsspezifische Aktivierung wird durch die Wahl eines gewebsspezifischen Promotors zur Expression der Cre-Rekombinase möglich. Im Pankreas hat sich hierfür Ptf1a etabliert. Ptf1a (pancreas transcription factor 1 subunit alpha), auch p48 genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der pankreatischen Gänge, der exokrinen und endokrinen Zellen des Pankreas (Kawaguchi et al., 2002) zudem wird es noch in Neuralrohr, Cerebellum und Neuroretina (Nakhai et al., 2007) exprimiert. Ptf1a kann ab dem 9,5 Tag der Embryonalentwicklung in Vorläuferzellen des Pankreas nachgewiesen werden und steuert die Pankreasentwicklung (Kawaguchi et al., 2002). Durch die Wahl von Ptf1a als Promotor kommt es zu einer Aktivierung der Cre-Rekombinase im gesamten Pankreas, wodurch pankreasspezifisch die gefloxt DNA-Sequenz exzidiert wird (Eser et al., 2011; Nakhai et al., 2007; Seidler et al., 2008).

Des Weiteren ist es möglich, ein Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Gewebe zu exprimieren, indem man die Cre-Rekombinase an einen modifizierten Östrogen-Rezeptor fusioniert (ER^{T2} genannt), der durch Tamoxifen, aber nicht durch Östrogen aktiviert werden kann (Brocard et al., 1997; Feil et al., 1996)

Diesen Mechanismus nutzend kann auch ein Gen an den Östrogen-Rezeptor gekoppelt werden. Dadurch transloziert das entsprechende Protein nach Aktivierung des ER^{T2} Fusionsproteins mittels Tamoxifen in den Zellkern. Abhängig vom Wirkungsort des Proteins kann so ein Protein aktiviert oder inaktiviert werden.

Um Gene ubiquitär bzw. unabhängig vom Differenzierungsstatus einer Zelle als knock-in zu exprimieren, wird ein Genlocus benötigt, der während der gesamten Embryonalentwicklung und in adulten Tieren in allen Zellen aktiv transkribiert wird. Zudem sollte ein derartiger Genlocus mittels homologer Rekombination einfach genetisch manipulierbar sein. Hier hat sich der *Rosa26* Locus in den letzten beiden Jahrzehnten als idealer Locus herausgestellt, der erstmals 1991 von Friedrich und Soriano beschrieben wurde. Mittels eines retroviralen Vektors ROSA β -geo (rreverse orientation splice aceptor β -gal/neo) konnte mit der Promotor-trap-Methode dieser

Locus identifiziert werden (Friedrich et al., 1991). Der *Rosa26* Locus wird ubiquitär exprimiert, besitzt eine ausreichend hohe Transkriptionsaktivität um Transgene zu exprimieren, und auch eine homozygote Inaktivierung der *Rosa26* Transkripte führt bei den Mäusen zu keiner Veränderung des Phänotyps (Zambrowicz et al., 1997). Soriano konnte unter Verwendung einer lacZ-Reporterlinie zeigen, dass die Integration in den *Rosa26* Locus mittels homologer Rekombination mit hoher Effizienz möglich ist und der Locus auch für Cre-Rekombinasen zugänglich ist und damit einen geeigneten Zielort für konditional aktivierbare knock-in Allele darstellt (Soriano, 1999).

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, zwei neue knock-in Mausmodelle, die ein latent onkogenes *PIK3CA*^{H1047R} Allel tragen, das für p110 α ^{H1047R} codiert, zu generieren, um so den PI3K Signalweg selektiv im Pankreas aktivieren zu können. Hierdurch ist es möglich dessen Rolle bei der Karzinogenese im Pankreas zu analysieren. In einem der beiden Mausmodelle ist *PIK3CA*^{H1047R} an den Tamoxifen induzierbaren modifizierten Östrogen Rezeptor ER^{T2} fusioniert, wodurch es durch Zugabe von Tamoxifen reversibel ausgeschaltet werden kann, indem es in den Zellkern transloziert. Als Ziellocus für das Transgen wurde der murine *Rosa26* Locus ausgewählt. Durch eine 5'-gelegene Stopp-Kassette, die von zwei loxP Seiten flankiert wird (loxP-stop-loxP; LSL) kann das Transgen gewebspezifisch exprimiert werden. Durch Kreuzung des *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Allels mit *Ptf1a*^{Cre/+} Mäusen wurde *PIK3CA*^{H1047R} pankreasspezifisch exprimiert und die Aktivierung des PI3K Signalwegs funktionell *in vivo* analysiert.

2 Materialien

2.1 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1 kb DNA Extension Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
2-Mercaptoethanol	neoLab Migge Laborbedarfam-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
α -32P-dCTP, 9,25 Mbq, 250 μ Ci, ~3000 Ci/mmol	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., Rodgau-Jürgesheim, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Alcian Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Amersham Rapid-hyb buffer	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BBXF agarose gel loading dye mixture	BIO 101, Inc. Carlsbad, CA, USA
Bio-Rad Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff Konzentrat	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland und

	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Eosin	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gel Loading Dye, blau (6x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
GelStar Nukleinsäure Farbstoff	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Haematoxylin	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isofluran Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Nuclear Fast Red Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Odyssey Blockingpuffer	LI-COR Corp. Offices, Lincoln, NE, USA
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pertex™ Eindeckmittel	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Potassium ferricyanide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Potassium ferrocyanide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roti® Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SSC Puffer 20x Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TE-Puffer (1x) pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

	Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TrisHCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid in Dimethylformamid)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

2.2 Enzyme

Tabelle 3: Enzyme

Enzym	Hersteller
Cre-Rekombinase	Novagen, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
LR Clonase® II Plus enzyme	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PfuUltra hotstart DNA Polymerase	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Proteinase K	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
REDTaq® DNA Polymerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
REDTaq® Ready Mix™ PCR reaction mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
Agaroselösung, 1%	100ml 1x TAE 1g Agarose
Blockingpuffer	5% (v/v) Magermilchpulver 0,1% (v/v) NP-40 gelöst in PBS
ES-Zell Lysepuffer (DNA-Lysepuffer)	100 mM Tris pH 8,5 5 mM EDTA 0,8 mM HCl 2% SDS 200 mM NaCl 0,1 mg/ml Proteinase K (Zugabe vor Gebrauch)
KCM-Puffer (5x)	500 mM KCl 150 mM CaCl ₂ 250 mM MgCl ₂
Gelatinelösung	500 ml aqua dest. 0,5 g Gelatine
Gitschier's buffer (10x)	670 mM Tris pH 8,8 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammoniumsulfat) 67 mM MgCl ₂
IP-Puffer, pH 7,9	50 mM HEPES (pH 7,9) 150 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 8) 0,5% (v/v) NP-40 10% (v/v) Glycerin 1% Phosphatase Inhibitor (Zugabe vor Gebrauch) 1% Protease Inhibitor (Zugabe vor Gebrauch)
lacZ-Färbepuffer	35 mM Potassium ferricyanide 35 mM Potassium ferrocyanide 2 mM MgCl ₂ 0,01% sodium deoxycholate 0,02% Nonidet P-40 (NP-40) PBS

	1 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactoside)
lacZ-Waschpuffer	2 mM MgCl ₂ 0,01% sodium deoxycholate 0,02% Nonidet P-40 (NP-40) PBS
Ladepuffer Orange G (6x)	60% (v/v) Glycerin 60 mM EDTA 0,24% (w/v) Orange G 0,12% (w/v) SDS
PBS (10x), pH 7,4	1,4 M NaCl 27 mM KCl 40 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
PCR-Lysepuffer (Soriano)	Aqua dest. 0,5% Triton X-100 1% β -Mercaptoethanol 10% 10x Gitschier's buffer 200-400 μ g/ml Proteinase K (Zugabe vor Gebrauch)
Protein Ladepuffer (Laemmli) (5x), pH 6,8	0,35 M SDS 50%(v/v) Glycerin 0,3 M Tris/HCl 0,7 mM Bromphenolblau Na-Salz 5% (w/v) β -Mercaptoethanol
Stripping Lösung (Southern Blot)	10 ml 1M Tris 500 μ l 10% SDS 250 μ l 20x SSC aqua dest. ad 50 ml
TAE-Puffer (50x), pH 8,5	2 M Tris 100 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure (100%)
Western Blot Laufpuffer (10x)	35 mM SDS 0,25 M Tris/HCl 2 M Glycin
Western Blot Sammelgelpuffer, pH 6,8	0,5 M Tris/HCl
Western Blot Stripping-Puffer (Odyssey), pH 2	25 mM Glycin 2% (w/v) SDS

Western Blot Transferpuffer, pH 8,3	39 mM Glycin 48 mM Tris/HCl 0,037% (w/v) SDS 20% (v/v) Ethanol
Western Blot Trenngelpuffer, pH 8,8	1,5 M Tris/HCl
Western Blot Waschpuffer	1xPBS 0,1% (v/v) NP-40 oder 0,1% (v/v)TWEEN 20

Alle Puffer wurden mit MilliPore Wasser hergestellt.

Tabelle 5: Gele für Western Blot

Gel	Zusammensetzung
Polyacrylamid-Trenngel (10%)	2,05 ml aqua dest. 1,3 ml Trenngelpuffer 1,65 ml Acrylamidlösung 30% 50 µl SDS 10% 25 µl APS 10% 7,5 µl TEMED
Sammelgel (4%)	1,5 ml aqua dest. 650 µl Sammelgelpuffer 375 µl Acrylamidlösung 30% 25 µl SDS 10% 12,5 µl APS 10% 5 µl TEMED

2.4 Kommerziell erhältliche Reagenziensätze

Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Reagenziensätze

Reagenziensatz	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Venor® GeM Classic Mycoplasma PCR Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland

Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
-----------------------------------	---

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
8er-Softstrips (0,2ml) (PCR-Tube)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Amersham Hybond Blotting Paper (Filterpapier)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Hybond-N+ (Nitrozellulosemembran)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
BioPur® combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chirurgische Einmalskalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Gefriergefäß (Cryotubes™)	Nunc™ Brand Products, Naperville, IL, USA
Gene Pulser/Micro Pulser Elektroporationsküvette (0,2 cm gap)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Immobilon Transfermembran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Küvetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microtom Klängen S35	Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Plattierungsspatel	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland

Primer und Sonden	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe lock Reaktionsgefäße BioPur®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sterile Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Whatman-Paper	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellkulturverbrauchsmaterialien (Schalen, well-platten, Flaschen, Röhrchen, Zellschaber)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA; TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen, Schweiz; Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland

2.6 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Kern AGB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
ASP300 Tissue Protector	Leica, Solms, Deutschland
Autoklav EL-vollautomatischer Laborautoklav (Typ: 2540EL)	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Avanti® J25 Zentrifuge	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
CO2 Incubator HERAcell®	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Dewar Transport Gefäß, Typ B	KGW-Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Digital CCD camera ORCA II-ER-1394	Hamamatsu, Herrsching, Deutschland
Duo Therm Hybridisierungsöfen OV5	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Einfrierbox Nalgene®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Elektrophoresis-power supply Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elisa Plate reader Anthos 2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Eppendorf 5432 mixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filmkassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Geigerzähler LB122	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland
Gel doc XR+ Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland und Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Genequant Pro Spectrophotometer	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus HERAsafe mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland
Homogenizer Silent Crusher M	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Inkubator (Thermoshake)	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Leica EG 1150 H beheizte Paraffinausgießstation	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer COMBIMAG	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Microcentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop DM LB	Leica, Solms, Deutschland
Microtom Microm HM355S	Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Multipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland

Odyssey® infrared imaging system	LI-COR Bioscience Corporate, Lincoln, NE; USA
Paraffin tissue floating bath Microm SB80 (Wasserbad für Paraffinschnitte)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH&CoKG, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommerns, Deutschland
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Schott Duran® Glasware	Schott UK Ltd, Stafford, UK
Thermocycler TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
VacuGene Pumpe	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
VacuGene XL Vacuum Blotting System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Vortex VF2	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Westernblotapparatur	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zeiss LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland

2.7 Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, hergestellt.

Tabelle 9: Primer

Verwendungszweck	Name	Sequenz
Klonierung	Pi3k-ms-pfo-	5'- TCCCGGAACCATGCCACCCCGACC- 3'

	UP	
	PI3K-mstaa- pf-RP	5'- TCCGGGATTAGTTCAAAGCATGTTGCTTTATT GT- 3'
Klonierung	Pi3kos-ForP1	5'- TTAGGGCCCTCCCGGAACCATGCCACCCCG ACC- 3'
	Pi3kos- RevP1	5'- TCCGCTCGAGGTTCAAAGCATGTTGCTTTATT GTGT- 3'
Screening/ Sequenzierung	pi3k-seq3	5'- CTTTCTTTTCCTGCTTGAG- 3'
	pi3k-seq4	5'- AGGGCAAATAATAGTGGTG- 3'
	M597Blue- UP	5'- GTTGTA AACGACGGCCAGTGA- 3'
Screening	pBroad pA- 5268-LP	5'- CCAAGGTTTGA ACTAGCTCTTCATTT- 3'
	Pi3K-3449- ForP	5'- TGATGGACA ACTGTTTCATATTGA- 3'
	Cre-ER-T2- sc-LP1	5'- GCAGATTCATCATGCGGA- 3'
Sequenzierung	M831Blue- RP	5'- ACACAGGAAACAGCTATGACCATGA- 3'
	pGL3-pA- Pause-UP	5'- TGAATAGTTAATTGGAGCGGCCGCAATA- 3'
	GATC-pi3k- lp3115- 109280	5'- ATGCTGCCGAATTGCTAG- 3'
	GATC-pi3k- up828- 109279	5'- TTGCTGAAGCAATTAGG- 3'
Screening ES- Zellen	RosES UP2	5'- GCTCCTCAGAGAGCCTCGGCTAGGTAG- 3'
	RosES LP2	5'-ACCTCGAGGGTACCCGGTGAAGG-3'
Genotypisierung <i>LSL-Kras^{G12D}</i>	Kras- WT_UP1	5'- CACCAGCTTCGGCTTCCTATT- 3'
	Kras-URP- Lp1	5'- AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA- 3'
	KrasG12Dmu t_UP	5'- CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC- 3'

Genotypisierung <i>Ptf1a^{Cre}</i>	P48-Cre-GT-LP-URP	5'- CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA- 3'
	P48-Cre-GT-wt-UP	5'- CCACGGATCACTCACAAAGCGT- 3'
	P48-Cre-GT-mut-UP-neu	5'- GCCACCAGCCAGCTATCAA- 3'
Genotypisierung <i>LSL-PIK3CA^{H1047R}</i> (Homo- /Heterozygotie bei intakter Stopp-Kassette)	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> Common forward	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT- 3'
	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> MUT reverse	5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC- 3'
	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> WT reverse	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG- 3'
Genotypisierung <i>LSL-PIK3CA^{H1047R}</i> (Vorhandensein <i>LSL-PIK3CA</i>)	pGL3-pA-Pause-UP	5'- TGAATAGTTAATTGGAGCGGCCGCAATA- 3'
	PI3K_genotype-Rev	5'- AAATAGCCGCAGGTCACAAAGTCTCCG- 3'
<i>PIK3CA^{H1047R}</i> (Rekombinations erfolg – Deletion der Stopp- Kassette)	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> Common forward	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT- 3'
	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> Recombined reverse	5'- AGCCGAAGGTCACAAAGTC- 3'
<i>PIK3CA^{H1047R}</i> (pankreas- spezifische Deletion der Stopp-Kassette)	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> Common forward	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT- 3'
	<i>R26-PIK3CA^{H1047R}</i> Recombined	5'- AGCCGAAGGTCACAAAGTC- 3'

	reverse	
	R26- <i>H1047R</i> PIK3CA WT reverse	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG- 3'
Genotypisierung <i>LSL-R26^{lacZ/+}</i>	R26-Tva-GT- UP	5'- AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT- 3'
	R26-Tva-GT- SA-mut-LP	5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC- 3'
	R26-Tva-GT- WT-LP	5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG- 3'

Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland durchgeführt.

2.8 Plasmide

Tabelle 10: Plasmide

Plasmid	Hersteller
pCR®-XL-TOPO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pCR-Blunt II –TOPO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pBluescript SK+ mit ERT2 als Insert	Modifiziert in unserem Labor ausgehend von pBluescript SK+ von Stratagene Cloning System, Inc., La Jolla, USA
pcDNA3.2/V5-DEST	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pENTR-LSL	Modifiziert in unserem Labor ausgehend von pENTR/D-TOPO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RosaRFA (<i>Rosa26</i> Targeting-Vektor)	Modifiziert in unserem Labor ausgehend von pROSA26-1, der freundlicherweise von P.Soriano zur Verfügung gestellt wurde

2.9 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Erstantikörper		
Anti-β-Aktin (Maus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	1:2000
Anti-phospho-Akt (Ser473) (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
PI3 Kinase p110α Antibody (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Akt (Kaninchen)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1:1000
Zweitantikörper		
Alexa Fluor® 680 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	1:2000
Alexa Fluor® 680 goat anti-mouse IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	1:2000

2.10 Bakterienstämme

Tabelle 12: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli (Invitrogen™)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
One Shot® TOP10 chemically competent E. coli (Invitrogen™)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.11 Zelllinien

Tabelle 13: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
W4/129S6 ES-Zellen	Taconic, Hudson, NY, USA
HEK293FT-Zellen	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

2.12 Zellkulturreagenzien und Medien

Tabelle 14: Zellkulturreagenzien

Reagenz	Hersteller
Collagenase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (normal or high Glucose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
ES Cell qualified Fetal Calf Serum (ES-FCS) (Gibco™)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetal calf serum, fötales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Gelatine	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Geneticin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LIF	(Chemicon) Millipore Corporate, Billerica, MA, USA
Non essential amino acids (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 15: Medien

Medium	Zusammensetzung
HEK293FT-Zellmedium	DMEM 1% Penicillin-Streptomycin 10% FCS 1% Non essential amino acids
PMEF Medium	DMEM (high glucose) 10% EU-FCS 1% Penicillin-Streptomycin

	1% L-Glutamin
ES-Zellmedium	DMEM (high glucose) 15% ES-FCS 1% Penicillin-Streptomycin 1% L-Glutamin 1% Natriumpyruvat 1% Non essential amino acids 0,1% 10 ⁻¹ M β-Mercaptoethanol 1000 U/ml LIF
Selektionierendes ES-Zellmedium	ES-Zellmedium Geneticin 200µg/ml
Einfriermedium	DMEM (für ES-Zellen high glucose) 20% FCS 10% DMSO
LB-Flüssigmedium	10 g Luria/Miller Agar 400 ml aqua dest. ggf. Zusatz von Ampicillin/Kanamycin
LB-Festmedium	16 g Luria/Miller Agar 400 ml aqua dest. ggf. Zusatz von Ampicillin/Kanamycin

2.13 Software

Tabelle 16: Software

Programm	Herkunft
Blast (Basic Local Alignment Search Tool)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (20.03.2014)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/ (20.03.2014)
Primer Express v2.0	Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serial Cloner 2.6	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html (20.03.2014)
SigmaStat	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

3 Methoden

3.1 Klonierung

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Mithilfe der PCR werden Bereiche der DNA amplifiziert, die durch die Primer definiert werden. Die PCR-Produkte werden anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um die Größe bestimmen zu können. Durch Screening-PCRs konnten positive Klone identifiziert werden (siehe 3.1.10 Screening-PCR zur Überprüfung der transformierten Bakterien). Mithilfe der Genotypisierungs-PCR wurde festgestellt, ob bei den Tieren das Wildtyp- oder das mutierte Allel vorlag (siehe 3.3.2 Genotypisierung anhand genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien). Des Weiteren wurde mittels PCR in den einzelnen Gewebeproben die Cre vermittelte Rekombination und Deletion der lox-stop-lox Kasette überprüft.

3.1.2 Amplifikation von *PIK3CA*^{H1047R}

Ausgehend vom Plasmid RCAS-*PIK3CA*^{H1047R}, das freundlicherweise von Dr. P. Vogt zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte die Amplifikation mit den Primern PI3K-ms-pfo-UP und PI3K-mstaa-pf-RP, bzw. für das *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-Konstrukt mit den Primern Pi3kos-ForP1 und Pi3kos-RevP1.

Tabelle 17: Reaktionsansatz zur Amplifikation von *PIK3CA*^{H1047R}

Reagenzien	50 µl-Ansatz
10x PfuUltra Reaktionspuffer	5 µl
UP 10 µM	1,5 µl
LP 10 µM	1,5 µl
PfuUltra hotstart	1,5 µl
dNTP (PEQLAB)	1 µl
Vektor 100 ng	1,65 µl bei 60,4 ng/µl
aqua dest. ad 50 µl	37,85 µl

Tabelle 18: PCR-Bedingungen zur Amplifikation von *PIK3CA*^{H1047R}

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94°C	3 Min.	1
95°C	30 Sek.	16
60,5°C	40 Sek.	
72°C	4 Min. +5 Sek. /Zyklus	

72°C	7 Min.	1
4°C	Pause	

3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Säulchenaufreinigung

Um die DNA-Probe von Rückständen der PCR wie Nucleotiden, Primern, Enzymen, Salzen und anderen Unreinheiten zu reinigen wurde je nach Größe und gewünschter Konzentration des PCR-Produktes das QIAquick PCR Purification Kit oder das MinElute PCR Purification Kit gemäß Herstellerangaben verwendet.

Präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion

Um ein DNA-Fragment aus dem Gel zu extrahieren und aufzureinigen wurde ein Ethidiumbromid-freies Gel verwendet. Die Detektion der DNA erfolgte durch Anfärbung mit dem GelStar Nukleinsäure Farbstoff unter Verwendung von blauem Licht. Das DNA-Fragment wurde mit einem Einmalskalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits gemäß Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt.

3.1.4 Generierung eines Adenosinüberhangs („A-tailing“)

Für die Klonierung eines DNA-Fragments in einen TOPO®-TA-Cloning®-Klonierungsvektor, wurde durch die Taq DNA Polymerase am 3'-Ende des DNA-Fragmentes ein überstehender Adenosinüberhang generiert. Die Reaktion fand bei 70°C für 10 Minuten statt, anschließend Kühlung auf 4°C, davon wurden 4 µl in die Ligation eingesetzt.

Reaktionsansatz:

5 µl PCR-Produkt

+ 5 µl Ready Mix™ Taq PCR Reaction Mix

3.1.5 Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA

Um für eine vorgesehene Ligation die Religation des Vektors zu verhindern, wurde direkt nach dem enzymatischen Verdau eine Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA durch die Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) herbeigeführt. Die Reaktion fand bei 37°C für 1 Stunde statt mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20 Minuten.

Reaktionsansatz:

Vektor-DNA

2,5µl SAP-Puffer (10x)

2,5µl SAP

aqua dest. ad 25µl

3.1.6 Klonierung in den pCR®-XL-TOPO® Vektor

4 µl des gereinigten PCR-Produkts wurden mit 1 µl pCR®-XL-TOPO® Vektor (von Invitrogen) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (~25°C) inkubiert, anschließend wurde 1 µl der 6xTOPO Cloning Stop Lösung zugefügt, gut gemischt und dann auf Eis gestellt.

3.1.7 Ligation

Bei einer Ligation wird enzymkatalysiert die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente an ihren Enden durch Ausbildung von Phosphodiesterbrücken herbeigeführt. Hierfür wurde die T4 DNA Ligase von Invitrogen gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion fand bei 22°C über Nacht statt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für Ligation

Reagenzien	20 µl-Ansatz
Insert	90 fmol
Vektor	30 fmol
5x DNA Ligase Reaktions-Puffer	4 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
aqua dest.	ad 20 µl

3.1.8 Klonasereaktion

Im Rahmen der Klonasereaktion erfolgt die Rekombination über die attachment-sites (att-sites) von Ausgangs- und Zielvektor. Hierfür wurde der Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen) verwendet. Es wurden 37,5 ng DNA des Ausgangsvektors und des Zielvektors in die Reaktion eingesetzt und 0,5 µl des Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix hinzugegeben. Nach sorgfältiger Mischung wurde die Reaktion über Nacht bei 25°C inkubiert. Hiernach wurde die Reaktion durch Inkubation mit 0,25 µl zugegebener Proteinase K für 10 Minuten bei 37°C gestoppt.

Für die Transformation in One Shot® Stbl3™ E.coli Bakterien (Invitrogen) wurden 2,75 µl der Klonasereaktion eingesetzt.

3.1.9 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden chemisch kompetente E.coli One Shot® TOP10 oder One Shot® Stbl3™ (Invitrogen) verwendet. One Shot® Stbl3™ eignen sich besonders für die Transformation großer, instabiler Fragmente, da sie rekombinasedefizient sind. Sie zeigen ferner eine hohe Transformationseffizienz und ergeben eine hohe DNA-Ausbeute, weswegen diese besonders für die Transformation der Zielvektoren verwendet wurden. Für die Transformation der Plasmide in die kompetenten Bakterien wurde entweder die KCM-Methode (mit One Shot® TOP10 oder One Shot® Stbl3™) oder die Hitzeschock-Methode (mit One Shot® TOP10) verwendet.

3.1.9.1 Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock-Methode

Hierfür wurden 2 µl der Klonierungsreaktion auf die One Shot® TOP10 gegeben und vorsichtig umgerührt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 30 Sekunden einem Hitzeschock (42°C) ausgesetzt und anschließend wieder für 2 Minuten auf Eis verbracht. Nun wurden 250 µl von S.O.C. Medium zugegeben und bei 37°C für 1 Stunde im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl der Suspension auf einer vorgewärmten Agarplatte mit Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Bakterieneinzelkolonien wachsen zu lassen.

3.1.9.2 Transformation kompetenter Bakterien mittels KCM-Methode

Es handelt sich hierbei um eine chemische Transformation mittels Kalium-, Calcium- und Magnesiumchlorid (KCM). Hierfür wurden die eingefrorenen Bakterien auf Eis aufgetaut. 200-500 ng der DNA-Präparation wurden mit 20 µl 5x KCM-Puffer gemischt und mit aqua dest. auf 100 µl gebracht und dann mit 100 µl der chemisch kompetenten Bakterien vorsichtig gemischt (One Shot® TOP10 oder One Shot® Stbl3™ (Invitrogen)). Anschließend erfolgte die Inkubation für 20 Minuten bei 4°C und für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem 1 ml S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugegeben worden war, wurden die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C (im Falle der One Shot® TOP10) bzw. für 2 Stunden bei 25°C (bei One Shot® Stbl3™) im Inkubator geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden dann auf Agar Platten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausplattiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C bzw. 25°C.

3.1.10 Screening-PCR zur Überprüfung der transformierten Bakterien

Um die richtige Insertion und Orientierung des DNA-Fragments in dem Plasmid zu testen, bevor eine entsprechende Plasmidpräparation durchgeführt wurde, erfolgte eine Screening-PCR. Dafür wurden die nun gewachsenen Kolonien jeweils mithilfe einer Öse aufgenommen und in ein PCR Gefäß gestrichen und gleichzeitig auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen. Nach Hinzugabe von 50-60 µl sterilem Wasser in das PCR-Gefäß erfolgte eine Hitze-Denaturierung der Bakterien bei 95°C für 5 Minuten.

Im Anschluss wurde mit spezifischen Primern eine PCR zur Überprüfung der Einzelklone durchgeführt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für Screening-PCR

Reagenzien	30 µl-Ansatz
aqua dest.	18 µl
Puffer Red Taq	3 µl
dNTPs	0,6 µl
Primer Forward	1,2 µl
Primer Reverse	1,2 µl
Enzym Red Taq	1 µl
Bakterien-Aufkoch	5 µl

Tabelle 21: PCR-Bedingungen für Screening-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95°C	3 Min.	1
95°C	30-40 Sek.	40
x°C	y Sek.	
72°C	4 Min.	
72°C	7 Min.	1
4°C	Pause	

Tabelle 22: Spezifische Reaktionsbedingungen für Screening-PCR

Primer	Denaturierung	Annealing	Extension
pi3k-seq3 und pi3k-seq4	95°C 40 Sek.	49°C 50 Sek.	72°C 4 Min.
Pi3kos-ForP1 und Pi3kos-RevP1	95°C 40 Sek.	60,5°C 50 Sek.	72°C 4 Min.

M597Blue-UP und Pi3kos- RevP1	95°C 40 Sek.	60,5°C 50 Sek.	72°C 4 Min.
Pi3K- 3449ForP und Cre-ER-T2-sc- LP1	95°C 30 Sek.	55°C 40 Sek.	72°C 2 Min.
Pi3K- 3449ForP und pBroad pA- 5268-LP	95°C 30 Sek.	57°C 40 Sek.	72°C 2 Min.

3.1.11 Plasmidpräparation

Von den als positiv erkannten Klonen wurden Plasmidpräparationen durchgeführt. Die positiven Klone wurden in ein selektives autoklaviertes LB-Flüssigmedium (lysogeny broth) überführt und bei 25°C bzw. 37°C im Inkubator unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte (OD) von 1,0-1,3 wachsen gelassen. Alternativ wurden die Bakterien auf selektiven LB-Agarplatten kultiviert und dann geerntet. Je nach benötigter DNA-Menge wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit bzw. das QIAGEN Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Im Falle des Targeting-Vektors erfolgte die Präparation mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen.

3.1.12 Kryokonservierung der Bakterienstämme

Zur Konservierung der Bakterienstämme wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Dazu wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 400 µl Glycerin gemischt und bei -80°C weggefroren.

3.1.13 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an bestimmten Sequenzen schneiden können. Je nach Enzym wurde der entsprechende Puffer zugegeben und zusammen mit der zu verdauenden DNA bei der optimalen Reaktionstemperatur (in der Regel 25°C oder 37°C) für 2-12 Stunden inkubiert. Bei einigen Enzymen war die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA) nötig. In der Regel wurde der Verdau durch Erhitzen auf 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Um die Plasmide zu überprüfen,

wurde ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen vorgenommen und auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien	20 µl Ansatz
DNA	2 µl
NEB-Puffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
BSA (10x)	2 µl
aqua dest.	13 µl

3.1.14 Exzision der Stopp-Kassette mittels Cre-Rekombinase

Um das *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-Konstrukt *in vitro* funktionell testen zu können, musste zuvor mithilfe der Cre-Rekombinase die loxP flankierte Stopp-Kassette entfernt werden, um eine Expression des Konstruktes zu ermöglichen. Die Reaktion fand für 30 Minuten bei 37°C und dann für 10 Minuten bei 70°C statt.

Reaktionsansatz:

250 ng Plasmid

3 µl Cre-Puffer (10x)

1 µl Cre-Rekombinase

aqua dest. ad 30 µl

3.2 Embryonale Stammzellen

3.2.1 Kultur der embryonalen Stammzellen

Bei den embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) handelt es sich um W4/129S6 Zellen, die von der Firma Taconic bezogen wurden. Die ES-Zellen wachsen auf einem Monolayer aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Hierfür wurden, einen Tag bevor die ES-Zellen ausgesät wurden, MEFs auf Gelatine bedeckten Zellkultur-Schalen ausgesät. W4/129S6 ES-Zellen (Taconic) wurden in ES-Zellmedium (Zusammensetzung siehe 2.12 Zellkulturreagenzien und Medien) bei 37°C und 5% CO₂ gezogen. Das Medium wurde täglich gewechselt.

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)

Murine embryonale Stammzellen wachsen auf einem Monolayer aus mitotisch inaktiven primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Diese bieten ihnen

die optimalen Wachstumsbedingungen und verhindern die Differenzierung der embryonalen Stammzellen. Um ein Wachstum der MEFs zu verhindern, kann die Inaktivierung der Mitose durch Bestrahlung oder durch Behandlung mit Mitomycin C erreicht werden. In unserem Falle erfolgte eine Bestrahlung mit 34 Gray. Danach wurden die Zellen in MEF Einfriermedium weggefroren (Passage 4). Zur Kultivierung der MEFs wurden diese in Zellkulturschalen, die zuvor mit flüssiger autoklavierter Gelatinelösung beschichtet worden waren, in MEF-Medium bei 37°C und 5% CO₂ gezogen.

Kryokonservierung von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Durch Zugabe von FCS-haltigem ES-Zellmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Suspension 5 Minuten bei 1200 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die ES-Zellen in kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein steriles vorgekühltes Gefriergefäß (Nunc™) gegeben. Das Einfriermedium wurde vor jedem Wegfrieren frisch hergestellt. Das Gefriergefäß wurde dann in den vorgekühlten Einfrierbehälter (Nalgene®) gegeben, mit dem eine optimale Kühlungsrate von 1°C pro Minute erreicht wird und bei -80°C weggefroren. Nach 12-24 Stunden wurden die Gefriergefäße in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 Vorbereitung des Targeting-Vektors

Das Plasmid mit dem Targeting-Vektor (*PIK3CA*^{H1047R} in RosaRFA bzw. *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in RosaRFA) wurde wie unter 4.1.1 bzw. 4.1.2 (Klonierung *PIK3CA*^{H1047R} bzw. *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in Rosa26 Targeting-Vektor) beschrieben generiert. Frisches LB-Medium wurde mit Bakterien aus der Glycerin-Kultur inokuliert und die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte (OD) von 1-1,3 kultiviert. Die Plasmid Präparation wurde analog des Hersteller Protokolls mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach der Elution aus der QIA-filter cartridge und der Isopropanol Präzipitierung wurde noch eine zusätzliche Ethanol Präzipitierung durchgeführt. Das Pellet wurde in steril gefiltertem TE-Puffer aufgenommen.

Für die Elektroporation wurden 30 µg der Plasmid-DNA mit Pac I für 2 Stunden bei 37°C verdaut mit anschließender Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20 Minuten. Die Linearisierung der DNA wurde auf einem Agarose Gel (0,8%) kontrolliert. Die Pac I Restriktionsschnittstelle war zuvor durch einen Kontroll-Verdau der DNA verifiziert worden.

3.2.3 Transiente Transfektion der embryonalen Stammzellen mittels Elektroporation

Der Targeting-Vektor wurde mittels Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht. Hierfür wurden 1×10^7 ES-Zellen in 750 μ l eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Elektroporations-Küvetten (Bio-Rad) überführt und mit dem linearisierten Plasmid (siehe unter 3.2.2 Vorbereitung des Targeting-Vektors) gemischt. Die Elektroporation wurde bei 250 V/500 μ F im GenePulser II (BioRad) durchgeführt und die Zellsuspension anschließend in warmem ES-Zellmedium aufgenommen und auf MEF bedeckte Kulturschalen ausgesät. Die restlichen ES-Zellen, die nicht elektroporiert wurden, wurden in ein Gelatine bedecktes 6-well gegeben zur Isolation von genomischer Wildtyp ES-Zell DNA.

3.2.4 Selektion und Expansion positiver homolog rekombinierter ES-Zellklone

Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone

Die loxP flankierte Stopp-Kassette enthält ein Neomycinresistenzgen („neo“) unter der Kontrolle des Phosphoglycerolkinase (PGK) Promotors, das für die Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase codiert, die durch eine Phosphorylierung von Geneticin dieses inaktiviert. 18 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-Zellmedium durch ein selektionierendes ES-Zellmedium, das 200 μ g/ml Geneticin enthält, ersetzt, um nur den ES-Zellen das Wachstum zu ermöglichen, die die Geneticin-Resistenz und damit die Stopp-Kassette und das Transgen enthalten.

Expansion homolog rekombinierter ES-Zellklone

Nach etwa sieben Tagen wurden die Einzelklone gepickt und in MEF bedeckte 24-wells sowie in Gelatine beschichtete 96-wells zum PCR-Screening überführt. Die ES-Zellklone, die in der PCR positiv waren, wurden aus den 24-well Platten weiter gezogen, indem sie zum einen in ein unbeschichtetes 6-well überführt wurden, um die DNA für die Southern Blots zu erhalten, zum anderen wurden sie zur weiteren Anzucht in ein mit MEFs beschichtetes 6-well überführt. Hieraus wurde ein Teil direkt kryokonserviert, der andere Teil wurde auf eine neue MEF-beschichtete 6 cm Schale gegeben, aus der wiederum drei Röhrchen kryokonserviert wurden und ein Teil auf ein 24-well ohne MEFs und mit Antibiotika-freien Medien gegeben wurde, um die Zellen auf Mykoplasmenkontamination zu testen.

3.2.5 Nachweis der homologen Rekombination der ES-Zellen mittels Screening-PCR

Zum Nachweis der homologen Rekombination der ES-Zellen wurde die DNA der ES-Zellen einer 96-well Platte isoliert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 20 µl PCR Lysepuffer für 1 Stunde bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die DNA in PCR-Gefäße überführt, die DNA wurde mehrmals auf- und abpipettiert, um sie zu scheren und anschließend für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Proteinase K des PCR Lysepuffers zu inaktivieren. Von der DNA-Lösung wurden 2 µl für die Screening-PCR eingesetzt. HotStar Taq (Qiagen) wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Als Primer wurden RosES UP2 / RosES LP2 verwendet. Zur Größenbestimmung wurde das PCR-Produkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Tabelle 24: Reaktionsansatz für Screening-PCR der ES-Zellklone

Reagenzien	50 µl-Ansatz
RosES UP2	2 µl
RosES LP2	2 µl
5x Q-Solution	11 µl
10x Puffer	5 µl
dNTPs (Fermentas, 10 mM)	2 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,35 µl
aqua dest.	25,65 µl
DNA	2 µl

Tabelle 25: Reaktionsbedingungen für Screening-PCR der ES-Zellklone

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95°C	16 Min.	1
95°C	40 Sek.	45
62°C	45 Sek.	
65°C	4 Min. + 3 Sek./Zyklus	
65°C	10 Min.	1
23°C	Pause	

3.2.6 Isolation genomischer ES-Zell DNA

Das ES-Zell Medium auf den 6-well-Platten wurde täglich gewechselt und die Zellen wuchsen bis zur 100%igen Konfluenz. Dann wurden die Zellen über Nacht mit ES-Zell Lysepuffer bei 55°C in der feuchten Kammer lysiert. Anschließend wurde

Ethanol 100% dazugegeben, um die DNA zu präzipitieren und die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Ethanol entfernt und die DNA wurde dreimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 200 µl Wasser aufgenommen und bei 4°C gelagert.

3.2.7 Southern Blot Analyse

Enzymatischer Restriktionsverdau und Gelelektrophorese der DNA

Um die in der Screening-PCR positiven ES-Zellklone weiter zu überprüfen, erfolgte eine Southern Blot Analyse. Hierfür wurde genomische DNA aus den positiven Klonen und Wildtyp ES-Zellen isoliert und mit dem Enzym EcoRV für 24 Stunden bei 37°C und anschließend nach vorsichtiger Mischung erneut 24 Stunden bei 25°C verdaut.

Die Southern Blot Hybridisierung erfolgte mit drei verschiedenen Sonden analog eines von Southern entwickelten Protokolls (Southern, 1975). Nach Zugabe eines Ladepuffers (10x BBXF Agarose gel loading dye mixture, Bio 101) wurden die Proben neben einer DNA-Leiter (Invitrogen) auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die horizontale Gelelektrophorese wurde bei 40 V für etwa 14 Stunden durchgeführt.

Ein separater Gelstreifen, auf dem zusätzlich verdaute Wildtyp-DNA und die DNA-Leiter aufgetragen war, wurde in Ethidiumbromid gefärbt und zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert, um später die Größe der Banden des Southern Blots genau lokalisieren zu können.

Blotting der genomischen DNA

Die DNA wurde mittels eines Vakuum Blotters mit 55 mbar auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Hybond-N+) übertragen. Für eine verbesserte Transfer-Effizienz erfolgte die Depurinierung des Gels durch Inkubation mit 0,25 M HCl für 60-75 Minuten. Anschließend wurde zur Denaturierung HCl durch 0,4 M NaOH ersetzt und für 4 Stunden gebloftet. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2x SSC-Puffer inkubiert und dann bei 80°C für 2 Stunden gebacken, um die DNA auf der Membran zu fixieren.

Herstellung und radioaktive Markierung der DNA-Sonden

25 ng der Sonden-DNA wurden mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 45 µl gebracht und bei 95° für 5 Minuten denaturiert, gefolgt von 5 Minuten auf Eis. Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA in das Rediprime-Gefäß (Amersham Rediprime II DNA Labelling System) gegeben und durch Zugabe von 5 µl [α -³²P]-dCTP gemäß Herstellerangaben radioaktiv markiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mit den

illustra ProbeQuant G-50 Micro Säulchen (Amersham) gemäß Herstellerangaben. Mit einem Szintillationszähler wurde die inkorporierte Radioaktivität gemessen. Die Werte lagen für alle Sonden im Sollbereich von >100.000 cpm.

Vor der Hybridisierung wurde die gelabelte Sonde bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

Tabelle 26: Sonden für Southern Blot

Sonden	Ursprung	Länge
Sonde 1 (5'-Sonde)	pBroad3, verdaut mit Not I	330 bp
Sonde 2 (Neo-Sonde)	pMC1-neo, verdaut mit Mlu/Sal	850 bp
Sonde 3 (3'-Sonde)	pRosa 26-3-2, verdaut mit Acc/Drd	370 bp

Hybridisierung

Die Membran wurde mit 2x SSC angefeuchtet und mit dem Hybridisierungspuffer Amersham Rapid-hyb (0,1 ml pro 1 cm² Membran) in eine Rollflasche gegeben und zur Prähybridisierung für 2 Stunden bei 65°C in einem Rotationshybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die frisch markierte Sonde in den vorgewärmten Rapid-hyb Hybridisierungspuffer in eine Rollflasche gegeben. Die Membran wurde bei 65°C über Nacht unter leichter Rotation hybridisiert.

Waschen und Entwickeln der Membran

Nach der Hybridisierung wurde die Membran mit Waschpuffer gewaschen, um die nicht gebundene Sonde zu entfernen. Die Waschzeiten und -puffer sind in Tabelle 27 aufgeführt. Mit einem Geigerzähler wurde die Radioaktivität nach den Waschschritten gemessen und bei einer Aktivität von 80-100cpm wurde die Membran in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie gelegt. Die Filmkassette wurde für bis zu 14 Tage bei -80°C gelagert und anschließend wurde der Röntgenfilm maschinell entwickelt.

Tabelle 27: Waschzeiten und -puffer für Southern Blot Membran nach Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Sonden	Waschpuffer	Temperatur	Waschdauer
Sonde 1/Sonde 2	2x SSC/0,1% SDS	65°C	20 Min.
	1x SSC/0,1%SDS	65°C	60 Min.
	1x SSC/0,1%SDS	65°C	60 Min.
	0,1x SSC/0,1%SDS	65°C	30 Min.

Sonde 3	4x SSC	65°C	20 Min.
	4x SSC	65°C	20 Min.

Stripping der Membran

Um eine Membran von der Sonde zu reinigen und sie anschließend erneut hybridisieren zu können, wurde die Membran zunächst für 30 Minuten bei 45°C in 0,4 M NaOH und anschließend für 15 Minuten bei 45°C in Stripping Lösung inkubiert. Die Membran konnte in der Folge wie oben angegeben erneut hybridisiert und weiter behandelt werden.

3.2.8 Mykoplasmen-Test

Die ES-Zellen wurden einem Mykoplasmen-Test unterzogen, um eine Mykoplasmenkontamination auszuschließen. Hierfür wurde das Venor® GeM Classic Mycoplasma PCR Detection Kit (Minerva Biolabs) verwendet. Die ES-Zellen wurden auf einer 24-well Platte mit antibiotikafreiem Medium bis zu einer 90-100% Konfluenz gezogen. 100 µl des Überstandes wurden in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 98°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert (5 Sekunden bei 13.200 rpm). 2 µl hiervon wurden gemäß Herstellerangaben in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß Herstellerangaben.

3.2.9 Blastozysteninjektion

Korrekt homolog rekombinierte ES-Zellen wurden zur Blastozysteninjektion und Embryonentransfer zu BV Transgenic Services, Belgien, verschickt. Hier erfolgte die Mikroinjektion der genetisch veränderten murinen embryonalen Stammzellen in murine Blastozysten und die Reimplantation in scheinchwangere Weibchen. Die entstehenden Jungtiere zeigten einen Chimärismus, der sich in der Fellfarbe widerspiegelte. Anhand dessen wurden für die weitere Zucht Tiere mit einem hohen Anteil an transgenen Zellen verwendet, da hierbei die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission des genetisch modifizierten Allels am höchsten war.

3.3 Tierexperimente

3.3.1 Tierhaltung und Mauslinien

Die Haltung der Mäuse erfolgte in einer SPF-Versuchstierhaltung in individuell belüfteten Käfigen. Alle Materialien, die in den Tierbereich gebracht wurden, wurden

zuvor autoklaviert oder chemisch desinfiziert. Gemäß den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) (Mähler et al., 2014; Nicklas et al., 2002) erfolgt ein Hygienemonitoring der Tiere mittels dirty-bedding-Sentinels. Alle durchgeführten Tierstudien entsprechen den Empfehlungen der FELASA und den Richtlinien der Europäischen Union.

Die *LSL-Kras*^{G12D}-Mauslinie wurde freundlicherweise von Dr. T. Jacks (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) und die *Ptf1a*^{Cre/+}-Mauslinie von Dr. H. Nakhai (Klinikum rechts der Isar, TU München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die *LSL-R26*^{lacZ/+} wurde in unserem Labor generiert (B. Seidler).

Mauslinien und Verpaarung

Um eine pankreasspezifische Expression des jeweiligen Transgens zu erreichen wurden die Tiere der Mauslinien *LSL-Kras*^{G12D}, *LSL-R26*^{lacZ/+} und der neu generierten *LSL-PIK3CA*^{H1047R} mit einer *Ptf1a*^{Cre/+}-Mauslinie verpaart.

3.3.2 Genotypisierung anhand genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Um genomische DNA von den Mäusen zur Genotypisierung zu gewinnen, wurde eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt. Hierzu wurde ein 2 mm langes Stück von der Schwanzspitze abgeschnitten und in 60 µl PCR-Lysepuffer (Soriano) bei 55°C für 1,5 Stunden lysiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 20 Minuten inaktiviert. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt und bei 14.000 rpm bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Bedingungen der Genotypisierungs-PCRs sind in Tabelle 28 (Spezifische Reaktionsbedingungen für Genotypisierungs-PCRs) aufgeführt. Es wurden 40 Zyklen zur Amplifikation durchgeführt.

Die Primer zur Genotypisierungs-PCR wurden so kreiert, dass anhand der Größe des PCR-Produktes eindeutig zwischen Wildtyp und mutiertem Allel unterschieden werden kann.

Mithilfe der PCR wurde auch der Erfolg der Rekombination des loxP flankierten transkriptionellen Stoppelementes in DNA-Proben aus Geweben überprüft. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 (Primer) aufgeführt.

Tabelle 28: Spezifische Reaktionsbedingungen für Genotypisierungs-PCRs

Genotypisierung	Denaturierung	Annealing	Extension	Bandengröße (bp)
<i>LSL-PIK3CA^{H1047R}</i> (Homo-/Heterozygotie bei intakter Stopp-Kassette)	95°C 45 Sek.	62°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	410 (mut mit LSL) 650 (WT)
<i>LSL-PIK3CA^{H1047R}</i> (Vorhandensein <i>LSL-PIK3CA</i>)	95°C 45 Sek.	60°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	900 (mut, ohne LSL) 630 (mut mit LSL)
<i>PIK3CA^{H1047R}</i> (Rekombinationserfolg - Deletion der Stopp-Kassette)	95°C 45 Sek.	55°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	900 (mut, ohne LSL)
<i>PIK3CA^{H1047R}</i> (pankreasspezifische Deletion der Stopp-Kassette)	95°C 45 Sek.	60°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	900 (mut, ohne LSL) 650 (WT)
<i>Ptf1a^{Cre/+}</i>	95°C 45 Sek.	60°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	400 (mut) 600 (WT)
<i>LSL-Kras^{G12D}</i>	95°C 45 Sek.	55°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	170 (mut, mit LSL) 270 (WT) 300 (mut, ohne LSL)
<i>LSL-R26^{lacZ/+}</i>	95°C 45 Sek.	62°C 1 Min.	72°C 1 Min. 30 Sek.	310 (mut) 600 (WT)

3.3.3 Sektion der Mäuse mit Organ- und Probenentnahme

Die Mäuse wurden durch Isofluran Inhalation und anschließenden Genickbruch getötet. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Das Tier wurde durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und die Organe entnommen und gewogen. Proben zur DNA Gewinnung wurden bei -20°C weggefroren oder direkt in PCR-Lysepuffer lysiert. Für Proben zur Proteinanalyse wurde ein Stück Gewebe in

ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, IP-Puffer (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) hinzugegeben und sofort mithilfe des Silent Crusher M (Heidolph, 6 F Aufsatz) homogenisiert. Nachdem die benötigten Proben entnommen worden waren, wurden die Organe für histologische Untersuchungen für 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert.

3.4 Histologie

3.4.1 Herstellung von Paraffin-Schnitten

Das Gewebe wurde in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4°C fixiert und anschließend dreimal für je 15 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben mithilfe des ASP300 tissue processor (Leica) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Microtom wurden 3 µm dicke serielle Schnitte zur weiteren Färbung angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

3.4.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H&E) der Gewebe-Schnitte

Zur Entparaffinierung der eingebetteten Gewebe wurde Roti®-Histol (Carl Roth) verwendet (zwei mal 15 Minuten). Anschließend wurde durch die Verwendung absteigender Alkoholreihen eine Rehydratation der Schnitte erreicht (je zwei mal 3 Minuten in 100% Alkohol, 96% Alkohol, 80% Alkohol und anschließend kurz in destilliertem Wasser). Die Schnitte wurden für 1 Minute in Hämatoxylin gefärbt, dann für 5-10 Minuten unter laufendem Wasser gewaschen und für 30 Sekunden in Eosin gefärbt und anschließend in destilliertes Wasser verbracht. Die erneute Dehydratation wurde durch ansteigende Alkoholreihen erreicht (2x 80% Alkohol, 2x 96% Alkohol, 2x 100% Alkohol). Die gefärbten Schnitte wurden für zwei mal 5 Minuten in Roti®-Histol (Carl Roth) gegeben und anschließend mithilfe des Eindeckmittels Pertex™ (Medite) mit einem Deckglas versehen.

3.4.3 Alcian blue Färbung der Gewebe-Schnitte

Nach Entparaffinierung und Rehydratation wie unter 3.4.2 beschrieben erfolgte für 15 Minuten die Färbung der Schnitte in Alcian Blue, pH 2,5. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in Wasser gewaschen und für etwa 1 Minute in Nuclear Fast Red gegengefärbt und anschließend erneut mit Wasser gewaschen. Es folgte die Dehydratation in Alkohol. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte in Roti®-Histol gegeben und mithilfe des Eindeckmittels Pertex™ mit einem Deckglas versehen.

3.4.4 β -Galaktosidase Färbung von Organen und Gewebeschnitten

Die Gewebe wurden in 4% Paraformaldehyd bei 4°C für 2 Stunden fixiert und dreimal für 30 Minuten in lacZ-Waschpuffer gewaschen. Um die β -Galaktosidase-Aktivität zu detektieren, wurde das Gewebe bei 37°C über Nacht in lacZ-Färbepuffer gegeben. Für die histologischen Analysen wurden von den Organen nach der Fixierung Cryoschnitte angefertigt, die 2 Stunden in 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert wurden und wie oben beschrieben gefärbt. Als Gegenfärbung wurde Eosin oder Nuclear Fast Red verwendet.

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden mit den jeweils angegebenen Medien bei 37°C und 5% CO₂ in Brutschränken kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen in Sterilwerkbänken.

Zur Passage und Aussaat der Zellen wurden diese mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst und vereinzelt. Durch Zugabe von Zellkulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Suspension wurde auf neue Flaschen oder Schalen, die frisches Medium enthielten überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach Trypsinisierung in frisches Medium aufgenommen und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in eiskaltem Einfriermedium gelöst, in Gefriergefäße (Nunc™) überführt und mithilfe des Isopropanol-Einfrierbehälters (Nalgene®) bei -80°C weggefroren. Nach 24 Stunden bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5.2 Transiente Transfektion von HEK293FT-Zellen

Um die Funktionalität des von *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} exprimierten Proteins *in vitro* zu testen wurden HEK293FT-Zellen mit dem Plasmid *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in pcDNA3.2/V5-DEST, bei dem zuvor die Stopp-Kassette entfernt worden war, transfiziert. Hierzu wurden HEK293FT-Zellen in 6-well Platten ausgesät und mittels Effectene Transfection Reagent (Qiagen) gemäß den Hersteller-Angaben mit dem Plasmid *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in pcDNA3.2/V5-DEST und dem Leervektor pcDNA3.2/V5-DEST transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte der Mediumwechsel mit FCS-freiem Medium, das entweder Tamoxifen (1 μ M) oder Ethanol enthielt. Etwa 42 Stunden nach der Transfektion wurden die Proteine zur weiteren Analyse geerntet.

3.6 Protein- und DNA-Isolation und Detektion

3.6.1 Protein-Isolation

Um Ganzzellextrakte zu gewinnen wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit IP-Puffer, dem ein Protease- und ein Phosphatase-Inhibitor zugesetzt war, lysiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis, nach der das Lysat für 20 Minuten bei -20°C weggefroren wurde. Nachdem es auf Eis wieder aufgetaut wurde, wurden die Lysate bei 13.200 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteingewinnung aus murinem Gewebe ist unter 3.3.3 (Sektion der Mäuse mit Organ- und Probenentnahme) beschrieben.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mithilfe des Bradford Assays (BioRad) bestimmt und die Proben anschließend auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Nach Aufnahme in Laemmli-Puffer wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann bei -20°C weggefroren.

3.6.2 Protein-Detektion mittels Western Blot

Es erfolgte eine vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese um die Proteine elektrophoretisch aufzutrennen (SDS-PAGE) (Burnette, 1981). 80 μg Protein wurden auf ein Acrylamid-Trenngel geladen. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 100 V gemäß ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit einer WET-Blottapparatur auf eine Immobilon Transfermembran (Millipore) übertragen (150 mA, 40 Minuten).

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurde die Membran für 1 Stunde in einer 1:1 Verdünnung von Odyssey Blockingpuffer (LI-COR) und PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem in Blockingpuffer verdünnten Erst-Antikörper unter leichter Agitation bei 4°C inkubiert. Nachdem die Membran 3 mal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Nach einem weiteren Waschschrift unter Lichtschutz wurde die Membran im Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) gescannt.

3.6.3 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus Geweben und Zellen erfolgte mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) gemäß Hersteller-Angaben.

3.7 Statistische Analyse

Datensätze wurden durch Analyse der Varianz gefolgt von Students t-Test miteinander verglichen. Es erfolgte eine Bonferroni Korrektur der P-Werte für multiples Testen. Kaplan-Meier Überlebenskurven wurden durch log-rank Test verglichen. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism und SigmaStat.

4 Ergebnisse

Um die Rolle des PI3K/AKT Signalwegs in der Karzinogenese des Pankreas studieren zu können, entwickelten wir zwei neue knock-in Mausmodelle, die ein latent onkogenes *PIK3CA*^{H1047R} Allel tragen, das für p110 α ^{H1047R} codiert. In einem Modell ist *PIK3CA*^{H1047R} an den modifizierten Östrogen Rezeptor ER^{T2} fusioniert, wodurch es durch Zugabe von Tamoxifen inaktiviert werden kann, da es in den Zellkern transloziert. Die Targeting-Vektoren tragen eine 5'-gelegene Stopp-Kassette, die eine Neomycin-Resistenz (PGK-neo Resistenzkassette), zwei Polyadenylierungsstellen (pA) und Stoppkodons in jedem Leseraster enthält. Die Stopp-Kassette wird von zwei loxP Stellen flankiert (loxP-stop-loxP; LSL), wodurch das Transgen gewebspezifisch exprimiert werden kann. Der Ziellocus für das Transgen war der murine *Rosa26* Locus. Der linearisierte Targeting-Vektor wurde mittels Elektroporation in murine embryonale Stammzellen (129S6) eingebracht. Die ES-Zellen wurden mit Geneticin selektioniert und mittels PCR überprüft. Die korrekte homologe Rekombination wurde durch eine Southern Blot Analyse mit einer ³²P-markierten 5'-gelegenen externen Sonde bzw. einer internen Neomycin-Sonde überprüft. 100% der analysierten *PIK3CA*^{H1047R}-integrierten ES-Zellklone und 83% (5/6) der *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-integrierten ES-Zellklone zeigten die gewünschte homologe Rekombination. Zwei Klone wurden durch BV Transgenic Services (Belgien) in Blastozysten injiziert. Die Transmission des Zielalles in die Keimbahn wurde bei allen injizierten Klonen erreicht. Durch Kreuzung des *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Allels mit *Ptf1a*^{Cre/+} Mäusen wurde *PIK3CA*^{H1047R} pankreasspezifisch exprimiert und die Aktivierung des PI3K Signalwegs funktionell *in vivo* analysiert. Zudem verglichen wir das *LSL-PIK3CA*^{H1047R} Modell mit dem etablierten *LSL-Kras*^{G12D} Modell. Mäuse des *Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} Modells entwickeln ADMs und PanINs, die dann mit einiger Latenz zu metastasierenden PDACs voranschreiten. Die *Kras*^{G12D}-induzierte Karzinogenese rekapituliert akkurat die menschliche Erkrankung und gilt daher als etabliertes murines PDAC-Modell (Hingorani et al., 2003). Um zu eruieren, ob der PI3K Signalweg ein relevanter Effektor von onkogenem Kras im Pankreaskarzinom ist, verglichen wir diese beiden Modelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* miteinander.

4.1 Klonierung von *PIK3CA*^{H1047R} und *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} zur Generierung zweier neuer *Rosa26*-knock-in Mauslinien

Ausgehend von dem Vektor RCAS-*PIK3CA*^{H1047R}, der freundlicherweise von Dr. Peter Vogt zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte die Klonierung des Targeting-Vektors pRosa26-*LSL-PIK3CA*^{H1047R}. Der Vektor RCAS-*PIK3CA*^{H1047R} trägt das Gen

PIK3CA, das für p110 α codiert und an der Position 1047 eine Punktmutation aufweist, die zu den hot spot Mutationen zählt und den Aminosäuren-Austausch von Histidin (H) gegen Arginin (R) zur Folge hat.

4.1.1 Klonierung *PIK3CA*^{H1047R} in Rosa26 Targeting-Vektor

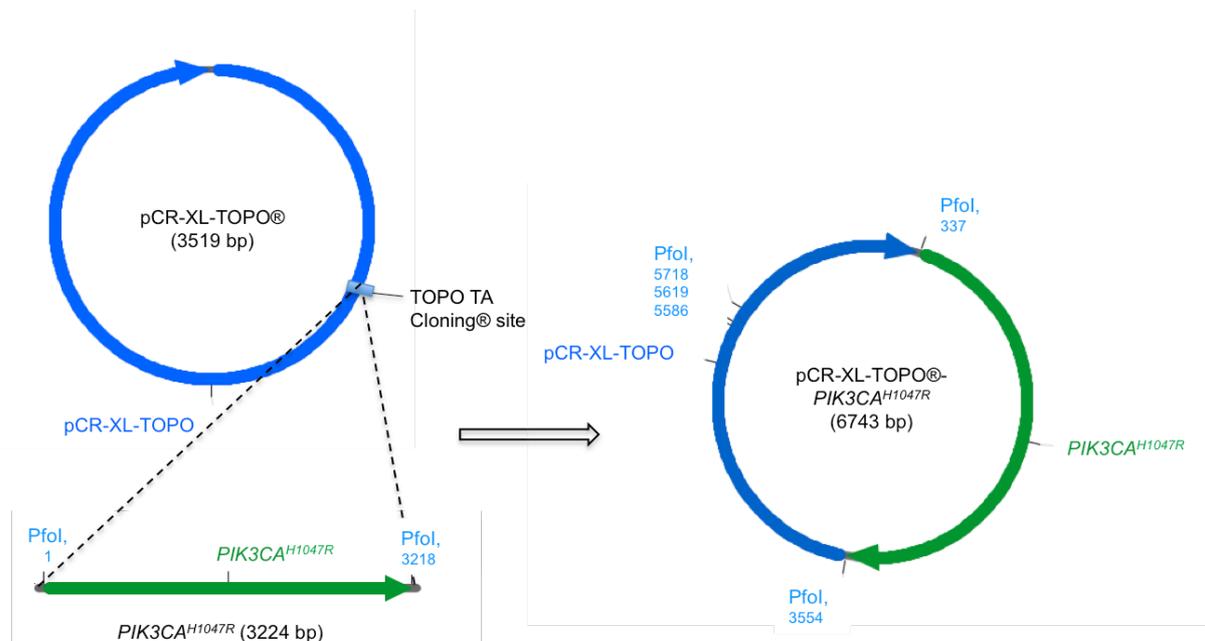


Abbildung 2: 1. Klonierungsschritt: Einklonierung von *PIK3CA*^{H1047R} in pCR-XL-TOPO®

Die codierende Sequenz für *PIK3CA*^{H1047R} wurde mittels PCR amplifiziert. Durch Verwendung des Primers PI3K-ms-pfo-UP wurde eine PfoI-Schnittstelle am 5'-Ende eingefügt. Das Stoppcodon TAA sowie eine weitere PfoI-Schnittstelle wurden mithilfe des Rückwärts-Primers PI3K-mstaa-pf-RP am 3'-Ende eingefügt. Nach Amplifikation des Plasmids erfolgte die Konzentrierung und Reinigung des PCR-Produktes mithilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen). Anschließend erfolgte ein A-tailing und die Klonierung in den pCR®-XL-TOPO® Vektor (Invitrogen) (siehe Abbildung 2) und die Transformation des so entstandenen Plasmids (*PIK3CA*^{H1047R} in pCR-XL-TOPO®) mittels Hitzeschockmethode in chemisch kompetente E.coli (One Shot® TOP10, Invitrogen). Mittels Screening PCR (mit den Primern pi3k-seq3 und pi3k-seq4) wurden die positiven Klone detektiert und anschließend nach weiterer Anzucht Plasmidpräparationen mit Qiaprep Spin Miniprep Kit bzw. QIAGEN Plasmid Midi Kit durchgeführt.

Zur Überprüfung des Plasmids erfolgte zum einen ein enzymatischer Verdau mit EcoRI, zum anderen die Sequenzierung (durch die Firma GATC), die die Richtigkeit der *PIK3CA*^{H1047R} Sequenz bestätigen konnten.

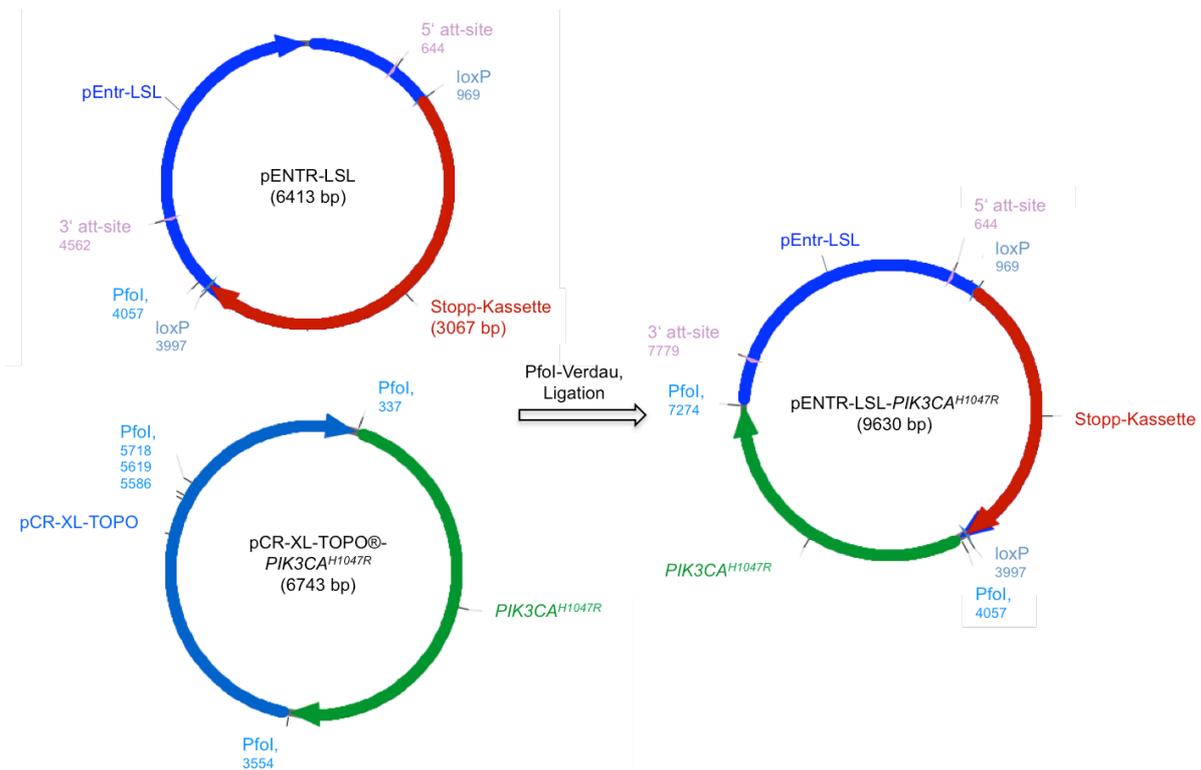


Abbildung 3: 2. Klonierungsschritt: Ligation von $PIK3CA^{H1047R}$ mit pENTR-LSL nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease PfoI

Nachdem die Richtigkeit des Plasmids bestätigt war, erfolgte die erneute Anzucht und Plasmidpräparation und anschließend ein Verdau des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease PfoI, und eine anschließende Gelextraktion des 3217 bp großen Fragments mit der $PIK3CA^{H1047R}$ Expressionskassette mithilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen). Der Zielvektor pENTR-LSL, der über eine Multiple Cloning Site und zwei Polyadenylierungsstellen (pA) verfügt, wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease PfoI verdaut, wodurch dieser linearisiert vorlag. Nun folgte wie in Abbildung 3 dargestellt die Ligation der aufgereinigten $PIK3CA^{H1047R}$ Expressionskassette mit dem linearisierten Vektor pENTR-LSL, wodurch pENTR-LSL- $PIK3CA^{H1047R}$ entstand und anschließend die Transformation in chemisch kompetente E.coli (One Shot® Stbl3™, Invitrogen). Zum Screen erfolgten zwei PCRs, zum einen mit den Primern Pi3K-3449-ForP und pBroad pA-5268-LP, zum anderen mit pi3k-seq3 und pi3k-seq4.

Nach Anzucht und Plasmidpräparation wurde das Plamid zur Kontrolle mit der Restriktionsendonuklease HindIII verdaut und das Plasmid wurde erneut sequenziert ausgehend von dem Primer pGL3-pA-Pause-UP.

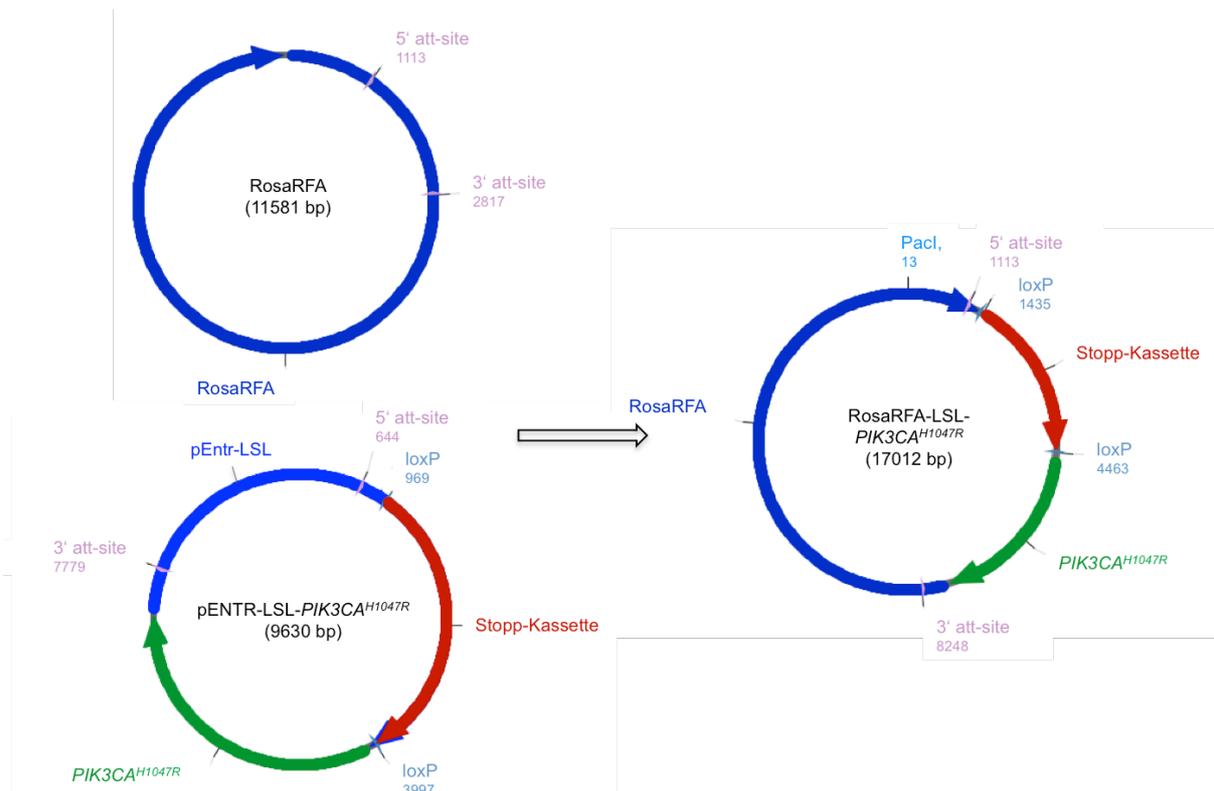


Abbildung 4: 3. Klonierungsschritt: Klonasereaktion von $LSL-PIK3CA^{H1047R}$ in Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA

Anschließend erfolgte der Transfer der $LSL-PIK3CA^{H1047R}$ pA Kasette in den Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA mittels Klonasereaktion mithilfe des Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen) (siehe Abbildung 4) und die Transformation in chemisch kompetente E.coli (One Shot® Stbl3™, Invitrogen) mittels KCM-Methode. Da diese Reaktion hocheffizient ist, erfolgte die Anzucht und Plasmidpräparation ohne vorherige Screen-PCR. Das Plasmid RosaRFA-LSL- $PIK3CA^{H1047R}$ wurde durch Checkverdau mit BstX1 und BglII überprüft.

4.1.2 Klonierung $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ in Rosa26 Targeting-Vektor

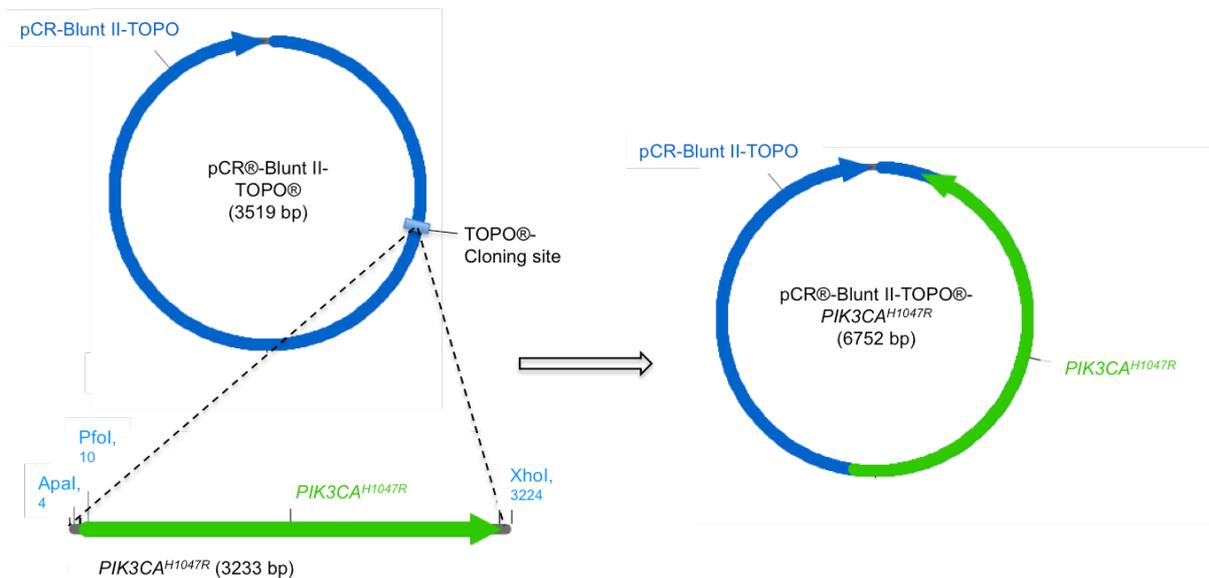


Abbildung 5: 1. Klonierungsschritt: Ligation von $PIK3CA^{H1047R}$ mit pCR®-Blunt II-TOPO®

Für die Klonierung des $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ -Konstruktes dienten $PIK3CA^{H1047R}$ in RCAS sowie ER^{T2} in pBluescript SK+ (modifiziert von Stratagene) als Ausgangsvektoren. Die Primer wurden so kreiert, dass der Forward Primer Pi3kos-ForP1 über eine Apal- und PfoI-Restriktionsstelle verfügte. Der Reverse Primer Pi3kos-RevP1 enthielt eine XhoI-Schnittstelle. $PIK3CA^{H1047R}$ wurde mithilfe der Primer Pi3kos-ForP1 und Pi3kos-RevP1 amplifiziert und aufgereinigt sowie konzentriert (QIAGEN Minelute, Qiagen). Anschließend erfolgte wie in Abbildung 5 gezeigt die Ligation in pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) und die Transformation mittels KCM-Methode in chemisch kompetente E.coli. Die Screen-PCR mit Pi3kos-ForP1 und Pi3kos-RevP1 zeigte die Insertion und mit M597Blue-UP und Pi3kos-RevP1 wurde die korrekte Richtung der Insertion bestimmt. Nach Anzucht und Plasmidpräparation wurde das Plasmid pCR®-Blunt II-TOPO®- $PIK3CA^{H1047R}$ durch GATC sequenziert. Für die Sequenzierung wurden die Primer M597Blue-UP, M831Blue-RP, GATC-pi3k-lp3115-109280, GATC-pi3k-up828-109279, pi3k-seq3 und pi3k-seq4 verwendet. Nachdem die Korrektheit der Insertion und die Sequenz bestätigt waren, wurde mit diesem Plasmid weiter gearbeitet.

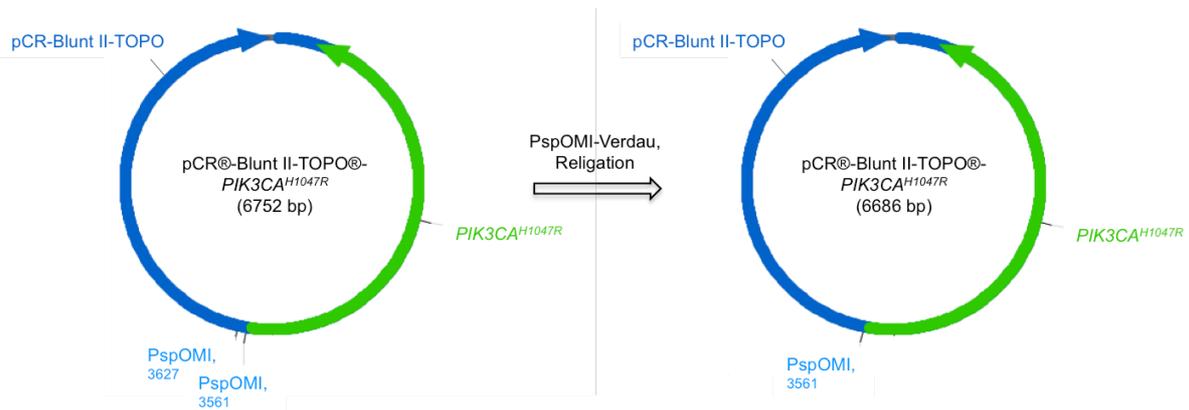


Abbildung 6: 2. Klonierungsschritt: Verdau von pCR®-Blunt II-TOPO®-PIK3CA^{H1047R} mit der Restriktionsendonuklease PspOMI und anschließende Religation

Der nächste Schritt bestand darin, das PIK3CA^{H1047R}-Fragment mit dem ER^{T2}-Fragment zu verbinden, indem PIK3CA^{H1047R} in das bestehende ER^{T2}-pBluescript-Konstrukt inkloniert wurde. Dafür wurde pCR®-Blunt II-TOPO®-PIK3CA^{H1047R} zunächst mit PspOMI verdaut, hitzeinaktiviert und dann religiert, um die zweite PspOMI-Schnittstelle zu entfernen (siehe Abbildung 6). Es folgte die Transformation mittels KCM-Methode in chemisch kompetente E.coli (One Shot® TOP10, Invitrogen). Ohne Notwendigkeit einer vorherigen Screen-PCR erfolgte die Plasmid-Präparation mit anschließendem Check-Verdau zum einen mit XhoI und zum anderen mit PspOMI, XhoI und RsrII, in dem sich alle Plasmide als korrekt herausstellten.

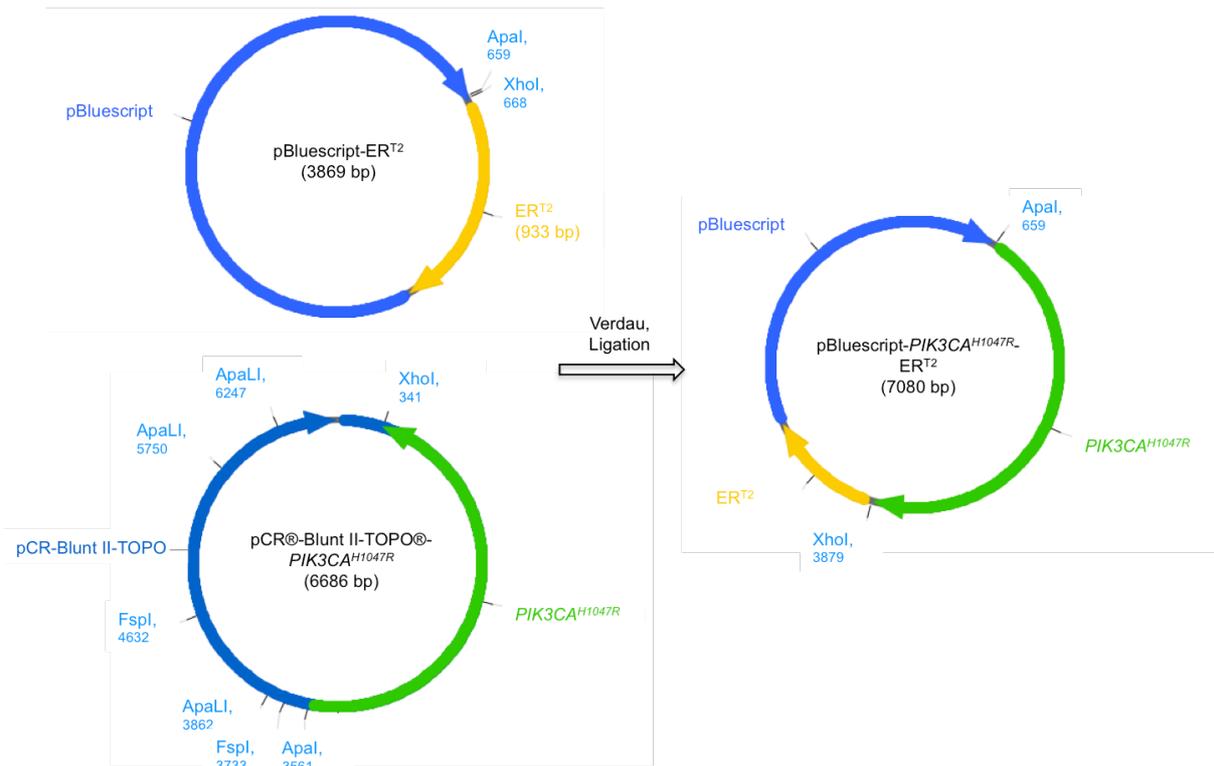


Abbildung 7: 3. Klonierungsschritt: Ligation von *PIK3CA*^{H1047R} mit pBluescript-ER^{T2} nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen Apal und XhoI

Es erfolgte eine Plasmid-Präparation des religierten pCR®-Blunt II-TOPO®-*PIK3CA*^{H1047R} Vektors (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Qiagen) und Verdau des Plasmids über Nacht mit Apal, FspI, ApaLI und XhoI mit anschließender Gelextraktion des 3220 bp großen *PIK3CA*^{H1047R}-Fragments (Qiaquick gel extraction kit, Qiagen). Von pBluescript-ER^{T2} erfolgte eine Plasmid-Präparation (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) und Verdau des Plasmids mit Apal und XhoI. Um eine Religation zu verhindern erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA mittels Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP), dann wurde pBluescript-ER^{T2} in die Ligation mit dem verdauten und aus dem Gel extrahierten *PIK3CA*^{H1047R} eingesetzt (siehe Abbildung 7). Die Ligrationsreaktion wurde mittels KCM-Methode in chemisch kompetente E.coli (One Shot® TOP10, Invitrogen) transformiert. Die Screen-PCR erfolgte mit pi3k-seq3 und pi3k-seq4 sowie Pi3K-3449-ForP und Cre-ER-T2-sc-LP1. Nach Anzucht und Plasmidpräparation (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) eines korrekten Klons von pBluescript-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} wurde dieser in einem Check-Verdau mit PspOMI und XhoI nochmals überprüft.

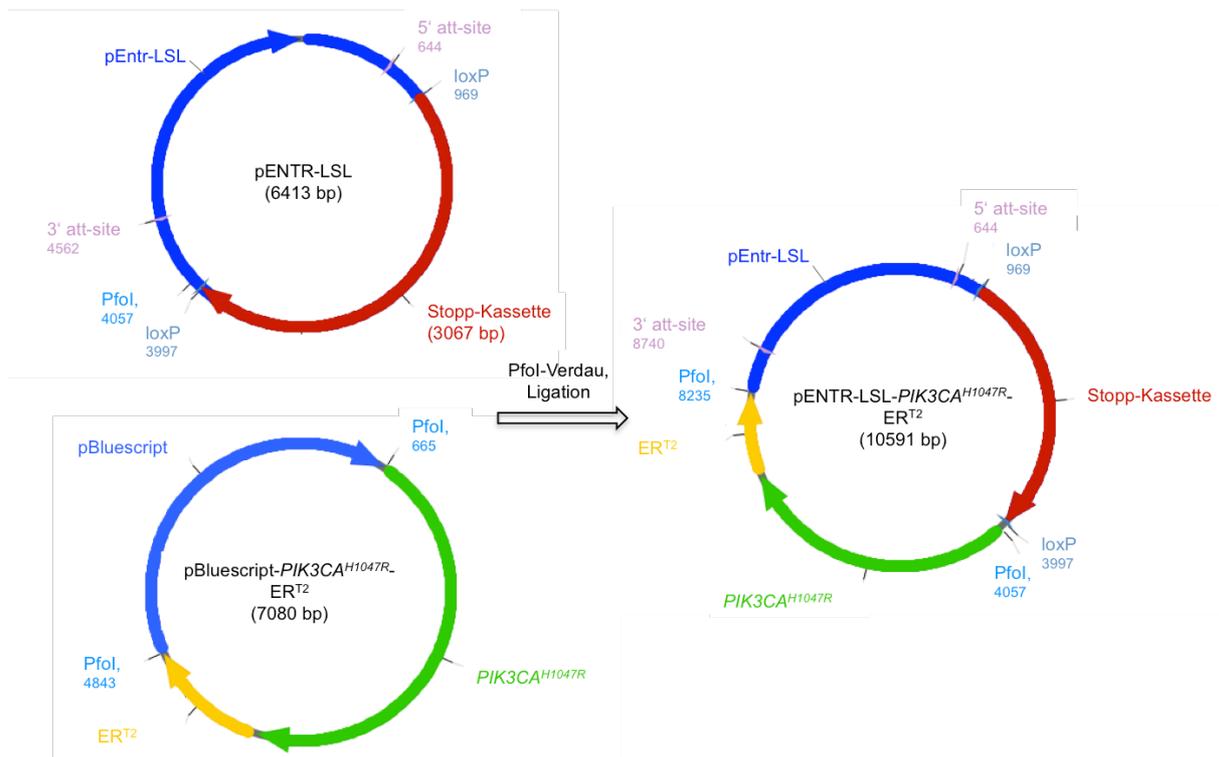


Abbildung 8: 4. Klonierungsschritt: Ligation von *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} mit pENTR-LSL nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease PfoI

Der nächste Klonierungsschritt ist in Abbildung 8 dargestellt. Hierfür musste das *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-Konstrukt aus dem pBluescript Vektor herausgeschnitten und in den pENTR-LSL Vektor inkliert werden. Dafür wurde pBluescript-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} mit der Restriktionsendonuklease PfoI verdaut und anschließend ein präparatives Gel mit Extraktion des entsprechenden Fragmentes (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen) vorgenommen. Der Zielvektor pENTR-LSL, der über eine Multiple Cloning Site und zwei Polyadenylierungsstellen (pA) verfügt, wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease PfoI verdaut, wodurch dieser linearisiert vorlag. Anschließend folgte die Ligation von *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in pENTR-LSL. Der Ligationsansatz aus *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in pENTR-LSL wurde mittels KCM-Methode in chemisch kompetente E.coli (One Shot® Stbl3™, Invitrogen) transformiert. Die Screen-PCR wurde zum einen mit pi3k-seq3 und pi3k-seq4 durchgeführt, zum anderen mit Pi3K-3449-ForP und pBroad pA-5268-LP. Nach Anzucht und Plasmidpräparation (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) wurde das Plasmid pENTR-LSL-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} mit ApaI und KpnI verdaut, wodurch sich bei allen Plasmiden die korrekte Insertion des Fragments bestätigen ließ. Zur Kontrolle wurde das Plasmid pENTR-LSL-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} einer Sequenzierung (GATC) unterzogen (Primer pGL3-pA-Pause-UP).

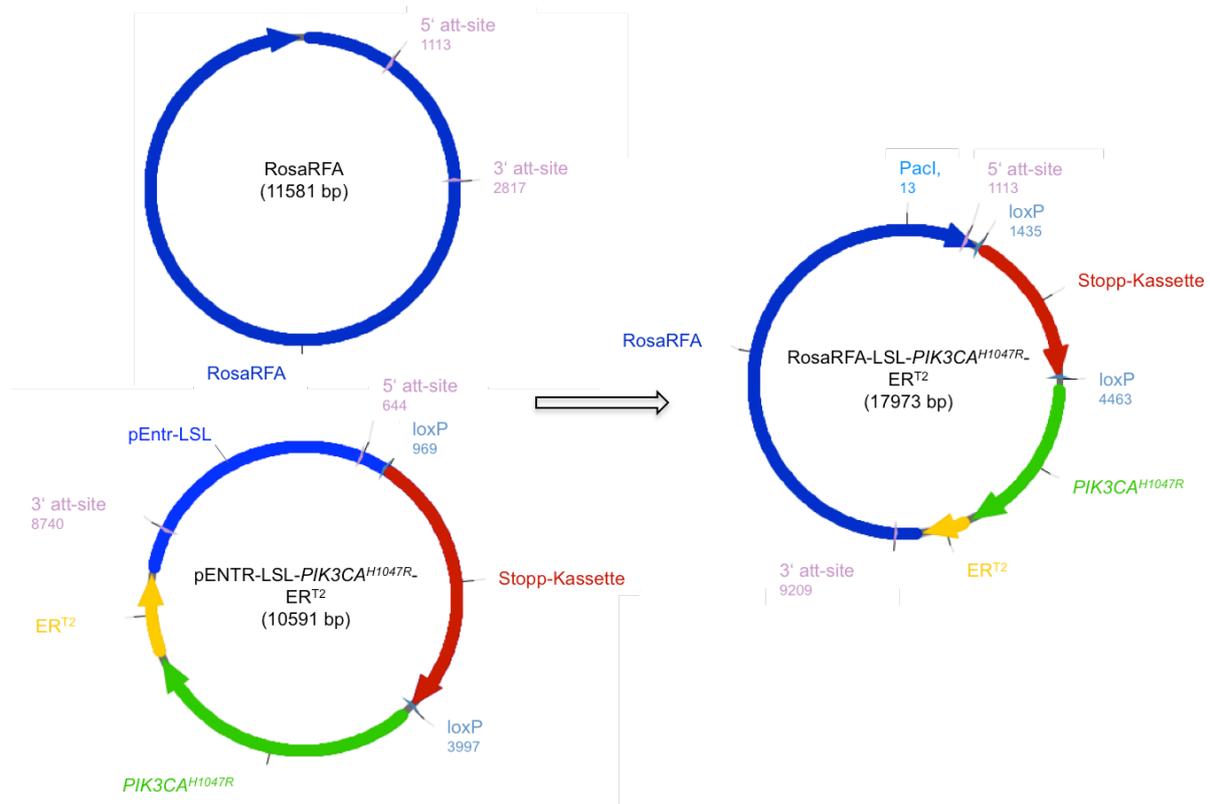


Abbildung 9: 5. Klonierungsschritt: Klonasereaktion von $LSL-PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ in Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA

Im letzten Schritt wurde das Konstrukt aus gefloxter Stopp-Kassette, $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ und Polyadenylierungsstelle über eine Klonasereaktion (Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix, Invitrogen) in den Rosa26 Targeting-Vektor RosaRFA eingebracht (siehe Abbildung 9) und mittels KCM-Methode in chemisch kompetente E.coli transformiert (One Shot® Stbl3™, Invitrogen). Ohne Notwendigkeit einer vorherigen Screen-PCR erfolgte direkt die Anzucht und Plasmidpräparation von RosaRFA-LSL- $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) mit anschließendem Check-Verdau mit NcoI, in dem sich alle Plasmide als korrekt herausstellten. Vor der Elektroporation erfolgte die Linearisierung des Plasmids durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease PaclI.

4.2 Überprüfung des $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ -Konstruktes *in vitro*

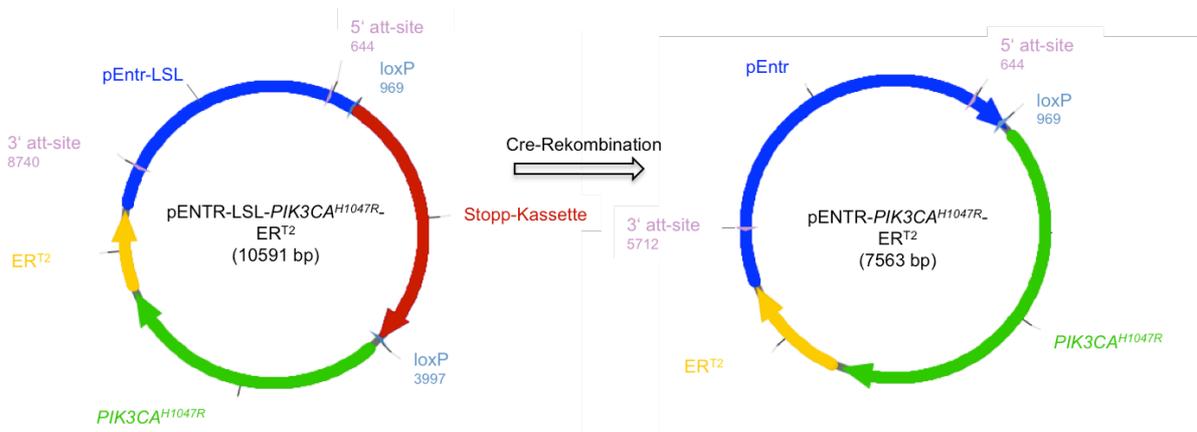


Abbildung 10: Exzision der loxP-flankierten Stopp-Kassette mittels Cre-Rekombinase

Nachdem für das Funktionieren eines Proteins auch seine Tertiär- und Quartärstruktur wichtig ist, war es notwendig, die Funktionalität des Fusionskonstruktes aus $PIK3CA^{H1047R}$ und $ERT2$ *in vitro* zu testen, bevor dieses Konstrukt in die murinen embryonalen Stammzellen eingebracht wird. Dafür wurde zunächst aus dem Vektor $pENTR-LSL-PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ die loxP-flankierte Stopp-Kassette mittels Cre-Rekombinase entfernt wie in Abbildung 10 gezeigt, um eine Expression des Konstruktes *in vitro* zu ermöglichen. Es folgte der Verdau des Cre-Reaktionsansatzes mit der Restriktionsendonuklease *SpeI*, die lediglich in der Stopp-Kassette schneiden würde, mit anschließender Transformation mittels KCM-Methode in One Shot® *Stbl3 E.coli* (Invitrogen). Es wurden Plamidpräparationen (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) durchgeführt und im Check-Verdau mit *HindIII* und *BglIII* überprüft. Hier bestätigte sich die erfolgreiche Deletion der Stopp-Kassette.

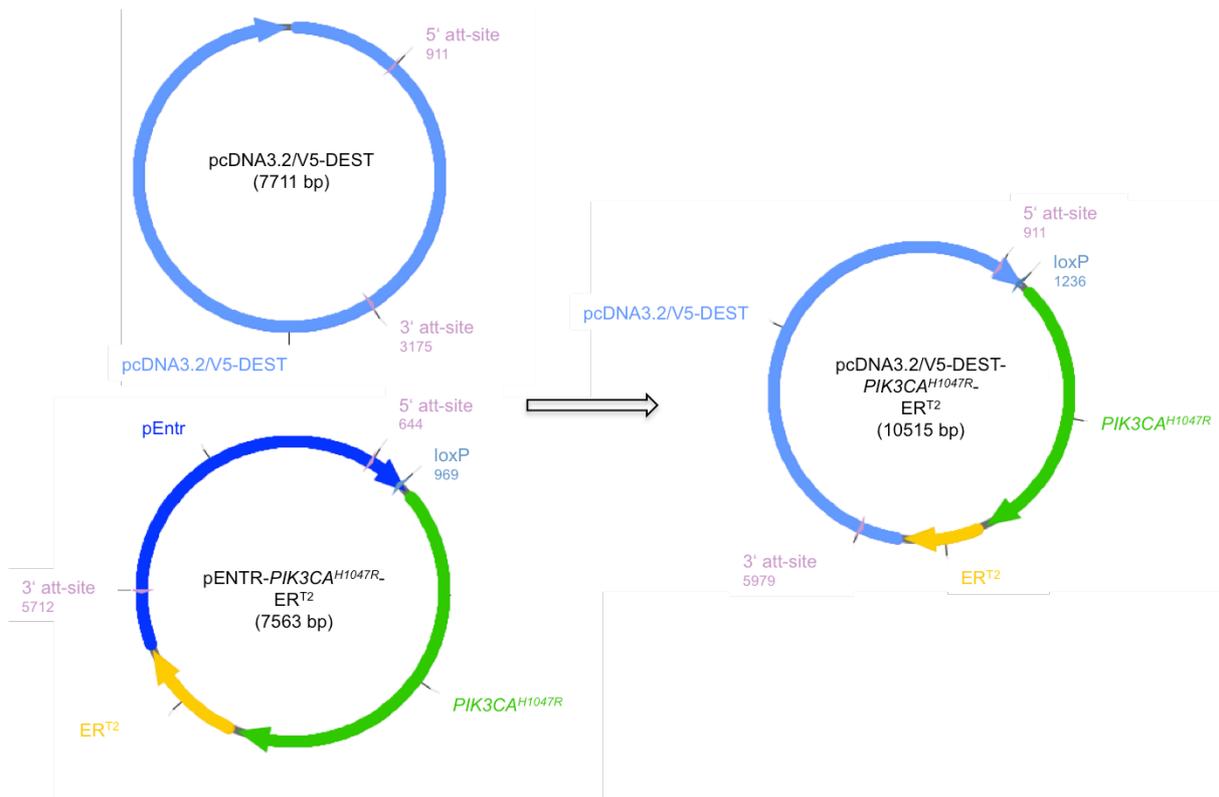


Abbildung 11: Klonasereaktion von $PIK3CA^{H1047R-ERT^2}$ in pcDNA3.2/V5-DEST

Nun erfolgte wie in Abbildung 11 gezeigt die Umklonierung mittels Klonasereaktion in den Vektor pcDNA3.2/V5-DEST (Invitrogen) mit anschließender Transformation in chemisch kompetente E.coli (One Shot® Stbl3™, Invitrogen). Nach Anzucht und Präparation des Plasmids pcDNA3.2/V5-DEST- $PIK3CA^{H1047R-ERT^2}$ (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) wurde ein Check-Verdau mit BglII durchgeführt. Nachdem sich hier die Richtigkeit des Plasmids bestätigt hatte, erfolgte die transiente Transfektion in HEK293FT-Zellen mit Hilfe des Effectene Transfection Reagent (Qiagen). Als Kontrolle diente ein Transfektionsansatz mit dem Leervektor pcDNA3.2/V5-DEST. Am Tag nach der Transfektion erfolgte der Mediumwechsel mit FCS-freiem Medium und unter Zugabe von Tamoxifen bzw. Ethanol als Kontrolle. Nachdem die Zellen für 24 Stunden in FCS-freiem Medium gezogen worden waren, erfolgte die Proteinernte. Als Maß für die PI3K-Aktivität wurden die Level des phosphorylierten AKT mittels Western Blot bestimmt. Zur Detektion von Phospho-AKT wurde der Phospho-Akt-Ser473 Antikörper (Cell Signaling) verwendet.

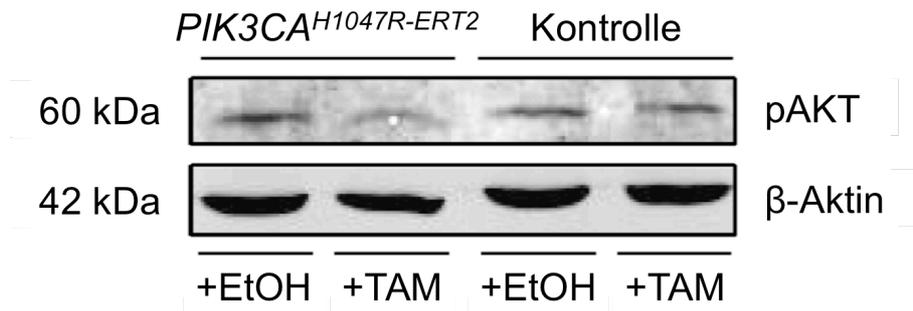


Abbildung 12: Western Blot-Analyse von phospho-AKT (pAKT) von HEK293FT-Zellen nach transients Transfektion mit pcDNA3.2/V5-DEST-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2}
 Nach Transfektion mit pcDNA3.2/V5-DEST-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} (*PIK3CA*^{H1047R-ERT2}) zeigte sich nach Zugabe von Tamoxifen (TAM) eine geringere AKT Phosphorylierung als nach Zugabe von Ethanol (EtOH) bzw. als bei der Kontrolle (Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3.2/V5-DEST).

Nach Zugabe von Tamoxifen zeigte sich bei den mit pcDNA3.2/V5-DEST-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} transfizierten Zellen eine geringere AKT Phosphorylierung als nach Ethanolzugabe und als bei der Kontrolle, also den mit dem Leervektor pcDNA3.2/V5-DEST transfizierten Zellen. Nachdem sich gezeigt hatte, dass das Konstrukt aus *PIK3CA*^{H1047R} und ER^{T2} *in vivo* den gewünschten Effekt nach Tamoxifenzugabe zeigt, wurde die Stammzellkultur durchgeführt.

4.3 Generierung der embryonalen Stammzellen mit knock-in von *PIK3CA*^{H1047R} und *PIK3CA*^{H1047R-ERT2} im *Rosa26* Locus

Um eine ausreichende Menge endotoxinfreier DNA zu erhalten, wurde mit dem EndoFree plasmid Maxi Kit (Qiagen) eine Maxi Präparation des Targeting-Vektors LSL-*PIK3CA*^{H1047R} in RosaRFA sowie von LSL-*PIK3CA*^{H1047R-ERT2} in RosaRFA durchgeführt. Durch Verdau des Zielplasmids mit PacI wurde das Plasmid linearisiert, um die Rekombinationseffizienz zu erhöhen.

Je 30 µg DNA wurden mit PacI linearisiert und für die Elektroporation in die murinen embryonalen Stammzellen W4/129S6 eingesetzt. Über homologe Rekombination erfolgte die Insertion der jeweiligen Kasette in den *Rosa26* Locus. In Abbildung 13 ist die Rekombination von LSL-*PIK3CA*^{H1047R} in den *Rosa26* Locus sowie die Bindungsstellen der Southern Blot Sonden schematisch abgebildet.

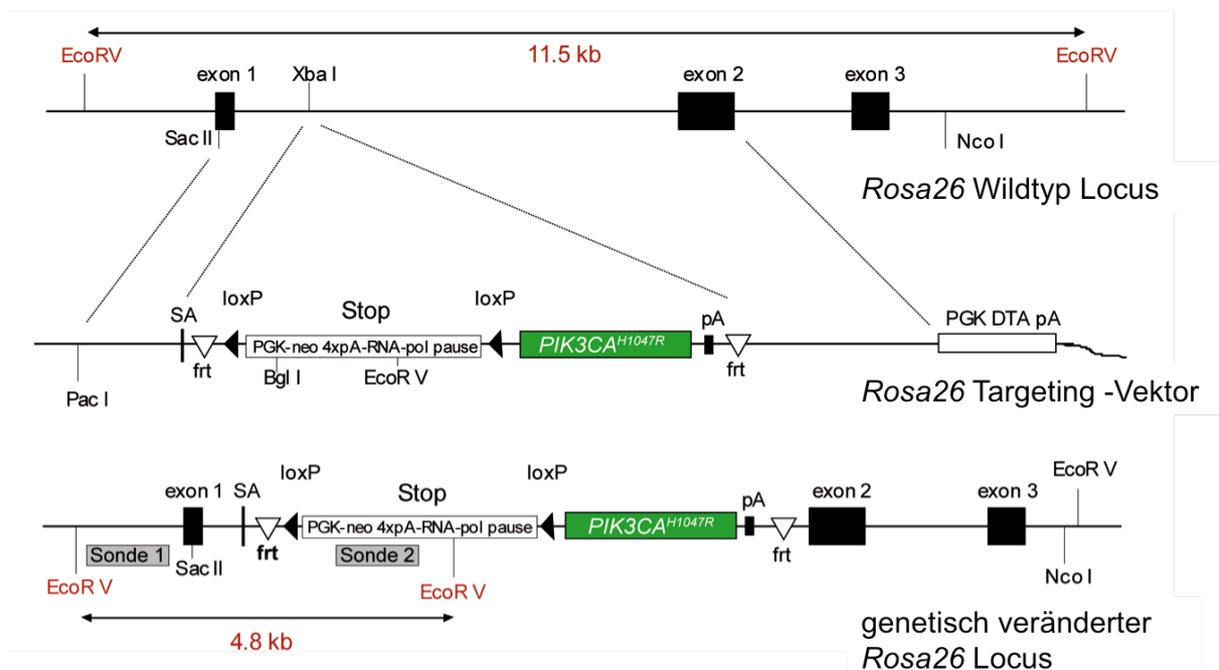


Abbildung 13: Schematische Darstellung des gezielt genetisch veränderten *Rosa26* Locus mit loxP-Stop-loxP-*PIK3CA*^{H1047R} Expressionskassette

von oben nach unten: Schematische Darstellung des *Rosa26* Wildtyp Locus; *Rosa26* Targeting-Vektor mit der 5'-gelegenen loxP-stop-loxP Kasette und der 3'-gelegenen p110 α ^{H1047R} (*PIK3CA*^{H1047R}) Expressionskassette; gezielt genetisch veränderter *Rosa26* Locus. Restriktionsstellen, Größe der DNA-Fragmente und Bindungsstellen von Sonde 1 (5'-Sonde) und Sonde 2 (Neo-Sonde) sind eingezeichnet.

18 Stunden nach der Elektroporation wurden die ES-Zellklone durch Verwendung eines Geneticin-haltigen Mediums selektioniert. Nach sieben Tagen wurden Einzelklone gepickt und anschließend eine Screening-PCR durchgeführt. Von den 126 gepickten *PIK3CA*^{H1047R}-Klonen waren sechs in der PCR positiv, bei den *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-Klonen wurden 144 Einzelklone gepickt, von denen ebenfalls 6 in der PCR positiv waren.

Von den in der PCR positiven ES-Zellklonen wurde ein Mykoplasmen-Test durchgeführt, nachdem diese in antibiotikafreiem Medium gezogen worden waren. Es konnte bei allen Klonen eine Mykoplasmenkontamination ausgeschlossen werden.

Von den positiven Klonen wurde genomische DNA isoliert und ein Southern Blot durchgeführt. Wildtyp-DNA wurde als Negativkontrolle verwendet.

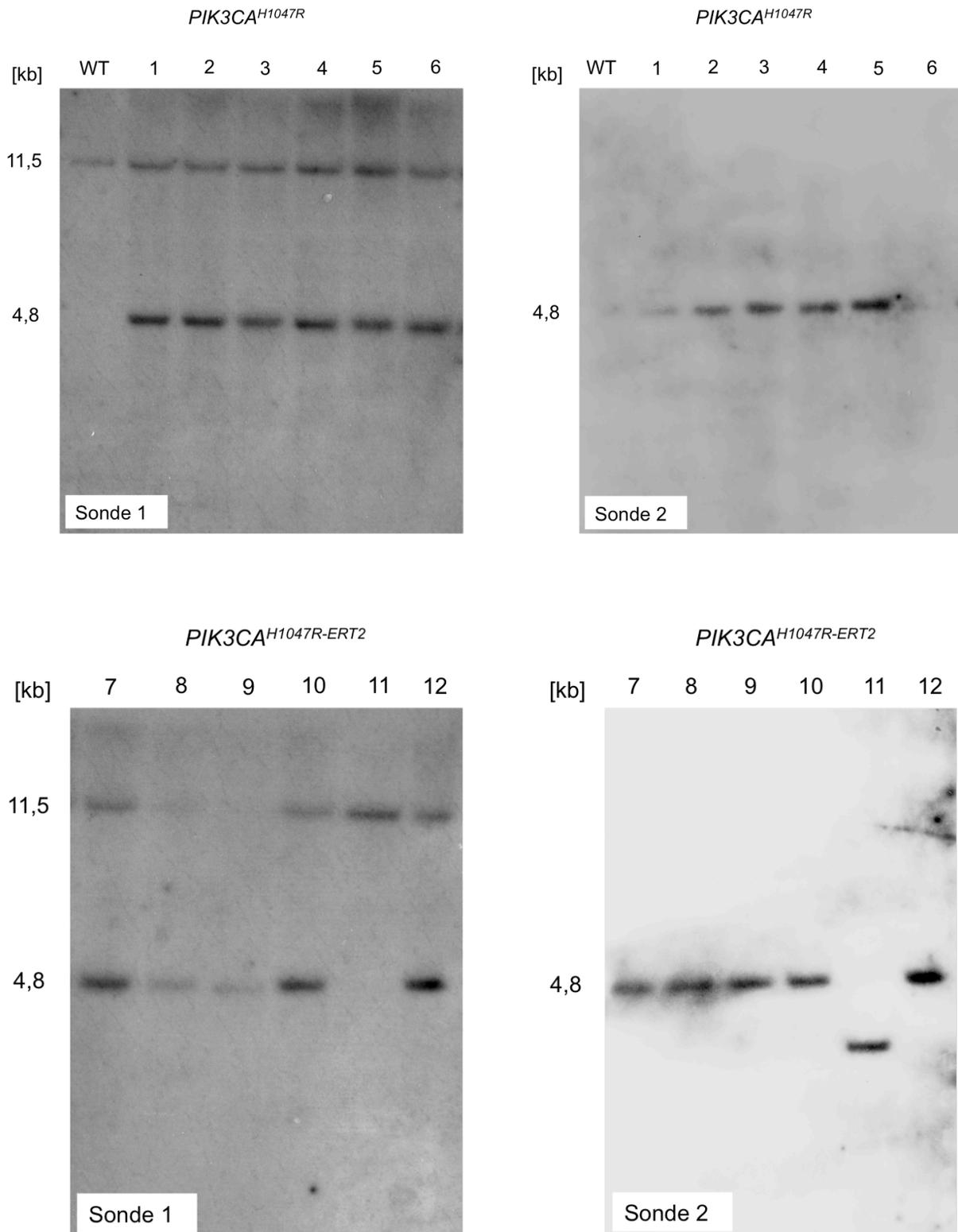


Abbildung 14: Southern Blot-Analyse von DNA aus embryonalen Wildtyp-Stammzellen (WT) und gezielt genetisch veränderten embryonalen Stammzellen (Probe 1-12) nach Verdau mit EcoRV. Die erwarteten Banden für die Wildtyp- und genetisch veränderten Allele sind gekennzeichnet. Sonde 1 (5'-Sonde): WT: 11,5 kb, mutiertes Allel: 4,8 kb. Sonde 2 (Neo-Sonde): WT: keine Bande, mutiertes Allel: 4,8 kb.

Mittels Southern Blot-Analyse (siehe Abbildung 14) konnte bei $PIK3CA^{H1047R}$ bei allen 6 Klonen die korrekte Insertion des Plasmids bestätigt werden. Bei $PIK3CA^{H1047R-ERT2}$ zeigte sich bei 5 von 6 Klonen die korrekte Insertion.

Anschließend wurden zwei der positiven ES-Zellklone mit dem $PIK3CA^{H1047R}$ -knock-in im *Rosa26* Locus in Blastozysten injiziert (BV Transgenic Services (Belgien)). Hierdurch konnten von beiden ES-Zellklonen hochgradig chimäre Tiere (Chimärismus >90%) generiert werden, die anschließend mit C57BL6/J Tieren verpaart wurden, um die Keimbahntransmission des $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Allels zu erzielen. Dies gelang für beide ES-Zellklone, sodass die resultierenden Tiere anschließend weiter charakterisiert werden konnten.

4.4 Charakterisierung und Analyse der $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mauslinie

Die Expression von $PIK3CA^{H1047R}$ wird durch die 5'-gelegene loxP flankierte Stopp-Kassette verhindert, bis die Stopp-Kassette durch Cre-Rekombination entfernt wird. Um die Expression von $p110\alpha^{H1047R}$ spezifisch im Pankreas zu aktivieren, wurden die $LSL-PIK3CA^{H1047R}$ Mäuse mit Tieren der etablierten $Ptf1a^{Cre/+}$ Mauslinie gekreuzt, wodurch $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Tiere entstanden. Im Laufe der Embryonalentwicklung kommt es pankreasspezifisch zur Expression der Cre-Rekombinase und damit zur Deletion der Stopp-Kassette, wodurch es zur Expression von $p110\alpha^{H1047R}$ in pankreatischen Azini, Gängen und Inseln kommt. Der Mechanismus der Cre-Rekombination ist in Abbildung 15 dargestellt. Hierdurch ist es möglich, die Rolle des PI3K/AKT Signalwegs gezielt im Pankreas zu untersuchen.

Ptf1a^{Cre/+}; LSL-PIK3CA^{H1047R}

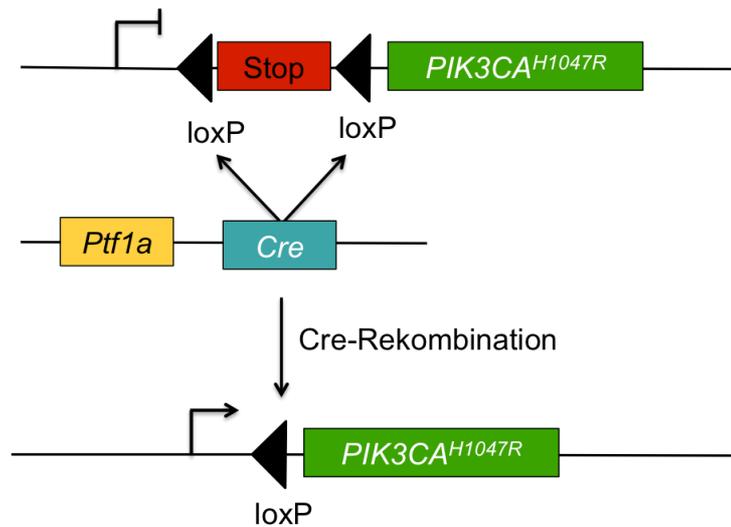


Abbildung 15: Pankreasspezifische Cre-Rekombination führt zur Expression von *PIK3CA^{H1047R}*

Unter dem *Ptf1a*-Promotor kommt es im Pankreas zur Expression der Cre-Rekombinase. Über Cre-Rekombination erfolgt die Deletion der geflochtenen Stopp-Kassette, wodurch es zur Expression von *PIK3CA^{H1047R}* kommt.

Durch eine Genotypisierung wurde überprüft, ob die Mäuse die aus einer Verpaarung aus *LSL-PIK3CA^{H1047R}* und *Ptf1a^{Cre}* Mäusen hervorgegangen sind das gewünschte *LSL-PIK3CA^{H1047R}* Allel tragen. Hierfür wurden von den Jungtieren Schwanzspitzenbiopsien genommen, aus denen nach der Lyse genomische DNA zur Durchführung einer PCR gewonnen werden konnte. Wie in Abbildung 16 zu sehen wurden in der PCR auf Homo-/Heterozygotie bei intakter Stopp-Kassette drei verschiedene Primer zur Genotypisierung eingesetzt. Die Primer sind so gelegen, dass sie auf das Vorhandensein der geflochtenen Stopp-Kassette screenen. Bei Wildtyp (WT) Tieren zeigte sich eine Bande bei 650 bp, bei Mäusen mit homozygot vorliegendem *LSL-PIK3CA^{H1047R}* ergab sich eine Bande bei 410 bp und bei Mäusen, die in Bezug auf *LSL-PIK3CA^{H1047R}* heterozygot waren, fand sich eine Bande bei 410 bp und eine bei 650 bp.

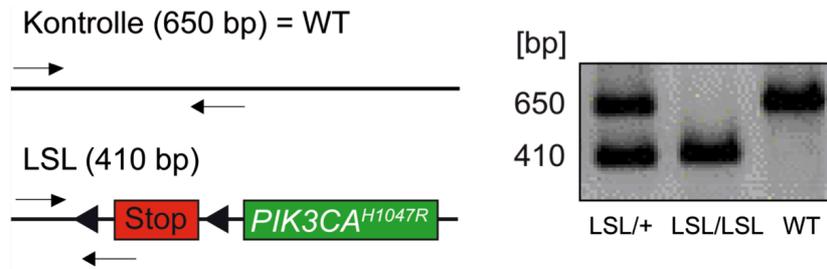


Abbildung 16: Genotypisierungs-Strategie für $LSL-PIK3CA^{H1047R}$ Mäuse mittels Screen auf Homo-/Heterozygotie bei intakter Stopp-Kassette

PCR-Analyse von DNA von Wildtyp (WT), heterozygoten (LSL/+) und homozygoten (LSL/LSL) $LSL-PIK3CA^{H1047R}$ Mäusen mit intakter Stopp-Kassette. Die Größe der PCR-Bande von WT-Mäusen (650 bp) und Mäusen mit Transgen mit Stopp-Kassette (410 bp) ist eingezeichnet.

Bei $Ptf1a^{Cre}$ Mäusen kommt es lediglich im Pankreas zu einer Aktivierung der Cre-Rekombinase. Dadurch bedingt kommt es bei $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mäusen auch nur im Pankreas zu einer Deletion der Stopp-Kassette, wodurch $PIK3CA^{H1047R}$ abgelesen und exprimiert wird. Um zunächst die pankreasspezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase zu überprüfen, erfolgte eine Verkreuzung der $Ptf1a^{Cre/+}$ Mauslinie mit einer Reportermauslinie, die eine loxP flankierte Stopp-Kassette vor ihrem LacZ-Locus trägt ($LSL-R26^{lacZ/+}$) (siehe Abbildung 17). Nach Färbung mit X-Gal-Färbelösung (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) zeigte sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch nur im Pankreas eine Blaufärbung, die darauf schließen lässt, dass es lediglich im Pankreas zu einer Expression der Cre-Rekombinase und damit pankreasspezifisch zu einer Exzision der Stopp-Kassette gekommen ist, wodurch lacZ exprimiert wird und das Genprodukt β -Galaktosidase aus dem zunächst farblosen 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl abspaltet. Das freigesetzte Indoxyl wird dann zum unlöslichen Indigo oxidiert und bewirkt damit die Blaufärbung.

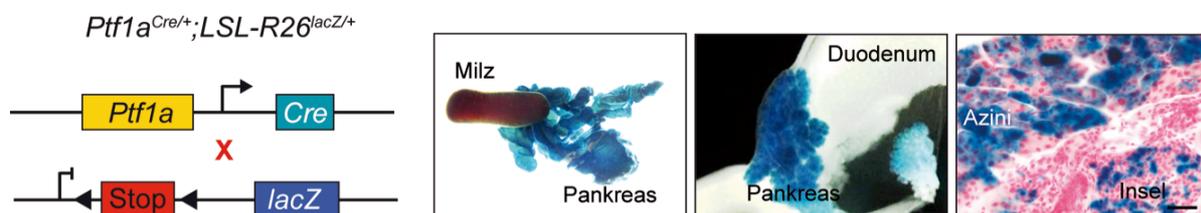


Abbildung 17: Genetische Strategie zur Analyse der $Ptf1a^{Cre/+};LSL-R26^{lacZ/+}$ Mäuse

Pankreasspezifische $Ptf1a^{Cre}$ vermittelte Rekombination der mit einer loxP flankierten Stopp-Kassette versehenen lacZ Reporterlinie ($LSL-R26^{lacZ/+}$). Makroskopische Bilder der im Ganzen mit X-Gal gefärbten Organe: Milz und Pankreas (links), Dünndarm und Pankreas (Mitte) sowie mikroskopische Bilder von Pankreas-Schnitten.

Nachdem Tiere der $Ptf1a^{Cre/+}$ Mauslinie mit Tieren der $LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mauslinie verkreuzt worden waren, erhielt man Mäuse mit dem Genotyp $Ptf1a^{Cre/+};LSL-$

PIK3CA^{H1047R/+}. Um zu überprüfen, dass es durch die Cre-Rekombinase im Pankreas zu einer Deletion der Stopp-Kassette gekommen ist, wurde DNA aus dem Pankreas dieser Tiere isoliert und hieran eine PCR-Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 18). Im Falle einer deletierten Stopp-Kassette ergab sich eine Bande bei 900 bp. Bei Wildtyp oder intakter Stopp-Kassette ergab sich keine Bande.

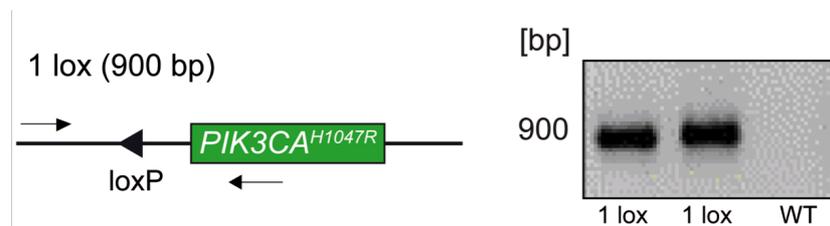


Abbildung 18: PCR zur Analyse des Rekombinationserfolgs bei *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen

Aus dem Pankreas extrahierte DNA von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen mit deletierter Stopp-Kassette (1 lox) und Wildtyp-Mäusen (WT: keine Bande). Gekennzeichnet ist die Größe der PCR-Bande bei deletierter Stopp-Kassette (900 bp).

Um nachzuweisen, dass es zu einer pankreasspezifischen Deletion der Stopp-Kassette kommt, erfolgte auch aus anderen Geweben (Leber, Lunge, Niere, Herz, Milz und Darm) die DNA-Isolation. Eine deletierte Stopp-Kassette zeigte sich nur im Pankreas mit einer Bande bei 900 bp. In den anderen Organen (Leber, Lunge, Niere, Herz, Milz und Darm) zeigte sich keine PCR-Bande, da die intakte gefloxt Stopp-Kassette mit den gewählten PCR Bedingungen auf Grund ihrer Größe (3067 bp) nicht amplifiziert werden kann. Die Bande bei 650 bp entspricht dem Wildtypokus und wurde als Kontrolle amplifiziert. Die genaue Strategie ist in Abbildung 19 dargestellt.

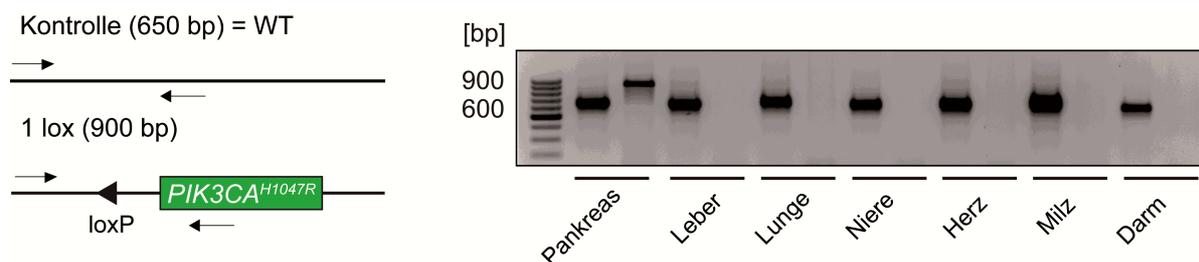


Abbildung 19: Analyse der pankreasspezifischen Deletion der Stopp-Kassette bei *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen

PCR-Strategie um die pankreasspezifische *Ptf1a*^{Cre} vermittelte Deletion der LSL-Kassette in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen zu analysieren. Die Größen der PCR-Banden (WT = 650 bp; deletierte Stopp-Kassette = 900 bp) sind angegeben. Bei vorhandener intakter Stopp-Kassette ergibt sich kein PCR-Produkt.

Durch die pankreasspezifische Deletion der Stopp-Kassette kommt es zur Expression von *PIK3CA*^{H1047R} (*p110α*^{H1047R}) in den Zellen des Pankreas. Wie sich durch Western Blot-Analyse gezeigt hat (siehe Abbildung 20), ist der Spiegel von

p110 α in pankreatischen Gewebslysaten bei *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Tieren vergleichbar mit den p110 α -Spiegeln im etablierten *Kras*^{G12D} knock-in Mausmodell (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}), obwohl die *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäuse zusätzlich zu *PIK3CA*^{H1047R} im *Rosa26* Locus noch ihr endogenes *Pik3ca* tragen.

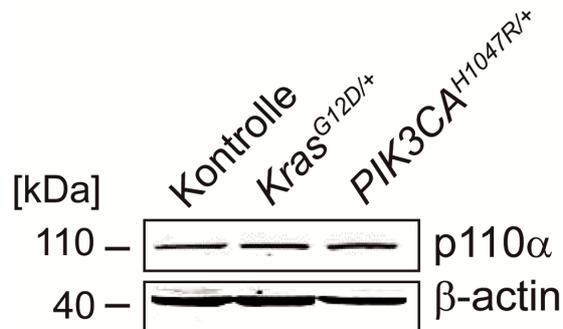


Abbildung 20: Western Blot-Analyse der p110 α Expression im Pankreas

p110 α Expression in Pankreata von 6 Wochen alten Kontrollen (Kontrolle), *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} (*Kras*^{G12D/+}) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} (*PIK3CA*^{H1047R/+}) Mäusen.

Ptf1a^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäuse waren lebensfähig und zeigten nach der Geburt keinen offensichtlichen Phänotyp.

Das Pankreas war vergrößert und das Pankreasgewicht erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren. Ähnliches war zuvor schon für *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} knock-in Mäuse gezeigt worden. Wie in Abbildung 21 zu sehen, nahm dieser Effekt mit dem Alter zu. So lag das mittlere Pankreas-Gewicht bei 1 Monat alten *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen bei 500 mg, während es bei Kontrolltieren nur 175 mg waren. Bei 6 Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen wog das Pankreas im Mittel 900 mg, bei den Kontrolltieren lediglich 270 mg.

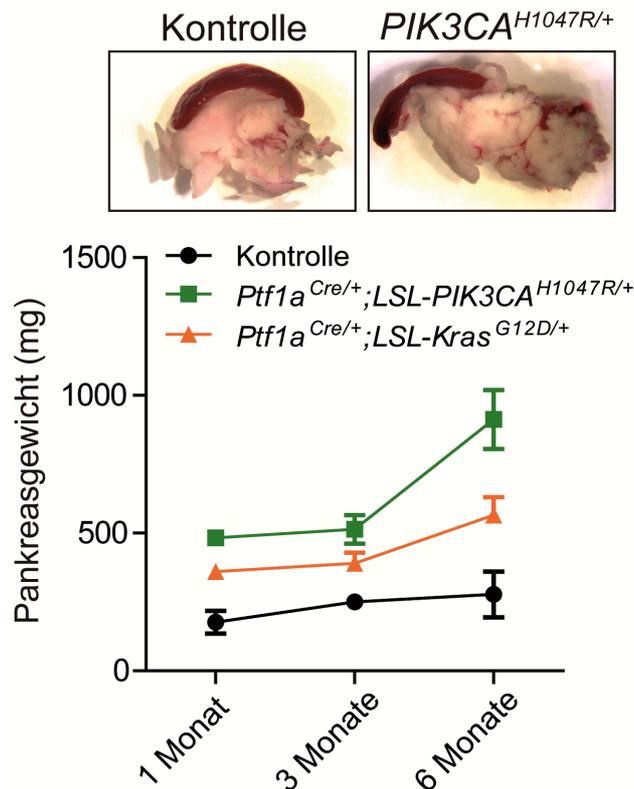


Abbildung 21: Repräsentative Bilder und Gewicht der Pankreata von *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen im Vergleich zu Pankreata von Kontrolltieren und *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*Kras*^{G12D/+} Mäusen

Histologische Analyse der *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Maus

Die Pankreata der *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Mäuse wurden histologisch aufgearbeitet und repräsentative Schnitte sind in Abbildung 22 abgebildet.

Bei allen *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Tieren war eine massive Induktion von azinär-duktalear Metaplasie (ADM) zu sehen. Diese Veränderungen zeigten sich auch in *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*Kras*^{G12D/+} Mäusen.

Darüber hinaus entwickelten alle Tiere PanINs, die ein Vorläuferstadium von PDAC darstellen. Die Anzahl und der Schweregrad dieser Läsionen nahm mit der Zeit zu.

Bereits bei wenige Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen fanden sich PanIN-1-Läsionen. In Abbildung 22 ist die alcian blue Färbung eines Pankreas-Schnitts einer 3 Monate alten Maus zu sehen. Man sieht die großen, säulenartigen Zellen mit basal lokalisiertem Zellkern und viel supranukleärem Muzin, entsprechend einer PanIN-1 Läsion. Bei 6 Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Tieren sind bereits PanIN-2 zu sehen. An dem dargestellten Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt einer 6 Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+};LSL-*PIK3CA*^{H1047R/+} Maus sieht man eine zunehmende nukleäre Anomalie mit vergrößerten Zellkernen, Verlust der Polarität und engstehenden Zellkernen („nukleäres Crowding“).

Mit zunehmendem Alter finden sich auch PanIN-3, die einem Carcinoma in situ entsprechen, da die Basalmembran nicht durchbrochen wird. Abgebildet sind H&E

gefärbte Pankreas-Schnitte von 9 Monate alten $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mäusen, auf denen bereits eine deutliche Atypie sichtbar wird. Man findet ein cribiformes Zellmuster, eine aufgehobene Zellpolarität, dystrophe Becherzellen sowie die Abschnürung kleiner epithelialer Zellverbände in das Lumen und luminale Nekrosen.

Im Vergleich mit histologischen Schnitten der Pankreata von $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ Mäusen im selben Alter zeigt sich ein sehr ähnliches Muster der ADM-Induktion und der PanIN-Progression.

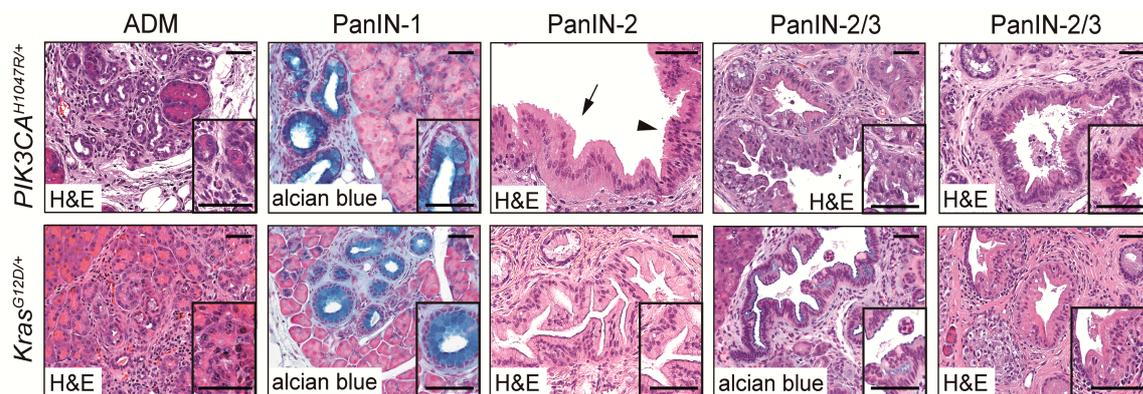


Abbildung 22: Histologische Analyse der $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Maus

Repräsentative mit alcian blue und Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbte Schnitte von ADMs und verschiedenen Graden von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) in $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ (obere Reihe) und $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ (untere Reihe) mutierten Mäusen (Alter von links nach rechts: 1 Monat, 3 Monate, 6 Monate, 9 Monate, 9 Monate). Der Pfeil bezeichnet eine PanIN-1 Läsion und der Pfeilkopf eine PanIN-2 Läsion. Die Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Vergrößerung. Maßstabsbalken 50µm für mikroskopische Fotos, 20µm für die Einsätze.

Die Expression von $p110\alpha^{H1047R}$ im Pankreas führt zur Ausbildung metastasierender PDACs ähnlich der Kras-induzierten Karzinogenese

Mit zunehmendem Alter entwickeln alle $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mäuse innerhalb von 800 Tagen ein duktales Adenokarzinom des Pankreas mit Ausbildung von Metastasen in Lymphknoten, Leber und Lunge. Dabei entspricht die Metastasierungsrate in Leber und Lunge bei den $Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}$ Mäusen mit etwa 40% der der $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ Mäuse (siehe Abb. 23).

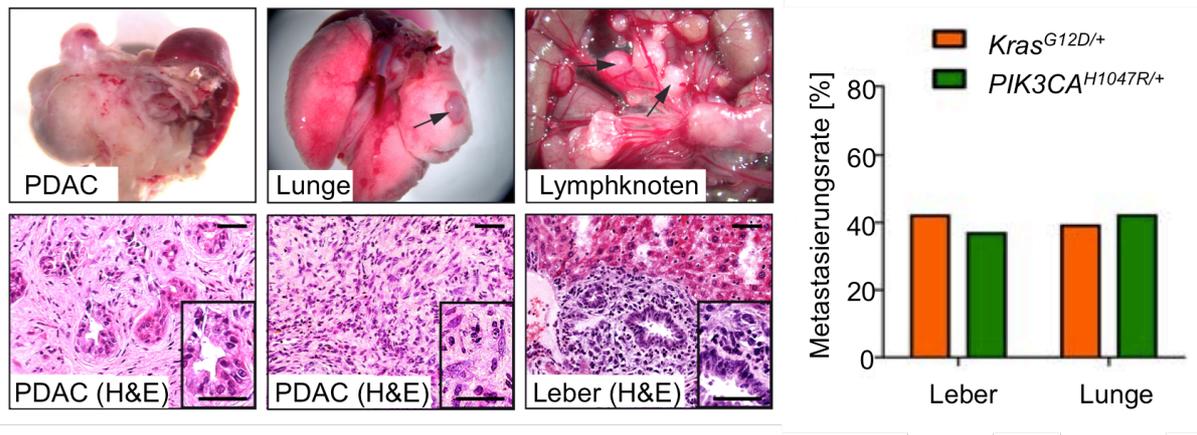


Abbildung 23: *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäuse entwickeln metastasierende PDACs
 linke Abbildung: makroskopische und mikroskopische Bilder von PDACs und ihren Metastasen in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen. Die Metastasen sind mit Pfeil markiert. Die Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Vergrößerung. Maßstabsbalken 50µm für mikroskopische Fotos, 20µm für die Einsätze. Rechte Abbildung: Metastasierungsrate in Leber und Lunge in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen (*PIK3CA*^{H1047R/+}) sowie in *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} Mäusen (*Kras*^{G12D/+}) (n=20 pro Genotyp). Das Säulendiagramm gibt den Prozentsatz der Mäuse mit Leber- und Lungenmetastasen an. Diese Daten wurden von Mitgliedern der AG Saur in Gemeinschaftsarbeit generiert.

Die Überlebenszeit liegt im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Modell im Median bei 427 Tagen und ähnelt damit der des *Kras*^{G12D/+} Modells mit 466 Tagen, die verglichen mit der des Kontrollkollektivs mit 731 Tagen deutlich verkürzt ist (siehe Abbildung 24).

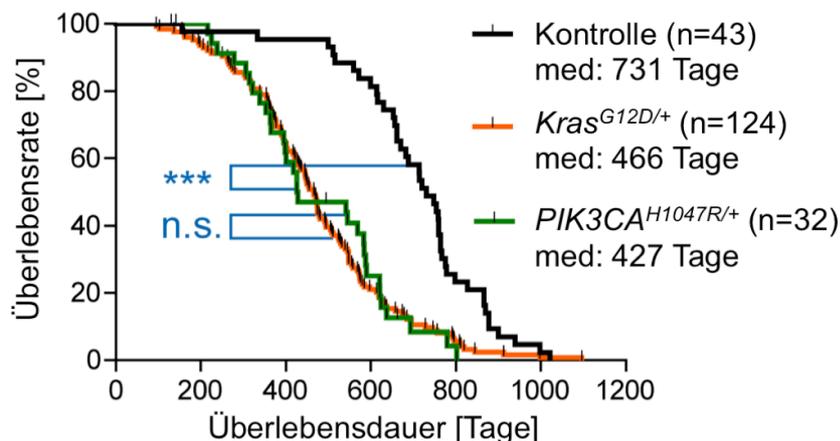


Abbildung 24: Kaplan-Meier Überlebenskurven von *PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen, *Kras*^{G12D/+} Mäusen und Kontrolltieren
 Unterschied der Überlebensrate von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen (*PIK3CA*^{H1047R/+}) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} Mäusen (*Kras*^{G12D/+}) nicht signifikant (n.s.); Unterschied der Überlebensrate zwischen *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen (*PIK3CA*^{H1047R/+}) und Kontrolltieren (Kontrolle) statistisch signifikant (***) p<0,001, Log-Rank Test); med, mediane Überlebensdauer. Diese Daten wurden von Mitgliedern der AG Saur in Gemeinschaftsarbeit generiert.

Die PDACs, die durch p110α^{H1047R} induziert werden sind histopathologisch nicht von humanen PDACs oder murinen *Kras*-induzierten PDACs zu unterscheiden. Sie

zeigen das gesamte Erkrankungs-Spektrum, das auch im Menschen zu sehen ist und reichen von gut differenzierten PDACs bis zu undifferenzierten Tumoren (siehe Abbildung 25).

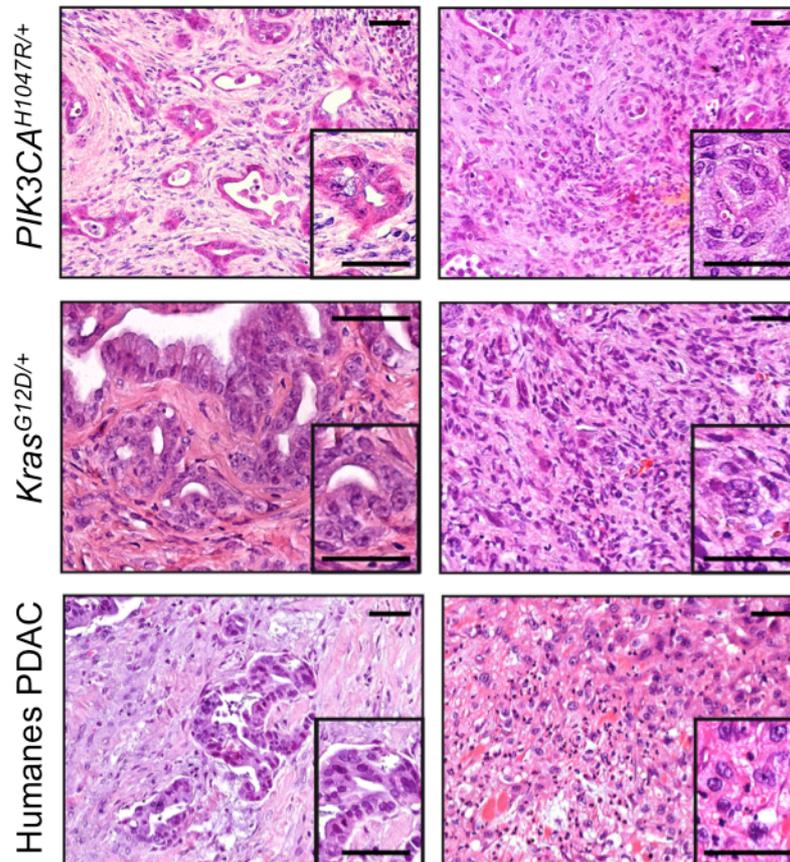


Abbildung 25: Repräsentative Bilder von H&E gefärbten histologischen Schnitten von PDACs von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Mäusen (*PIK3CA*^{H1047R/+}) oder *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+} Mäusen (*Kras*^{G12D/+}) und resezierten humanen PDAC-Proben

Linke Spalte: gut bis mäßig differenzierte PDACs, rechte Spalte: schlecht differenzierte PDACs. Die Einsätze zeigen repräsentative Läsionen in hoher Vergrößerung. Maßstabsbalken 50µm für mikroskopische Fotos, 20µm für die Einsätze.

Diese Daten wurden von Mitgliedern der AG Saur in Gemeinschaftsarbeit generiert.

5 Diskussion

Das duktales Pankreaskarzinom gehört zu den tödlichsten Krebserkrankungen und stellt die vierthäufigste Krebs assoziierte Todesursache der westlichen Welt dar (Siegel et al., 2012). Während sich in den letzten Jahren die Behandlungsmöglichkeiten vieler Karzinome durch zielgerichtete Therapien verbessert haben, wodurch die Sterblichkeit reduziert werden konnte, ist im Falle des Pankreaskarzinoms kein Durchbruch zu verzeichnen gewesen (Hidalgo, 2010). In Deutschland liegt die Sterberate unverändert bei >97% (Kaatsch, 2013). Einer finnischen Studie zufolge, die die Daten des finnischen Krebsregisters auswertete, liegt die Sterberate sogar noch höher. Ihr zufolge überlebten weniger als 1% die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung (Carpelan-Holmstrom et al., 2005).

In Genanalysen konnte gezeigt werden, dass die vorherrschende Mutation in humanen duktales Adenokarzinomen des Pankreas mit über 90% eine aktivierende Mutation im *KRAS*-Gen ist (Gidekel Friedlander et al., 2009; Grippo et al., 2003; Jaffee et al., 2002). Weitaus seltener mit je etwa 1-2% finden sich Mutationen direkt im *PIK3CA*- und *ERBB2*-Gen (Waddell et al., 2015). Die gezielte pankreatische Expression von onkogenem Kras im Mausmodell führt zur Entwicklung von Pankreaskarzinomen über die entsprechenden Vorläuferstufen. Damit konnte das erste Mausmodell entwickelt werden, das in elementaren Punkten das menschliche Pankreaskarzinom rekapituliert (Hingorani et al., 2003). Hierdurch war es möglich geworden, den Effekt gezielter genetischer Veränderungen und therapeutischer Optionen in einem murinen Modellsystem zu untersuchen. Mithilfe dieses Modells konnte erstmals nachgewiesen werden, dass onkogenes Kras in der Lage ist, Pankreaskarzinome zu initiieren. Erst in späteren Studien wurde offenbar, dass Kras auch für die Tumorprogression und -aufrechterhaltung wichtig ist. Mit Hilfe eines Tetrazyklin-induzierbaren Systems konnte in zwei unabhängigen Studien gezeigt werden, dass es zur kompletten Regression von Kras^{G12D} induzierten Tumoren nach Inaktivierung von Kras kommt (Collins et al., 2012a; Ying et al., 2012). Dies unterstützt die Theorie, dass Kras eine optimale Zielstruktur für neue Therapien darstellen würde (Collins et al., 2012a).

Doch bisher ist es nicht gelungen, effektive Inhibitoren gegen Kras zu entwickeln, weswegen Kras weiterhin als „undruggable“ gilt (Berndt et al., 2011; Hruban et al., 2006; Ying et al., 2011). Zudem gibt es Hinweise, dass in Kras induzierten Tumoren

nach Inaktivierung von Kras einige Zellen in einem Ruhezustand überleben und nach Reaktivierung von Kras umso schneller wachsen können, was die Befürchtung aufwirft, dass es zur Entwicklung von Kras-Resistenzen kommen könnte (Collins et al., 2012b). Es ist daher wichtig, die nachgeschalteten Effektoren von Kras zu kennen, um neue therapeutisch relevante Angriffspunkte evaluieren zu können. Trotz der großen genetischen Heterogenität des Pankreaskarzinoms, die sich in genomweiten Sequenzanalysen gezeigt hat, konnten drei Signalwege als Haupt-Effektoren von onkogenem Kras identifiziert werden: der Raf/Mek/Erk, PI3K/Pdk1/Akt und Ral guanin nucleotide exchange factor Signalweg (Collisson et al., 2012; Eser et al., 2014). Der PI3K/AKT Signalweg ist sowohl in humanen PDACs als auch in Mausmodellen von Kras-getriggerten Pankreaskarzinomen durchweg aktiviert (Jimeno et al., 2008; Kennedy et al., 2011; Ying et al., 2011). Zudem gibt es eine Reihe von PI3K Inhibitoren, die zum Teil bereits in klinischer Erprobung sind (Engelman, 2009). Daher konzentrierten wir uns in unserer Forschung auf den PI3K/AKT Signalweg und seine Relevanz für das Pankreaskarzinom.

Wir wollten mithilfe dieser Arbeit herausfinden, welchen Stellenwert der PI3K Signalweg im Pankreaskarzinom hat und ob der PI3K/AKT Signalweg ein relevanter Effektor von mutiertem Kras im Pankreaskarzinom ist. Um dies untersuchen zu können, generierte ich im Rahmen dieser Doktorarbeit ein neues genetisch definiertes Mausmodell mit einem latent onkogenen *PIK3CA*^{H1047R} Allel, das für p110 α codiert, mit einer von loxP Stellen flankierten Stopp-Kassette als knock-in im *Rosa26* Locus, um eine gezielte pankreasspezifische Expression zu ermöglichen. Um *PIK3CA*^{H1047R} pankreasspezifisch an- und abschalten zu können, generierte ich zusätzlich ein Mausmodell in dem *PIK3CA*^{H1047R} an den modifizierten Östrogenrezeptor ER^{T2} gekoppelt ist (unpubliziert; hiervon existieren bislang nur die genetisch modifizierten murinen embryonalen Stammzellen). In diesem Modell ist durch Hinzugabe von Tamoxifen die Funktion des onkogenen *PIK3CA*^{H1047R} reversibel aufhebbar.

Durch die pankreasspezifische Expression von *PIK3CA*^{H1047R} konnte ich den PI3K/AKT Signalweg selektiv im Pankreas aktivieren. Hierdurch kam es zur Ausbildung von ADMs, PanINs und schließlich metastasierenden Pankreaskarzinomen, die hinsichtlich ihrer Histologie und dem Verteilungsmuster nicht zu unterscheiden waren von Kras induzierten Veränderungen im Pankreas. Die

PI3K und Kras induzierte Karzinogenese im Pankreas rekapituliert damit jeweils die menschliche Erkrankung sehr exakt (Eser et al., 2013).

Mithilfe von Pdk1 defizienten Mauslinien konnte unsere Arbeitsgruppe ferner zeigen, dass der PI3K/PDK1/AKT Signalweg auch im Kras-induzierten Pankreaskarzinom einen zentralen Knotenpunkt bei der Initiierung und Tumoraufrechterhaltung darstellt (Eser et al., 2013).

Nachdem die H1047R Mutation eine der häufigsten Mutationen des PI3K Signalwegs ist und darüber hinaus bereits in Zellkulturversuchen gezeigt werden konnte, dass die H1047R Mutation die potenteste der drei bekannten hot spot Mutationen im *PIK3CA*-Gen ist (Bader et al., 2006) fiel die Wahl auf diese Mutation, um den PI3K Signalweg im Pankreaskarzinom zu aktivieren.

Um nur im Pankreas eine Expression von $p110\alpha^{H1047R}$ zu erreichen, erfolgte die Kreuzung der *LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäuse mit *Ptf1a^{Cre/+}* Tieren. Hierdurch kam es pankreasspezifisch zu einer Expression der Cre-Rekombinase und folglich zu einer Exzision der von loxP-Stellen flankierten Stopp-Kassette, wodurch *PIK3CA^{H1047R}* exprimiert wurde.

Durch die Wahl von *Ptf1a* als Promotor wird die Cre-Rekombinase ab dem 9,5 Tag der Embryonalentwicklung in allen pankreatischen Progenitorzellen von Acini, duktalem Zellen und Inseln des Pankreas exprimiert (Guerra et al., 2013; Nakhai et al., 2007; Seidler et al., 2008).

Auch Hingorani bediente sich 2003 bei seinem Kras-knock-in Modell dieses Mechanismus, bei dem im gesamten Pankreas eine uniforme Expression des gewünschten Transgens erreicht werden kann.

Durch Verwendung einer lacZ Reportermauslinie, die lacZ erst nach Exzision der von loxP-Stellen flankierten Stopp-Kassette exprimiert, konnte bestätigt werden, dass die *Ptf1a^{Cre}* Maus isoliert im Pankreas eine Expression der Cre-Rekombinase und in der Folge eine pankreasspezifische Exzision der Stopp-Kassette bewirkt.

Histopathologische Untersuchungen zeigten, dass alle *Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäuse eine massive Induktion von azinär-duktalem Metaplasie (ADM) entwickelten. Dies ist ein Zustand, in dem terminal differenzierte azinäre Zellen dedifferenzieren in einen Vorläuferzellartigen Zustand und Eigenschaften von duktalem Zellen erwerben (Pinho et al., 2011). Dieser Vorgang wurde im Zusammenhang mit inflammatorischen Vorgängen beobachtet, wie der chronischen Pankreatitis (Pinho et

al., 2011), aber auch als potentieller Auslöser und Vorläufer des humanen und murinen pankreatischen Adenokarzinoms (Aichler et al., 2012; Caldwell et al., 2012). Die in *Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäusen entstehenden PDACs sind histopathologisch nicht von murinen Kras-induzierten PDACs oder humanen PDACs zu unterscheiden. Das Spektrum, das sie zeigen reicht dabei von gut differenzierten PDACs bis zu undifferenzierten Tumoren mit Ausbildung von Metastasen an den typischen Lokalisationen (Lymphknoten, Leber und Lunge) wie es bisher nur aus dem *Kras^{G12D}* Modell bekannt war (Hingorani et al., 2003; Hingorani et al., 2005; Tuveson et al., 2005).

Vergleichende Untersuchungen zeigten eine ähnlich starke Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs in PanIN tragenden Pankreata und PDACs von *PIK3CA^{H1047R/+}* und *Kras^{G12D/+}* Mäusen. Es fand sich keine Aktivierung von Ras in Gewebeproben von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäusen und primären PDAC-Zelllinien. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten Effekte im *PIK3CA^{H1047R}* Modell nicht durch eine Kras-Kreuzaktivierung zustande gekommen sind. (Eser et al., 2013)

Ein weiterer wichtiger Schritt war es, die Höhe der Proteinexpression von p110 α zu überprüfen nachdem die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäuse zusätzlich zu ihrem endogenen *Pik3ca* noch *PIK3CA^{H1047R/+}* im *Rosa26* Locus tragen. Die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-PIK3CA^{H1047R/+}* Mäuse zeigten verglichen mit *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* knock-in Mäusen und auch verglichen mit Kontrolltieren ähnliche p110 α Spiegel im Western Blot. Diese Tatsache wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die trotz Expression eines *PIK3CA^{H1047R}* Transgens keine Erhöhung des Gesamt-p110 α Proteinlevels beobachteten (Engelman et al., 2008). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass p110 α , das nicht an p85 gebunden ist, instabil ist und rasch degradiert wird (Yu et al., 1998).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der PI3K/AKT Signalweg der Haupteffektor von onkogenem Kras im Pankreaskarzinom ist.

Damit diese Theorie Bestand haben kann, müsste der PI3K/AKT Signalweg auch in frühen Stadien der humanen Pankreaskarzinom-Entstehung aktiviert sein. Mittels immunhistochemischer Analysen von phosphoryliertem AKT-T308/S473 und GSK3 β -S9 sowie Analyse der Phosphorylierung von pAKT-T308, pGSK3 β -S9 konnte unsere Arbeitsgruppe eine starke Aktivierung des PI3K Signalwegs bereits in humanen ADMs und PanINs sowie PDACs feststellen (Eser et al., 2013).

PI3K bewirkt über die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 eine Aktivierung von PDK1. Dies wiederum führt zur Aktivierung von Akt über eine Threonin 308 Phosphorylierung (Liu et al., 2006). Um zu überprüfen, dass es sich bei den von uns beobachteten Effekten um zellautonome Vorgänge handelt und PI3K bzw. das distal gelegene Zielprotein PDK1 essentiell ist für die Kras getriggerte Pankreaskarzinom-Entstehung, inaktivierten wir PDK1 im epithelialen Kompartiment des Pankreas, indem wir ein *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{ff} Mausmodell herstellten. Die Inaktivierung von PDK1 blockierte die Entstehung von ADMs, PanINs und PDACs komplett, wobei sich in den Tieren keine Hypoplasie oder Entwicklungsdefizite des Pankreas zeigten. In diesen Tieren fand sich auch eine signifikant geringere p16/Ink4a und p19/Arf Induktion als in Tieren mit intaktem PDK1 (*Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}) (Eser et al., 2013). Somit konnten wir zeigen, dass der PI3K/PDK1/AKT Signalweg essentiell ist für die Tumorentstehung in Kras induzierten Pankreaskarzinomen.

Um die Rolle des PI3K Signalwegs bei der frühen Pankreaskarzinogenese zu verstehen, untersuchten wir dessen Einfluss auf ADMs. Aktuelle Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass ADMs Vorläuferstadien von humanen und murinen PDACs sind (Aichler et al., 2012; Caldwell et al., 2012). *In vitro* kann der Prozess der azinär-duktaalen Metaplasie durch TGF- α Behandlung und Ras-Aktivierung in isolierten Acini induziert werden. In einem *in vitro* ADM-Assay konnten wir zeigen, dass es durch Deletion von PDK1 zu einer vollständigen Blockade der ADM-Induktion *in vitro* kommt (Eser et al., 2013). Ebenso ließ sich die ADM-Induktion durch Inhibition des PI3K Signalwegs blockieren (nach Hinzugabe von Pan Klasse I Inhibitor GDC 0941, dualem Pan Klasse I PI3K-mTOR Inhibitor NPV-Bez235, AKT Inhibitor MK-2206 und PDK1 Inhibitor BX912). Interessanterweise hatte der RSK Inhibitor BI-D1870 keinen Effekt auf die ADM Bildung.

Somit konnten wir *in vivo* mithilfe von genetischen Studien in Mäusen und *in vitro* mittels ADM Assays zeigen, dass eine Unterbrechung der PI3K/PDK1/AKT-Achse, und nicht der PDK1/RSK-Achse, die ADM-Bildung blockiert und damit die Tumorentstehung im Pankreas.

Basierend auf den ähnlichen Phänotypen der *Kras*^{G12D} und *PIK3CA*^{H1047R} Modelle, dem Fehlen der Ras Aktivierung in *PIK3CA*^{H1047R} Mäusen, einer vergleichbaren Expression und Aktivierung des PI3K Signalwegs im *Kras*^{G12D} und *PIK3CA*^{H1047R}

Modell und der vollständigen Blockade der PDAC Entstehung durch Deletion des PI3K Effektors Pdk1 im $Kras^{G12D}$ Modell, konnten wir auf mehreren Ebenen belegen, dass $Kras$ durch die PI3K/PDK1-Achse agiert, um Pankreaskarzinome zu induzieren.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass der PI3K Signalweg der Haupteffektor von onkogenem $Kras$ ist, stellte sich für uns die Frage, ob die Inhibition von PI3K das Tumorwachstum stoppen könnte und PI3K somit als Zielstruktur neuer Therapien im Pankreaskarzinom in Frage käme. Um dies zu testen, behandelten wir Mäuse des etablierten $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/f}$ (KPC) Modells, die vergleichbare Pankreastumore aufwiesen mit dem selektiven oralen Pan Klasse I PI3K Inhibitor GDC 0941. Bei den Tieren, die mit GDC 0941 behandelt wurden, zeigte sich keine Größenzunahme des Tumors im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die ein schnelles Tumorwachstum aufwiesen (gemessen mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät) sowie eine verminderte Phosphorylierung von AKT-T308. Ähnliche Effekte zeigten sich in einem humanisierten PDAC Modell, in dem primäre aus humanen Patienten gewonnene PDAC Zellen orthotop in NOD-SCID-IL2R γ (NSG) Mäuse implantiert wurden, die anschließend mit GDC 0941 behandelt wurden. Auch hier konnte GDC 0941 das Tumorwachstum effizient blockieren. (Eser et al., 2013)

Somit konnten wir unter anderem mithilfe des in dieser Doktorarbeit generierten $PIK3CA^{H1047R}$ Mausmodells zeigen, dass die PI3K/AKT-Achse der Haupteffektor von onkogenem $Kras$ im Pankreaskarzinom ist.

6 Zusammenfassung

Das duktale Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache der westlichen Welt dar mit einer 5-Jahres-Überlebensrate unter 1%. In einer Vielzahl von Studien konnte onkogenes Kras als initiiertes Event im Pankreaskarzinom identifiziert werden, das eine Vielzahl von Signalwegen aktiviert. Unklar war bislang welche Rolle der PI3K/AKT Signalweg hierbei spielt. Um die Rolle des PI3K/AKT Signalwegs in der Karzinogenese des Pankreas studieren zu können, entwickelten wir zwei neue knock-in Mausmodelle, die ein latent onkogenes *PIK3CA*^{H1047R} Allel tragen, das für p110 α ^{H1047R} codiert. In einem Modell ist *PIK3CA*^{H1047R} an den Tamoxifen induzierbaren modifizierten Östrogen-Rezeptor ER^{T2} fusioniert, wodurch es durch Zugabe von Tamoxifen inaktiviert wird, da es in den Zellkern transloziert. Die Zielkonstrukte tragen eine 5'-gelegene Stopp-Kassette, die eine Neomycin-Resistenz enthält, die von zwei loxP Seiten flankiert wird (loxP-stop-loxP; LSL), wodurch das Transgen gewebspezifisch exprimiert werden kann. Der Ziellocus für das Transgen war der murine *Rosa26* Locus. Der linearisierte Zielvektor wurde mittels Elektroporation in murine embryonale Stammzellen (129S6) eingebracht. Die ES-Zellen wurden mit Geneticin selektioniert und mittels PCR überprüft. Die korrekte homologe Rekombination wurde durch eine Southern Blot Analyse mit einer ³²P-markierten 5'-gelegenen externen Sonde bzw. einer internen Neomycin-Sonde überprüft. 100% (6/6) der analysierten *PIK3CA*^{H1047R}-integrierten ES-Zellklone und 83% (5/6) der *PIK3CA*^{H1047R-ERT2}-integrierten ES-Zellklone zeigten die gewünschte homologe Rekombination. Zwei Klone wurden in Blastozysten injiziert. Die Transmission des Zielalles in die Keimbahn wurde bei allen injizierten Klonen erreicht. Durch Kreuzung des *LSL-PIK3CA*^{H1047R/+} Allels mit *Ptf1a*^{Cre/+} Mäusen wurde *PIK3CA*^{H1047R} pankreasspezifisch exprimiert und die Aktivierung des PI3K Signalwegs funktionell *in vivo* analysiert. Die Tiere des *Ptf1a*^{Cre/+};*PIK3CA*^{H1047R}-Modells entwickelten ADMs, PanINs und PDACs und zeigten eine Rekapitulation der menschlichen PDAC-Formierung wie sie bisher nur aus dem *Ptf1a*^{Cre/+};*Kras*^{G12D}-Modell bekannt war. Darüber hinaus zeigte sich in den PanINs und PDACs beider Modelle eine ähnliche Aktivierung des PI3K/AKT Signalwegs. Mithilfe des in dieser Doktorarbeit generierten *PIK3CA*^{H1047R} Mausmodells konnten wir zeigen, dass die PI3K/AKT Achse der Haupteffektor von onkogenem Kras im Pankreaskarzinom ist und darüber hinaus die Kras-PI3K-PDK1-Achse als essentiellen Signalweg im Pankreaskarzinom identifizieren mit der Fähigkeit Zellplastizität, ADM, PanINs und Karzinominitiierung sowie Tumoraufrechterhaltung zu induzieren.

7 Literaturverzeichnis

Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P.K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D.K., Langer, P., Chiblak, S., Durr, A., Hofler, H., Kloppel, G., Muller-Decker, K., Brielmeier, M. and Esposito, I. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *The Journal of pathology*. 226 (2012) 723-734

Bader, A.G., Kang, S. and Vogt, P.K. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 1475-1479

Becher, O.J. and Holland, E.C. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer research*. 66 (2006) 3355-3358, discussion 3358-3359

Berndt, N., Hamilton, A.D. and Sebt, S.M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*. 11 (2011) 775-791

Brembeck, F.H., Schreiber, F.S., Deramandt, T.B., Craig, L., Rhoades, B., Swain, G., Grippo, P., Stoffers, D.A., Silberg, D.G. and Rustgi, A.K. The Mutant K-ras Oncogene Causes Pancreatic Periductal Lymphocytic Infiltration and Gastric Mucous Neck Cell Hyperplasia in Transgenic Mice. *Cancer research*. 63 (2003) 2005-2009

Brinster, R.L., Chen, H.Y., Messing, A., Dyke, T.v., Levine, A.J. and Palmiter, R.D. Transgenic Mice Harboring SV40 T-Antigen Genes Develop Characteristic Brain Tumors. *Cell*. 37 (1984) 367-379

Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.-L., Chambon, P. and Metzger, D. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (1997) 14559-14563

Burnette, W.N. "Wester Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*. 112 (1981) 195-203

Caldwell, M.E., DeNicola, G.M., Martins, C.P., Jacobetz, M.A., Maitra, A., Hruban, R.H. and Tuveson, D.A. Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*. 31 (2012) 1599-1608

Carpelan-Holmstrom, M., Nordling, S., Pukkala, E., Sankila, R., Luttges, J., Kloppel, G. and Haglund, C. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. *Gut*. 54 (2005) 385-387

Collins, M.A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J.C., Galban, S., Galban, C.J., Rakshit, S., Flannagan, K.S., Adsay, N.V. and Pasca di Magliano, M. Oncogenic Kras is

required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of clinical investigation*. 122 (2012a) 639-653

Collins, M.A., Brisset, J.C., Zhang, Y., Bednar, F., Pierre, J., Heist, K.A., Galban, C.J., Galban, S. and di Magliano, M.P. Metastatic pancreatic cancer is dependent on oncogenic Kras in mice. *PLoS one*. 7 (2012b) e49707

Collisson, E.A., Trejo, C.L., Silva, J.M., Gu, S., Korkola, J.E., Heiser, L.M., Charles, R.P., Rabinovich, B.A., Hann, B., Dankort, D., Spellman, P.T., Phillips, W.A., Gray, J.W. and McMahon, M. A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer discovery*. 2 (2012) 685-693

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., Fouchardiére, C.d.l., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Chem, M. and Ducreux, M. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*. (2011) 1817-1825

Engelman, J.A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews. Cancer*. 9 (2009) 550-562

Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., Chirieac, L.R., Kaur, R., Lightbown, A., Simendinger, J., Li, T., Padera, R.F., Garcia-Echeverria, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Cantley, L.C. and Wong, K.K. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature medicine*. 14 (2008) 1351-1356

Eser, S., Messer, M., Eser, P., von Werder, A., Seidler, B., Bajbouj, M., Vogelmann, R., Meining, A., von Burstin, J., Algül, H., Pagel, P., Schnieke, A.E., Esposito, I., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (2011) 9945-9950

Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., Michalski, C.W., Schlitter, A.M., Esposito, I., Kind, A.J., Rad, L., Schnieke, A.E., Baccarini, M., Alessi, D.R., Rad, R., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell*. 23 (2013) 406-420

Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G. and Saur, D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 111 (2014) 817-822

Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. and Chambon, P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (1996) 10887-10890

Friedrich, G. and Soriano, P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & development*. 5 (1991) 1513-1523

Gidekel Friedlander, S.Y., Chu, G.C., Snyder, E.L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R.A. and Jacks, T. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer cell*. 16 (2009) 379-389

Grippo, P.J., Nowlin, P.S., Demeure, M.J., Longnecker, D.S. and Sandgren, E.P. Preinvasive Pancreatic Neoplasia of Ductal Phenotype Induced by Acinar Cell Targeting of Mutant Kras in Transgenic Mice. *Cancer research*. 63 (2003) 2016-2019

Guerra, C. and Barbacid, M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular oncology*. 7 (2013) 232-247

Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Canamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Perez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P. and Barbacid, M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer cell*. 11 (2007) 291-302

Gymnopoulos, M., Elsliger, M.A. and Vogt, P.K. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (2007) 5569-5574

Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N. and Depinho, R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 20 (2006) 1218-1249

Hidalgo, M. Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 362 (2010) 1605-1617

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.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M. and Tuveson, D.A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*. 4 (2003) 437-450

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

Houdebine, L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reproduction in Domestic Animals*. 40 (2005) 269-281

Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Klöppel, G., Longnecker, D.S., Lüttges, J. and Offerhaus, G.J.A. Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*. 25 (2001) 579-586

Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Brentnall, T.A., Tempero, M.A., Wright, C.V. and Tuveson, D.A. Pancreatic cancer in mice and man: the Penn Workshop 2004. *Cancer research*. 66 (2006) 14-17

Ikenoue, T., Kanai, F., Hikiba, Y., Obata, T., Tanaka, Y., Imamura, J., Ohta, M., Jazag, A., Guleng, B., Tateishi, K., Asaoka, Y., Matsumura, M., Kawabe, T. and Omata, M. Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. *Cancer research*. 65 (2005) 4562-4567

Jaffee, E.M., Hruban, R.H., Canto, M. and Kern, S.E. Focus on pancreas cancer. *Cancer cell*. 2 (2002)

Jimeno, A., Tan, A.C., Coffa, J., Rajeshkumar, N.V., Kulesza, P., Rubio-Viqueira, B., Wheelhouse, J., Diosdado, B., Messersmith, W.A., Iacobuzio-Donahue, C., Maitra, A., Varella-Garcia, M., Hirsch, F.R., Meijer, G.A. and Hidalgo, M. Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer. *Cancer research*. 68 (2008) 2841-2849

Kaatsch, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Cernaj, J., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kriehoff-Henning, E., Kunz, B., Penzkofer, A., Treml, K., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, D.S., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. Krebs in Deutschland 2009/2010. In: "Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes Krebs in Deutschland 2009/2010", e.V., Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.), Robert Koch-Institut, Berlin, 2013, 9. Ausgabe, 48-51

Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Goggins, M. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 142 (2012) 730-733 e739

Kang, S., Bader, A.G. and Vogt, P.K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005a) 802-807

Kang, S., Bader, A.G., Zhao, L. and Vogt, P.K. Mutated PI 3-Kinases: Cancer Targets on a Silver Platter. *Cell Cycle*. 4 (2005b) 578-581

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J. and Wright, C.V. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics*. 32 (2002) 128-134

Kennedy, A.L., Morton, J.P., Manoharan, I., Nelson, D.M., Jamieson, N.B., Pawlikowski, J.S., McBryan, T., Doyle, B., McKay, C., Oien, K.A., Enders, G.H., Zhang, R., Sansom, O.J. and Adams, P.D. Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Molecular cell*. 42 (2011) 36-49

Kok, K., Geering, B. and Vanhaesebroeck, B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in biochemical sciences*. 34 (2009) 115-127

Liu, Z. and Roberts, T.M. Human Tumor Mutants in the p110 α Subunit of PI3K. *Cell Cycle*. 5 (2006) 675-677

Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K. and Raspa, M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*. 48 (2014) 178-192

Morris, J.P.t., Wang, S.C. and Hebrok, M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews. Cancer*. 10 (2010) 683-695

Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G.I. and Schmid, R.M. Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development*. 134 (2007) 1151-1160

Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A.A., Fumanelli, M. and Illgen-Wilcke, B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*. 36 (2002) 20-42

Pinho, A.V., Rooman, I., Reichert, M., De Medts, N., Bouwens, L., Rustgi, A.K. and Real, F.X. Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut*. 60 (2011) 958-966

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. and Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews. Cancer*. 11 (2011) 761-774

Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Velculescu, V.E. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer cell*. 7 (2005) 561-573

Sauer, B. and Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (1988) 5166-5170

Seidler, B., Schmidt, A., Mayr, U., Nakhai, H., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (2008) 10137-10142

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 62 (2012) 10-29

- Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics*. 21 (1999) 70-71
- Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 98 (1975) 503-517
- Tuveson, D.A. and Hingorani, S.R. Ductal pancreatic cancer in humans and mice. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 70 (2005) 65-72
- Vandamme, T.F. Use of rodents as models of human diseases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 6 (2014) 2-9
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. and Goggins, M. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 378 (2011) 607-620
- Vogt, P.K., Bader, A.G. and Kang, S. PI 3-Kinases Hidden Potentials Revealed. *Cell Cycle*. 5 (2006) 946-949
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M.C., Robertson, A.J., Fadlullah, M.Z., Bruxner, T.J., Christ, A.N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Wani, S., Wilson, P.J., Markham, E., Cloonan, N., Anderson, M.J., Fink, J.L., Holmes, O., Kazakoff, S.H., Leonard, C., Newell, F., Poudel, B., Song, S., Taylor, D., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M.J., Lee, H.C., Jones, M.D., Nagrial, A.M., Humphris, J., Chantrill, L.A., Chin, V., Steinmann, A.M., Mawson, A., Humphrey, E.S., Colvin, E.K., Chou, A., Scarlett, C.J., Pinho, A.V., Giry-Laterriere, M., Rooman, I., Samra, J.S., Kench, J.G., Pettitt, J.A., Merrett, N.D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Jamieson, N.B., Graham, J.S., Niclou, S.P., Bjerkvig, R., Grutzmann, R., Aust, D., Hruban, R.H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Corbo, V., Bassi, C., Falconi, M., Zamboni, G., Tortora, G., Tempero, M.A., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Gill, A.J., Eshleman, J.R., Pilarsky, C., Scarpa, A., Musgrove, E.A., Pearson, J.V., Biankin, A.V. and Grimmond, S.M. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 518 (2015) 495-501
- 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. and Yeo, C.J. Pancreatic cancer. *Current Problems in Cancer*. 26 (2002) 176-275
- Ying, H., Elpek, K.G., Vinjamoori, A., Zimmerman, S.M., Chu, G.C., Yan, H., Fletcher-Sananikone, E., Zhang, H., Liu, Y., Wang, W., Ren, X., Zheng, H., Kimmelman, A.C., Paik, J.H., Lim, C., Perry, S.R., Jiang, S., Malinn, B., Protopopov, A., Colla, S., Xiao, Y., Hezel, A.F., Bardeesy, N., Turley, S.J., Wang, Y.A., Chin, L., Thayer, S.P. and DePinho, R.A. PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF-kappaB-cytokine network. *Cancer discovery*. 1 (2011) 158-169
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., Yan, H., Wang, W., Chen, S.,

Viale, A., Zheng, H., Paik, J.H., Lim, C., Guimaraes, A.R., Martin, E.S., Chang, J., Hezel, A.F., Perry, S.R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J.M., Weissleder, R., Wang, Y.A., Chin, L., Cantley, L.C. and DePinho, R.A. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 149 (2012) 656-670

Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. and Backer, J.M. Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 α Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. *Molecular and Cellular Biology*. 18 (1998) 1379-1387

Zambrowicz, B.P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G. and Soriano, P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (1997) 3789-3794

Zhao, J.J., Liu, Z., Wang, L., Shin, E., Loda, M.F. and Roberts, T.M. The oncogenic properties of mutant p110 α and p110 β phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 18443-18448

Zhao, L. and Vogt, P.K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. 27 (2008a) 5486-5496

Zhao, L. and Vogt, P.K. Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (2008b) 2652-2657

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurde in der internationalen englischsprachigen Fachzeitschrift *Cancer Cell* (Impact factor 2013: 23,893) nach einem peer review Verfahren veröffentlicht:

Eser, S.*, Reiff, N.*, Messer, M.*, Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., Michalski, C.W., Schlitter, A.M., Esposito, I., Kind, A.J., Rad, L., Schnieke, A.E., Baccarini, M., Alessi, D.R., Rad, R., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell*. 23 (2013) 406-420

* equal contribution

8 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Curriculum vitae

Marlena Braun, geb. Messer
geboren am 15.02.1984 in Berlin

Beruflicher Werdegang

Seit 01.01.2010 Assistenzärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Roland M. Schmid)

Hochschul- und Schulbildung

22.12.2009 Approbation als Ärztin, München

2005 - 2009 Technische Universität München
Studiengang: Humanmedizin (klinischer Abschnitt)
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2003 – 2005 Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang: Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt)
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

1994 – 2003 Franz-Marc-Gymnasium in Markt-Schwaben, Abitur

1990-1994 Grundschule in Berlin

10 Publikationsliste

Lahmer, T., Messer, M., Mayr, U., Saugel, B., Noe, S., Schultheiss, C., Thies, P., Spinner, C., Nennstiel, S., Schwerdtfeger, C., Phillip, V., Schmid, R.M., Huber, W. Fungal „colonisation“ is associated with increased mortality in medical intensive care unit patients with liver cirrhosis. *Mycopathologia*. 179 (1-2) (2015) 63-71

Saugel, B., Mair, S., Meidert, A.S., Phillip, V., Messer, M., Nennstiel, S., Berger, H., Gaa, J., Wagner, J.Y., Schneider, H., Schmid, R.M. and Huber, W. The effects of transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt on systemic cardiocirculatory parameters. *Journal of critical care*. 29(6) (2014) 1001-5

Lahmer, T.*, Messer, M.*, Schwerdtfeger, C., Rasch, S., Lee, M., Saugel, B., Schmid, R.M. and Huber, W. Invasive mycosis in medical intensive care unit patients with severe alcoholic hepatitis. *Mycopathologia*. 177 (2014) 193-197

* equal contribution

Saugel, B., Gramm, C., Wagner, J.Y., Messer, M., Lahmer, T., Meidert, A.S., Schmid, R.M. and Huber, W. Evaluation of a dosing regimen for continuous vancomycin infusion in critically ill patients: an observational study in intensive care unit patients. *Journal of critical care*. 29 (2014a) 351-355

Saugel, B., Klein, M., Hapfelmeier, A., Phillip, V., Schultheiss, C., Meidert, A.S., Messer, M., Schmid, R.M., Huber, W. Effects of red blood cell transfusion on hemodynamic parameters: a prospective study in intensive care unit patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 21 (2013) 1-7

Diersch, S., Wenzel, P., Szameitat, M., Eser, P., Paul, M.C., Seidler, B., Eser, S., Messer, M., Reichert, M., Pagel, P., Esposito, I., Schmid, R.M., Saur, D., Schneider, G. Efemp1 and p27(Kip1) modulate responsiveness of pancreatic cancer cells towards a dual PI3K/mTOR inhibitor in preclinical models. *Oncotarget*. 4 (2013) 277-288

Eser, S.*, Reiff, N.*, Messer, M.*, Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., Michalski, C.W., Schlitter, A.M., Esposito, I., Kind, A.J., Rad, L., Schnieke, A.E., Baccarini, M., Alessi, D.R., Rad, R., Schmid, R.M., Schneider, G. and Saur, D. Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer cell*. 23 (2013) 406-420

* equal contribution

Saugel, B., Phillip, V., Ernesti, C., Messer, M., Meidert, A.S., Schmid, R.M. and Huber, W. Impact of large-volume thoracentesis on transpulmonary thermodilution-derived extravascular lung water in medical intensive care unit patients. *Journal of critical care*. 28 (2013) 196-201

Eser, S.*, Messer, M.*, Eser, P., von Werder, A., Seidler, B., Bajbouj, M., Vogelmann, R., Meining, A., von Burstin, J., Algül, H., Pagel, P., Schnieke, A.E., Esposito, I., Schmid, R.M., Schneider, G., Saur, D. In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (2011) 9945-9950

* equal contribution

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

11 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben und die mich bei meiner Arbeit im Labor und später beim Schreiben der Arbeit unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Roland M. Schmid, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Klinik Grundlagenforschung zu betreiben und meine Doktorarbeit zu schreiben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dieter Saur, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat, für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine hervorragende Betreuung. Seine brillante Art wissenschaftlich zu arbeiten und sein unermüdliches Engagement waren stets ein Vorbild für mich.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Barbara Seidler bedanken, für ihre fortwährende Unterstützung sowohl in theoretischen als auch in methodischen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dieter Saur danken, die an diesem Projekt mitgewirkt haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Stefan Eser, Mariel Paul und Nina Reiff.

Von Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre immerwährende Unterstützung in jeder Lebenslage.