

Fakultät für Medizin

Analyse der Pdk1-abhängigen Signalwege im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Felix Andreas Hesse

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

eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dieter Saur

2. Priv.-Doz. Dr. Anna M. Schlitter

Die Dissertation wurde am 03.12.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.08.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabellenverzeichnis..... | IV |
| Abbildungsverzeichnis..... | V |
| Abkürzungsverzeichnis..... | VI |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Pankreaskarzinom | 1 |
| 1.1.1 Therapie des Pankreaskarzinoms..... | 1 |
| 1.1.2 Histologische Entwicklung | 2 |
| 1.1.3 Mutationen zur Entstehung des PDAC | 4 |
| 1.2 Der PI3K/AKT Signalweg und die zentrale Bedeutung von PDK1 | 4 |
| 1.3 Genveränderte Mausmodelle | 6 |
| 1.3.1 Genetisch veränderte Mausmodelle zur Entwicklung des PDAC | 6 |
| 1.3.2 Genetisch verändertes Mausmodell zur Inhibierung der PH-abhängigen regulatorischen Untereinheit von PDK1 | 7 |
| 1.3.3 Genetisch verändertes Mausmodell zur Inhibierung der PIF-abhängigen regulatorischen Untereinheit von PDK1 | 7 |
| 1.3.4 Genetisch verändertes Mausmodell zur pankreasspezifischen Inaktivierung von PDK1 | 8 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 8 |
| 2. Material | 9 |
| 2.1 Puffer und Lösungen..... | 9 |
| 2.2 Histologie | 10 |
| 2.3 Reagenzien und Chemikalien | 11 |
| 2.4 Antikörper | 13 |
| 2.5 Primer | 14 |
| 2.6 Kits..... | 15 |
| 2.7 Technische Geräte..... | 15 |
| 2.8 Verbrauchsmaterialien | 17 |
| 3. Methodik..... | 18 |
| 3.1 Mauslinien..... | 18 |
| 3.1.1 <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} (Nakhai et al., 2007)..... | 18 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2 | <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} (Hingorani et al., 2003; Jackson et al., 2001) | 18 |
| 3.1.3 | <i>Pdk1</i> ^{f/+} (Lawlor et al., 2002) | 18 |
| 3.1.4 | <i>Pdk1</i> ^{K465E/+} (Bayascas et al., 2008) | 18 |
| 3.1.5 | <i>Pdk1</i> ^{L155E/+} (Bayascas, Sakamoto, Armit, Arthur, & Alessi, 2006) | 19 |
| 3.2 | Sektion von Mäusen | 19 |
| 3.2.1 | BrdU Injektion | 19 |
| 3.2.2 | Sektion | 19 |
| 3.3 | Histologische Analyse | 20 |
| 3.3.1 | Gewebefixation und Schneiden der Paraffinblöcke | 20 |
| 3.3.2 | Mikrodissektion | 20 |
| 3.3.3 | Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung | 20 |
| 3.3.4 | Alcianblaufärbung | 21 |
| 3.3.5 | Immunhistochemie | 21 |
| 3.3.6 | Auszählung von PanIN Läsionen | 22 |
| 3.4 | DNS-Analyse | 22 |
| 3.4.1 | DNS-Isolierung | 22 |
| 3.4.2 | Isolation von DNS aus Gewebe | 22 |
| 3.4.3 | Isolation von DNS aus mikrodissezierten Proben | 22 |
| 3.4.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 23 |
| 3.4.4.1 | Genotypisierung und Nachgenotypisierung | 23 |
| 3.4.4.2 | Rekombinations-PCR | 24 |
| 3.4.5 | Gelelektrophorese bei PCR | 25 |
| 3.4.6 | Aufreinigung von PCR-Produkten | 25 |
| 3.5 | Protein-Analyse | 25 |
| 3.5.1 | Proteinbestimmung nach Bradford | 25 |
| 3.5.2 | Western-Blot | 26 |
| 3.6 | Statistische Datenanalyse | 27 |
| 4. | Ergebnisse | 28 |
| 4.1 | Analyse der PDK1-abhängigen Signalwege im duktalem Adenokarzinom des Pankreas | 28 |
| 4.2 | Analyse des PH-abhängigen Signalweges von PDK1 im <i>Ptf1a</i> ^{Cre/+} ; <i>LSL-Kras</i> ^{G12D/+} ; <i>Pdk1</i> ^{f/K465E} -Mausmodell | 28 |
| 4.2.1 | Die Inhibierung der PH-Domäne verhindert die Karzinogenese des PDAC in den ersten 12 Monaten trotz Expression von onkogenem <i>Kras</i> | 29 |
| 4.2.2 | Die Blockade des PI3K/AKT-Signalweges führt zu einer signifikanten Reduktion an Vorläuferläsionen | 33 |
| 4.2.3 | Der Funktionsverlust der PH-Domäne führt zu einer Dephosphorylierung von AKT | 36 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.4 | Blockade des PIF-unabhängigen AKT-Signalweges beeinflusst die Überlebenszeit und verhindert in bisher untersuchten Tieren die KRAS-induzierte Entstehung von PDAC in vivo..... | 37 |
| 4.3 | Analyse des PIF-abhängigen Signalweges von PDK1 im <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}</i> -Mausmodell | 39 |
| 4.3.1 | Auftreten von Vorläuferläsionen in der <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}</i> -Maus innerhalb eines Jahres | 40 |
| 4.3.2 | Die Inhibierung der PIF-Domäne führt zu einer Reduktion an Vorläuferläsionen im Vergleich zu <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}</i> -Mäusen..... | 43 |
| 4.3.3 | Die Inaktivierung des PIF-abhängigen Signalweges durch die <i>Pdk1^{L155E/+}</i> -Mutante beeinflusst die Phosphorylierung von AKT nicht..... | 45 |
| 4.3.4 | Die <i>Ptf1a^{Cre/+}</i> -Rekombinase führt zu einer pankreasspezifischen Rekombination der <i>Pdk1^{L155E/+}</i> -Mutante | 46 |
| 4.3.5 | Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges verkürzt das Überleben ohne Nachweis einer KRAS-induzierten Tumorgenese des PDAC | 47 |
| 4.4 | Vergleich der beiden Mutanten im <i>Kras</i> -Modell | 49 |
| 4.5 | Analyse der Expression des Pdk1-abhängigen Signalweges von AKT, SGK und RSK2 | 51 |
| 5. | Diskussion..... | 53 |
| 5.1 | Inaktivierung der PH-Domäne von PDK1 | 53 |
| 5.2 | Inaktivierung der PIF-Domäne von PDK1..... | 55 |
| 5.3 | Ausblick | 58 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 60 |
| 7. | Summary..... | 61 |
| 8. | Quellen..... | 62 |
| 9. | Danksagung..... | 67 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 2.1 Puffer und Lösungen | 9 |
| Tabelle 2.2 Histologie..... | 10 |
| Tabelle 2.3 Reagenzien und Chemikalien | 11 |
| Tabelle 2.4 Antikörper | 13 |
| Tabelle 2.5 Primer..... | 14 |
| Tabelle 2.6 Kits | 15 |
| Tabelle 2.7 Technische Geräte | 15 |
| Tabelle 2.8 Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| Tabelle 3.1 Reaktionsmix..... | 23 |
| Tabelle 3.2 PCR-Kondition..... | 23 |
| Tabelle 3.3 Primerhybridisierung und Bandengrößen der Genotypisierungs-PCR | 23 |
| Tabelle 3.4 Reaktionsmix Rekombinations-PCR | 24 |
| Tabelle 3.5 Konditionen Rekombinations-PCR..... | 24 |
| Tabelle 3.6 Primer und Bandengrößen Rekombinations-PCR..... | 25 |
| Tabelle 3.7 Sammelgel | 26 |
| Tabelle 3.8 Trenngel 12% | 26 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Entstehungsmodell des duktales Adenokarzinoms des Pankreas | 3 |
| 1.2 | PDK1 besitzt zwei regulatorische Untereinheiten..... | 5 |
| 4.1 | Aufbau und Nachweis der <i>Pdk1^{f/K465E}</i> -Mauslinie..... | 29 |
| 4.2 | Normales Wachstum und morphologisch unauffälliges Pankreas der <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}</i> -Mäuse | 31 |
| 4.3 | <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}</i> -Tiere entwickeln PanIN Läsionen jedoch kein PDAC | 33 |
| 4.4 | <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}</i> -Tiere zeigen eine Reduktion an Vorläuferläsionen..... | 36 |
| 4.5 | Die <i>Pdk1^{K465E/+}</i> -Mutante führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT im Pankreas..... | 37 |
| 4.6 | Die Inaktivierung des PH-abhängigen Signalweges beeinflusst die Überlebenszeit und blockiert in bisher untersuchten Tieren die KRAS-induzierte Tumorgenese des PDAC..... | 38 |
| 4.7 | Aufbau und Nachweis der <i>Pdk1^{f/L155E}</i> -Mauslinie | 39 |
| 4.8 | Unauffälliger Phänotyp und morphologisch normales Pankreas der <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}</i> -Mäuse | 41 |
| 4.9 | <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}</i> -Tiere entwickeln niedriggradige Vorläuferläsionen..... | 42 |
| 4.10 | <i>Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}</i> -Tiere weisen eine Blockade höhergradiger PanIN innerhalb eines Jahres auf | 45 |
| 4.11 | Die <i>Pdk1^{L155E/+}</i> -Mutante beeinflusst die Phosphorylierung von AKT-T308 im Pankreas nicht | 46 |
| 4.12 | Die <i>Ptf1a^{Cre/+}</i> -Rekombinase führt zu einer pankreasspezifischen Rekombination der <i>Pdk1^{L155E/+}</i> -Mutante | 47 |
| 4.13 | Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges verkürzt das Überleben ohne Nachweis einer KRAS-induzierten Tumorgenese des PDAC und führt zu einer lipomatösen Atrophie des Pankreas..... | 48 |
| 4.14 | Durch die Blockade der PH-Domäne kommt es zu weniger Vorläuferläsionen und einem längerem Überleben als durch die Blockade der PIF-Bindungstasche in endogenen Pankreaskarzinommodell | 50 |
| 4.15 | Funktionsverlust der PH-Domäne resultiert in einer Reduktion von AKT, die Inaktivierung der PIF-Bindungstasche bewirkt eine Reduktion von SGK und RSK2..... | 52 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| ADM | azinäre zu duktales Metaplasie |
| AFL | atypische flache Läsionen |
| AGC | Klasse der Proteinkinasen A, G und C |
| AK | Antikörper |
| AKT | Proteinkinase B |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BP | Basenpaare |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Deoxyuridin |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cDNS | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| Cre | causes recombination |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxy-Nukleosid-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECOG | Eastern Cooperative Oncology Group |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epidermaler Wachstumsfaktor |
| EGFR | epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| ERK | extrazelluläre signalregulierte Kinase |
| et al. | et alii (und andere) |
| FCS | fötale Kälberserum |
| g | Gramm |
| GAP | GTPase aktivierende Proteine |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunden |
| H&E | Hämatoxylin und Eosin |
| IPMN | intraduktal papillär muzinöse Neoplasie |
| KRAS | Kirsten Rat Sarkoma Virus |
| loxP | Locus of X over P1 |
| LSL | loxP-Stopp-loxP |
| M | Mol |
| MCN | muzinöse zystische Neoplasie |
| MEK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| MMF | Midazolam, Medetomidin, Fentanyl |
| mut | mutiert |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomol |
| p | phosphoryliert |
| PanIN | pankreatische intraepitheliale Neoplasie |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDAC | pankreatisches duktales Adenokarzinom |
| PDK1 | 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 |
| Pdx1 | pankreatische und duodenale Homeobox 1 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|----------------------------------------------------------|
| PFA | Paraformaldehyd |
| PH | Pleckstrin-Homologie |
| PIF | PDK1-interagierendes Fragment |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| PKC | Proteinkinase C |
| Ptf1a | pankreatischer Transkriptionsfaktor 1 Untereinheit Alpha |
| Raf | rapidly accelerated fibrosarcoma |
| RAS | Rat Sarkoma Virus |
| RNase | Ribonuklease |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RSK | P90-Ribosomale-S6-Kinase |
| RSK2 | P90-Ribosomale-S6-Kinase 2 |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SGK | Serum-und-Glukokortikoid-induzierte-Proteinkinase |
| S6K | P70-Ribosomale-S6-Kinase |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| TEMED | <i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylenediamine |
| TGF α | transformierender Wachstumsfaktor α |
| TGF β | transformierender Wachstumsfaktor β |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| uspez. | unspezifisch |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| μ l | Mikroliter |
| μ m | Mikrometer |
| μ M | Mikromol |

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Tumoren der Bauchspeicheldrüse gehören zu den Tumoren mit der höchsten Letalität und stellen in Europa und den USA die vierthäufigste Todesursache für Frauen und Männer mit einem mittleren Überleben von 4-6 Monaten und einer 5-Jahresüberlebensrate von 7% dar (Siegel, Miller, & Jemal, 2015). In Deutschland erkranken jährlich circa 16000 Menschen und fast genauso viele sterben am Pankreaskarzinom (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Atlas der Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland, Datenlieferung: Dezember 2014, Lübeck, 2015). Im Gegensatz zu den meisten Tumorentitäten nimmt die Inzidenz kontinuierlich zu und die Prognose hat sich in den letzten Jahren trotz intensiver Forschung kaum verbessert (Siegel et al., 2015).

In nahezu 85% der Fälle handelt es sich um das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC), welches meist im Pankreaskopf auftritt und sich durch ein schnelles Wachstum und eine hohe Metastasierungsrate auszeichnet (Hezel, Kimmelman, Stanger, Bardeesy, & Depinho, 2006). Es infiltriert in umliegende Gewebe wie lymphatisches Gewebe, Milz und Peritonealhöhle. Häufige Lokalisationen von Metastasen sind Lymphknoten, Leber, Lunge und Peritoneum (Hezel et al., 2006). Nur 10% des PDAC sind familiär bedingt, der Rest tritt spontan auf (Shi, Hruban, & Klein, 2009). Bekannte Risikofaktoren hierbei sind Rauchen, Alkoholabusus und chronische Pankreatitis (Becker, Hernandez, Frucht, & Lucas, 2014; Genkinger et al., 2009; Iodice, Gandini, Maisonneuve, & Lowenfels, 2008; Raimondi, Lowenfels, Morselli-Labate, Maisonneuve, & Pezzilli, 2010). Weiterhin werden Diabetes und Übergewicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Becker et al., 2014; Berrington de Gonzalez, Sweetland, & Spencer, 2003; Huxley, Ansary-Moghaddam, Berrington de Gonzalez, Barzi, & Woodward, 2005; Larsson et al., 2005). Ein großes diagnostisches Problem ist das Fehlen von Frühsymptomen, sodass 80% der Fälle im Palliativstadium diagnostiziert werden. Die hohe Letalität, die steigende Inzidenz und die trotz intensiver Forschung weiterhin ungünstige Prognose rechtfertigen die molekularbiologische Auseinandersetzung mit der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms und die Suche nach neuen Therapiestrategien.

1.1.1 Therapie des Pankreaskarzinoms

15-25% der Fälle werden in einem potentiell kurativen Stadium diagnostiziert und kommen für eine chirurgische Resektion in Frage (Adamska, Domenichini, & Falasca, 2017). Jedoch beträgt bei diesen Patienten trotz Resektabilität des Tumors die 5-Jahresüberlebensrate nur 10,4% (Doi et al., 2008; Gall, Tsakok, Wasan, & Jiao, 2015; Goodman & Saif, 2014). Eine

zusätzlich zur Operation eingesetzte adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder Fluoropyrimidin-basierten Therapeutika erhöht die 5-Jahreüberlebensrate auf 20,7% (Neoptolemos et al., 2012; Oettle et al., 2013).

Die palliative Behandlung der nicht resektablen Tumoren mit und ohne Metastasen beinhaltet nach den Leitlinien in erster Linie die systemische Chemotherapie, nachrangige Alternativen sind die Chemoradiotherapie und Radiotherapie. Aufgrund der Tumorbiologie und Heterogenität des PDAC ist die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber Chemotherapeutika wenig ausgeprägt. Als Erstlinientherapie ist Gemcitabin mit einem mittleren Überleben von circa 6 Monaten seit mehreren Jahren Mittel der Wahl (Burriss et al., 1997; Sultana et al., 2007). Die Kombination von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel verlängert das mittlere Überleben um 2,1 Monate im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin (Goldstein et al., 2015; Von Hoff et al., 2013) und die Kombination von Gemcitabin mit Erlotinib verlängert das mittlere Überleben um 0,3 Monate im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin (Moore et al., 2007). Eine neuere Alternative im Fall des palliativen Patienten ist das FOLFIRINOX-Schema, es ist eine Kombinationschemotherapie aus Fluoruracil, Oxaliplatin, Irinotecan und Leucovorin. In einer kontrollierten Studie mit 342 Patienten führte das Schema zu einem Überlebensvorteil mit 11,1 Monaten im Vergleich zu 6,8 Monaten unter einer alleinigen Therapie mit Gemcitabin. Allerdings war das FOLFIRINOX-Schema mit einer höheren Rate an schwerwiegenden Nebenwirkungen wie sensorischer Polyneuropathie, febriler Neutropenie und Diarrhoe behaftet, sodass es vor allem für Patienten mit einem guten ECOG-Performance Status in Frage kommt (Conroy et al., 2011).

Die geringe 5-Jahres-Überlebensrate operabler Patienten und das schlechte Ansprechen auf nebenwirkungsreiche Chemotherapeutika im Falle des palliativen Patienten sind weitere Gründe, das Verständnis über die Initiierung und Progression des PDAC zu verbessern, um so neue Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie zu etablieren. Dafür ist eine Auseinandersetzung mit der histologischen Entwicklung und den zu Grunde liegenden Mutationen des PDAC essentiell.

1.1.2 Histologische Entwicklung

Die Entwicklung des PDAC ist ein multifaktorieller Vorgang, der mit histologischen und genetischen Veränderungen einhergeht. Die häufigsten nicht-malignen Vorläuferläsionen, aus denen ein invasives Karzinom entstehen kann, sind die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Daneben kommen seltener intraduktal papillär muzinöse Neoplasien (IPMN), muzinöse zystische Neoplasien (MCN) und atypische flache Läsionen (AFL) als Vorläuferläsionen des PDAC vor (Aichler et al., 2012; Brugge, Lauwers, Sahani, Fernandez-del Castillo, & Warshaw, 2004; Esposito, Konukiewitz, Schlitter, & Kloppel, 2014). Nach neuesten Erkenntnissen entsteht das PDAC aus azinären Zellen, die zu duktalem Zellen im

Rahmen der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) transdifferenzieren. PanIN entspringen duktalem Epithelzellen, die in normalen Pankreasgängen typischerweise eine kubische Form besitzen. Aufgrund morphologischer Kriterien werden PanIN in drei Stufen eingeteilt, mit denen zugleich eine Zunahme an nukleären Atypien beschrieben wird. Aus den hochgradigen PanIN entsteht im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz mit Invasion der Basalmembran das PDAC (Esposito et al., 2014). Niedriggradige PanIN sind auch in bis zu 40% von nicht-malignen Pankreata bei Patienten älter als 50 Jahre zu finden (Hruban et al., 2004; Schneider, Siveke, Eckel, & Schmid, 2005).

PanIN1A stellen sich als flache Läsionen mit hochprismatischen Epithelzellen, die an der Basalmembran gelegene Kerne und darüber reichlich Muzin besitzen, dar. PanIN1B entsprechen den PanIN1A, weisen jedoch zusätzlich eine papilläre, mikropapilläre oder basal pseudostratifizierte Architektur auf (Hruban et al., 2001). PanIN2 sind meist papillär, können aber auch flach sein. Von der Zytologie her müssen diese Läsionen nukleäre Anomalien aufweisen, wie den Verlust der Polarität, vergrößerte Nuklei sowie pseudostratifizierte und hyperchromatische Zellen, die sich gruppieren. Mitosen sind selten und wenn vorhanden, dann nicht-apikal und typisch (Hruban et al., 2001). PanIN3 sind normalerweise papillär oder mikropapillär und besitzen eine siebartige Struktur. Typisch für diese Läsion sind abgelöste Zellhaufen, die in das Lumen ragen und luminal gelegene Zellnekrosen. Der Verlust der Kernpolarität, dystrophische Becherzellen, zum Teil abnormale Mitosen, Kernatypien und prominente Nukleoli sind weitere definierende Merkmale der PanIN3 und ähneln auf zyt nukleärem Level bereits Karzinomen. Da es jedoch zu keiner Invasion der Basalmembran kommt, werden PanIN3 auch als „carcinoma in situ“ bezeichnet (Hruban et al., 2001) (Abbildung 1.1). Als höhergradige PanIN werden PanIN2 und PanIN3 bezeichnet.

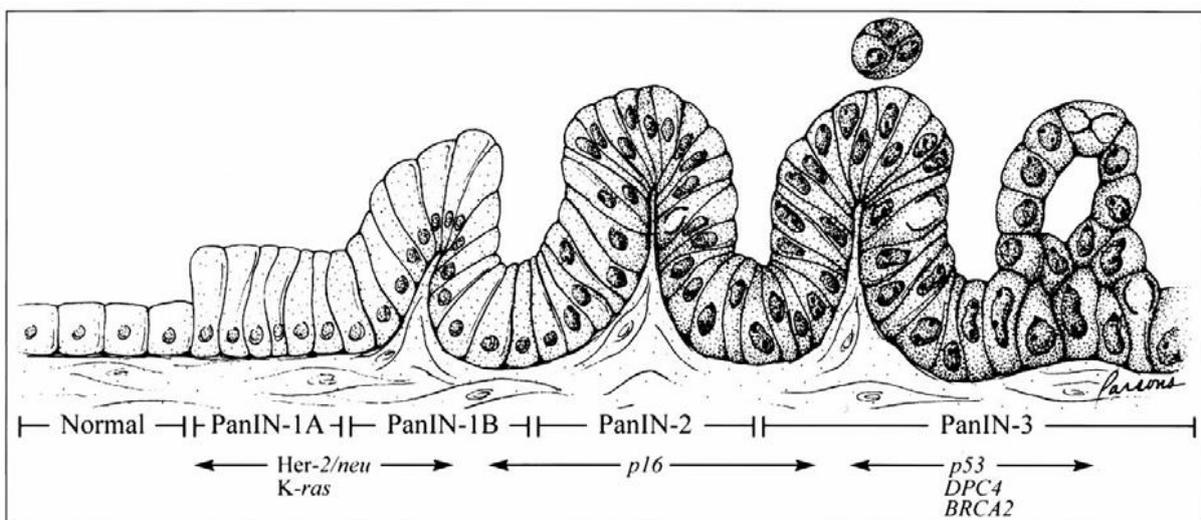


Abbildung 1.1: Entstehungsmodell des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas

Normales Gangepithel entwickelt sich über verschiedene histologisch definierte Vorstufen, sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), zu einem invasiven Adenokarzinom des Pankreas. Die Überexpression von Her-2/neu sowie die Punktmutation von KRAS sind frühe Ereignisse, gefolgt von einer Inaktivierung der Gene p16, p53, DPC4 und BRCA2.

Nachdruck mit Erlaubnis der American Association for Cancer Research. (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000)

1.1.3 Mutationen zur Entstehung des PDAC

Viele Mutationen führen zur Entstehung des PDAC, dabei ist *KRAS* eine der frühesten und häufigsten Mutationen. *KRAS* gehört zu den GTP-bindenden Proteinen und ist Mitglied der Ras-Familie, die viele zelluläre Funktionen steuert, unter anderem Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle. *KRAS* selbst wird durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 IGF-1 und den Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor PDGFR aktiviert und führt zu einer Stimulation vieler Signalkaskaden, vor allem des Raf/MEK/ERK-, des Ral/GDS- und des PI3K/AKT-Signalweges.

Obwohl es sich bei *KRAS* um eine GTPase handelt, ist die intrinsische Aktivität ineffizient. Daher benötigt *KRAS* zur Inaktivierung GTPase aktivierende Proteine (GAP). Durch eine meist sporadisch auftretende Substitution von Glyzin zu Asparaginsäure oder Valin (G12D oder G12V) im Kodon 12 des *KRAS*-Gens kommt es zu einer Abnahme der intrinsischen GTPase-Aktivität sowie zu einer Intoleranz gegenüber der GAP, was eine kontinuierliche Aktivierung von *KRAS* zur Folge hat. Diese Mutation findet sich bereits in über 95% der PanIN1A Läsionen und erreicht im fortgeschrittenen PDAC eine Häufigkeit von annähernd 100% (Kanda et al., 2012; Morris, Wang, & Hebrok, 2010). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass onkogenes *KRAS* neben Proliferation und Erhaltung des Tumors auch für die Initiierung des PDAC verantwortlich ist (Collins et al., 2012; Hingorani et al., 2003; Morris et al., 2010; Pylayeva-Gupta, Grabocka, & Bar-Sagi, 2011). Stimmig mit der zentralen Rolle von *KRAS* in der Pathogenese des humanen PDAC, führt die Expression der *Kras*^{G12D}-Mutation auch im murinen Pankreas zu ADM und zu PanIN, die zu metastasierten PDAC fortschreiten. Der naheliegende therapeutische Versuch, mittels Inhibitoren onkogenes *KRAS* zu inaktivieren, war bisher nicht erfolgreich. RAS-Proteine gelten auf Grund ihres einfachen Aufbaus und ihrer hohen GTP-Affinität als nicht medikamentös angreifbar (Dunne & Hezel, 2015; Fang, 2015). Daher konzentriert sich die Forschung darauf, nachgeschaltete Signalwege auf ihr therapeutisches Potential hin zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit greift diesen Gedanken auf und untersucht die Rolle des PI3K/AKT-Signalweges im Pankreaskarzinom mit Hilfe eines Tumormausmodells.

1.2 Der PI3K/AKT-Signalweg und die zentrale Bedeutung von PDK1

Der PI3K/AKT-Signalweg ist durchgehend im menschlichen PDAC und in Mausmodellen mit *KRAS*-induziertem Pankreaskarzinom aktiviert und spielt bei der Inhibierung der Apoptose, Förderung der Zellteilung und Stimulation der Glukoseaufnahme sowie -lagerung eine entscheidende Rolle (Hezel et al., 2006; Jimeno et al., 2008; Kennedy et al., 2011; Lawlor & Alessi, 2001; Reichert, Saur, Hamacher, Schmid, & Schneider, 2007; Ying et al., 2011).

Einleitung

Dazu aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) nachgeschaltete Effektoren, indem sie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) durch eine Phosphorylierung an der D3 Position des Inositolringes in den Secondmessenger Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) konvertiert (Alessi et al., 1997; Mora, Komander, van Aalten, & Alessi, 2004).

PIP₃ bindet Proteine mit einer Pleckstrin-Homologie Domäne (PH-Domäne), wie die 3-Phosphoinositid-anhängige Proteinkinase 1 (PDK1) und AKT (Cantley, 2002). Durch diese Bindung werden die Proteine an der Plasmamembran translokalisiert. Zur Aktivierung von AKT ist eine durch PIP₃ herbeigeführte Kolokalisation mit PDK1 an der Plasmamembran notwendig sowie eine durch PIP₃ herbeigeführte Konformitätsänderung von AKT, die es PDK1 ermöglicht, AKT an Threonin 308 zu phosphorylieren und zu aktivieren (Alessi et al., 1997; Currie et al., 1999; Milburn et al., 2003). PDK1 ist somit zentrales Element der PI3K-abhängigen Aktivierung von AKT.

PDK1 selbst ist eine Masterkinase, sie kommt im Körper ubiquitär vor, ist ständig exprimiert und für das Leben erforderlich (Mora et al., 2004). Eine komplette Inaktivierung verbietet sich somit, wodurch sich die Frage stellt, ob durch Inaktivierung PDK1-abhängiger Signalkaskaden die Karzinogenese verhindert werden kann. PDK1 besitzt zwei regulatorische Untereinheiten, N-Terminal gelegen eine Kinase-Domäne, das PDK1-interagierendes-Fragment (PIF-Domäne) und zum anderen C-Terminal gelegen die Pleckstrin-Homologie Domäne (PH-Domäne) (Abbildung 1.2). Die PH-Domäne ist wie oben beschrieben für die Aktivierung von AKT verantwortlich. Die PIF-Domäne aktiviert die P70-Ribosomale-S6-Kinase (S6K), die P90-Ribosomale-S6-Kinase (RSK), die Serum-und-Glukokortikoid-induzierte-Proteinkinase (SGK) und Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Hierfür ist die katalytische PIF-Bindungstasche entscheidend, mit der die hydrophoben Motive der nachgeschalteten Kinasen für eine Aktivierung interagieren müssen. Die PIF-Bindungstasche ist nicht für die Aktivierung von AKT vonnöten (Bayascas et al., 2006).

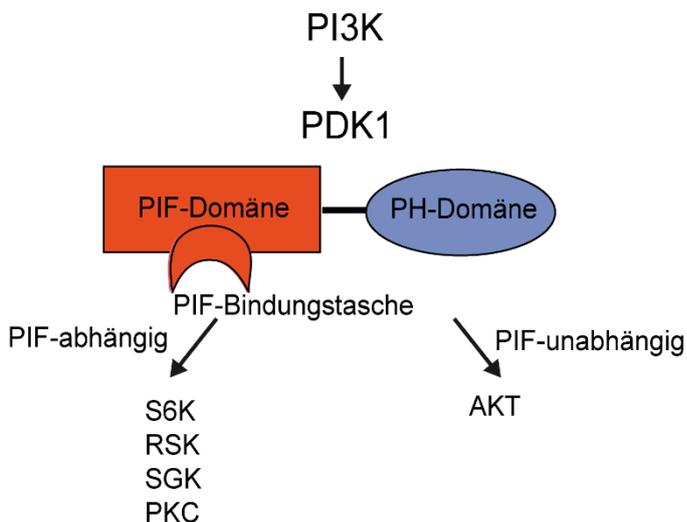


Abbildung 1.2: PDK1 besitzt zwei regulatorische Untereinheiten

PDK1 besteht aus zwei regulatorischen Untereinheiten, der PH-Domäne (blau) für die AKT-Phosphorylierung und der PIF-Domäne (rot) für die Aktivierung von S6K, RSK, SGK und PKC.

Bei angenommener zentraler Bedeutung von PDK1 in der Karzinogenese konnten Eser et al. in einem genetisch definierten murinen Modell zeigen, dass durch die pankreasspezifische Inaktivierung von PDK1 die Tumorentstehung im *Kras*^{G12D} abhängigen Modell vollständig blockiert wird (Eser et al., 2013). Dabei wurde PDK1 spezifisch im Pankreas inaktiviert, indem ein gefloxtes *Pdk1*-Allel mit dem genetisch hergestellten, endogenen *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormausmodell verkreuzt wurde. Der Verlust von PDK1 resultierte im *Kras*-Modell in einer normalen Lebenserwartung, wohingegen die Ausschaltung nur eines *Pdk1*-Allels die PanIN und PDAC Entwicklung nicht beeinflusste (Eser et al., 2013).

1.3 Genveränderte Mausmodelle

1.3.1 Genetisch veränderte Mausmodelle zur Entwicklung des PDAC

Aktuelle Mausmodelle zur Entwicklung des PDAC basieren vorrangig auf dem endogenen *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Expressionsmodell von Hingorani et al. Diese entwickelten eine Mauslinie in der KRAS und nachfolgende KRAS-Effektor-Signalkaskaden im Pankreas konstitutiv aktiviert sind (Hingorani et al., 2003). Hierbei wurde die onkogene G12D-Mutation in den endogenen *Kras*-Genlokus eingefügt (Jackson et al., 2001). Die G12D-Mutation entsteht durch den Austausch von Glycin mit Aspartat in Kodon 12, was zu einer verminderten intrinsischen GTPase-Aktivität führt. KRAS bleibt somit in seiner aktivierten Form (KRAS-GTP) bestehen und bewirkt eine konstitutive Aktivierung der KRAS-Effektor-Signalwege (Hingorani et al., 2003; Jackson et al., 2001). Eine der *Kras*^{G12D}-Mutation vorgeschaltete loxP-Stopp-loxP (LSL)-Sequenz verhindert dabei die Transkription und Translation von onkogenem *Kras*. Die loxP-flankierte Stopp-Kassette kann durch Cre-Rekombinasen herausgeschnitten und somit die *Kras*^{G12D}-Mutation spezifisch exprimiert werden. Eine gezielte Exzision der LSL-Kassette in den azinären Zellen des Pankreas erfolgt mittels Cre/loxP-Rekombinase unter Kontrolle des Promotors pankreatischer Transkriptionsfaktor 1 Untereinheit Alpha (*Ptf1a*) (Hingorani et al., 2003; Jackson et al., 2001).

Ptf1a ist ein pankreasspezifischer Transkriptionsfaktor, der ab dem embryonalen Tag 9,5 in pankreatischen Vorläuferzellen exprimiert wird und für die Entwicklung der Pankreaszellen essenziell ist. Bei Abwesenheit entstehen aus den Vorläuferzellen duodenale Epithelzellen, was ein Fehlen des murinen Pankreas zur Folge hat und für Mäuse kurz nach der Geburt letal ist. In adulten Mäusen wird *Ptf1a* ausschließlich in azinären Zellen des Pankreas exprimiert (Kawaguchi et al., 2002).

Die Pankreata der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse entwickeln PanIN mit kompletter Penetranz, die mit fortgeschrittenem Alter an Anzahl und Stadium zunehmen. Weiterhin konnte nach langfristiger Beobachtung gezeigt werden, dass die Tiere in Leber und Lunge

metastasierende PDAC entwickeln, die mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergehen (Hingorani et al., 2003).

1.3.2 Genetisch verändertes Mausmodell zur Inhibierung der PH-abhängigen regulatorischen Untereinheit von PDK1

Um die PH-abhängige regulatorische Untereinheit von PDK1 im murinen Modell zu inaktivieren, wurde eine Knock-in Punktmutation von Lysin 465 zu Glutaminsäure im Exon 12 des *Pdk1*-Gens (*Pdk1*^{K465E/K465E}) entwickelt (Bayascas et al., 2008). Die Mutation bedingt eine Konformationsänderung in der PH-Domäne von PDK1, die die Bindung von PDK1 zu PIP3 nicht mehr möglich macht und somit die Kollokalisierung an der Plasmamembran mit AKT unterbindet und die Phosphorylierung von AKT signifikant reduziert, jedoch nicht komplett verhindert (Bayascas et al., 2008). Die Mutation lässt die Stabilität der PH-Domäne und die Funktion der N-terminalen katalytischen Domäne und damit die Aktivierung von S6K, RSK und PKC unbeeinflusst (Bayascas et al., 2008). Die homozygoten *Pdk1*^{K465E/K465E}-Knock-in Mäuse sind lebensfähig und *Pdk1* ist normal exprimiert. Die Tiere sind ca. 35% kleiner als altersentsprechende Wildtypiere (Bayascas et al., 2008).

1.3.3 Genetisch verändertes Mausmodell zur Inhibierung der PIF-abhängigen regulatorischen Untereinheit von PDK1

Um die Interaktion zwischen der PIF-Bindungstasche von PDK1 und der hydrophoben Motive der abhängigen AGC-Kinasen selektiv zu unterbinden wurde das konditionelle Knock-in *Pdk1*^{L155E/+}-Mausmodell von Bayascas et al. verwendet. Durch eine Punktmutation von Leucin 155 zu Glutaminsäure im Exon 4 des *Pdk1*-Gens (*Pdk1*^{L155E/L155E}) kommt es zu einer Konformitätsänderung der PIF-Bindungstasche, die die Funktion der katalytischen Domäne spezifisch ausschaltet (Bayascas et al., 2006; Biondi et al., 2000). *Pdk1* jedoch ist normal exprimiert und die PH-Domäne bleibt unbeeinflusst.

Eine globale *Pdk1*^{L155E/L155E}-genveränderte Maus ist nicht lebensfähig (McManus et al., 2004). Um eine gewebespezifische Expression der Mutation zu ermöglichen, wurde die Minigenmethode verwendet (Bayascas et al., 2006). Das Minigen enthält die cDNA der Exons 3-14, die Intronsequenz 5' des Exons 3, um das Splicing zu erlauben, und ein Poly-A Schwanz 3' des Exons 14, um eine weitere Translation zu unterbinden. Das Minigen liegt hinter dem Exon 2 im *Pdk1*-Genlocus und ist von 2 loxP-Stellen flankiert. Dadurch kommt es in Gewebe ohne eine Cre-Rekombinase zu einer Expression von Wildtyp-*Pdk1*. Durch die Cre-vermittelte Rekombination wird das Minigen herausgeschnitten, dies resultiert in einer Expression der *Pdk1*^{L155E/L155E}-Mutante. Mäuse mit gewebespezifischer Expression der *Pdk1*^{L155E/L155E}-Mutante sind lebensfähig und *Pdk1* ist normal exprimiert (Bayascas et al., 2006).

1.3.4 Genetisch verändertes Mausmodell zur pankreasspezifischen Inaktivierung von PDK1

Für eine vollständige Inaktivierung von PDK1 wurde in dieser Arbeit das *Pdk1-flox* Modell von Lawlor et al. verwendet. In diesem ist eine Neomycin-Resistenz-Kassette umgeben von zwei loxP-Stellen in die Intronsequenz zwischen Exon 2 und 3 des *Pdk1*-Gens und eine loxP-Stelle in Intron 4 eingebaut. Dadurch werden die Zellen hypomorph für die *Pdk1*-Expression (Lawlor et al., 2002). Mit der *Ptf1a*-Cre-Rekombinase können die Kassette sowie Exon 3 und 4 ausgeschnitten werden, dies bewirkt eine Leserasterverschiebung, die die Expression des *Pdk1*-Gens nach Exon 2 verhindert, was zu einer pankreasspezifischen Dysfunktion von PDK1 führt und dabei die katalytische sowie die PH-Domäne mit einschließt (Lawlor et al., 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Übergeordnetes Ziel der Arbeit ist die Erforschung eines neuen Ansatzes in der Therapie des PDAC. Bis dato ist die Prognose des PDAC trotz leitliniengerechter chirurgischer und chemotherapeutischer Therapie ungünstig.

KRAS ist für die Initiierung und Erhaltung des PDAC verantwortlich und damit in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms anerkannt relevant. Es ist jedoch auf Grund seiner Größe und hohen GTP-Affinität nicht als therapeutisches Ziel geeignet. Onkogenes KRAS führt zu einer ständigen Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und somit auch von PDK1. Eser et al. konnten 2013 in einem genetisch definierten murinen Modell zeigen, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von PDK1 trotz Expression von onkogenem *Kras* zu einer vollständigen Blockade der Karzinogenese führt. PDK1 selbst besitzt zwei regulatorische Untereinheiten, die PH- und die PIF-Domäne, über die es verschiedene nachgeschaltete Kinasen aktiviert. Bisherige Annahme ist, dass die Aktivierung von AKT durch PDK1 für die Tumorgenese des PDAC verantwortlich ist. In dieser Arbeit wird daher im murinen Modell mittels selektiver Inaktivierung der PH-Domäne durch die *Pdk1*^{K465E/+}-Mutante überprüft, ob deren Blockade die Tumorgenese im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumorexpressionsmodell unterbricht. Analog soll die PIF-Domäne in einem weiteren murinen Modell mittels *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante selektiv blockiert werden, um die Auswirkung im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Modell zu beobachten.

2. Material

2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1 Puffer und Lösungen

| Puffer und Lösungen | Zusammensetzung |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Western Blot Trenngelpuffer (pH 8,8) | 1,5M TRIS/HCL mit ddH ² O auffüllen |
| Western Blot Sammelgelpuffer (pH 6,8) | 0,5M TRIS/HCL mit ddH ² O auffüllen |
| Western Blot Laufpuffer (10fach) | 35mM SDS 0,25M TRIS/HCL 2M Glyzin mit ddH ² O auffüllen |
| Western Blot Transferpuffer/ Wetblotpuffer | 19mM TRIS/HCl 192mM Glycin 0.1% SDS 20% Methanol |
| PBS (10fach, pH 7,4) | 20mM Na ₂ HPO ₄ 50mM NaCl |
| Laemmli-Probenpuffer (5fach, pH 6,8) | 10% SDS 50% (v/v) Glyzerin 228mM TRIS/HCl 0,75mM Bromphenolblau Na-Salz 5% (w/v) 2-Mercaptoethanol |
| IP-Puffer (pH 7,9) | 50mM HEPES (pH 7,9) 150mM NaCl 1mM EDTA (pH 8) 0,5% (v/v) NP-40 10% (v/v) Glyzerin 1% Phosphataseinhibitor (kurz vor Verwendung hinzugeben) 1% Proteaseinhibitor (kurz vor Verwendung hinzugeben) |
| Alcianblau (pH 2,5) | 1% Alcianblau 3% Essigsäure |
| Kernechtrotlösung | 0.1% Kernechtrot 2.5% Aluminiumsulfat |

Material

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Soriano-Puffer | 48,75µl Lösung Soriano-Puffer Stammlösung 0,25µl 1M DTT 1µL Proteinase K |
| Soriano-Puffer Stammlösung | 10% 10fach GB 0,5% (w/v) Triton X-100 1% 2-Mercaptoethanol |
| RLT-Puffer | 1000µl RLT-Pufferlösung 10µl 2-Mercaptoethanol |
| Ladepuffer Orange G (6fach) | 60% Glycerin 60mM EDTA 0.24% Orange G 0.12% SDS |
| TAE-Puffer (50fach, pH 8,5) | 2M TRIS 100mM EDTA 5.71% (v/v) Essigsäure (100%) |
| Gitschiers-Puffer (10fach) | 670mM TRIS pH 8.8 166mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 67mM MgCl ₂ |
| SucRot Premix | 60mg Kresolrot 400µl 1M TRIS pH 9.0 12g Sucrose ad 40ml ddH ₂ O |
| Premix | 4,35µl ddH ₂ O 2,5µl 10x PCR Puffer S 2,5µl Sucrose 30%ig 2,5µl SucRot Premix 0,15µl peqGOLD Taq DNA Polymerase 0,5µl dNTP (10µM) |

2.2 Histologie

Tabelle 2.2 Histologie

| Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------|--------------------------------------|
| Essigsäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| Alcianblau 8GX | Merck KGaA, Darmstadt |
| Aluminiumsulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

Material

| | |
|------------------------------|------------------------------------------|
| Antigen unmasking solution | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Avidin / Biotin Blocking Kit | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Certistain® Kernechtrot | Merck KGaA, Darmstadt |
| DAB peroxidase substrate kit | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Eosin | Waldeck GmbH & Co KG, Münster |
| Hämatoxylin | Merck KGaA, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid 30% | Merck KGaA, Darmstadt |
| Pertex mounting medium | Medite GmbH, Burgdorf |
| Roti® Histofix 4% | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Roti® Histol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Vectastain® elite ABC kit | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |

2.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2.3 Reagenzien und Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 2-log DNA Leiter | New England Biolabs, Frankfurt |
| 2-Mercaptoethanol, 98% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| ATE Puffer | Qiagen GmbH, Hilden |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Bradford Reagenz | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Bromphenol blau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| dNTP mix, 10mM | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |

Material

| | |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung | Biochrom GmbH, Berlin |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethanol, 100% | Merck KGaA, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Forene® Isofluran | Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen |
| Ladepuffer Blue | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| Gelatine | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| GeneRuler™ 100bp DNA ladder | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Glucose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Glyzerin (Propan-1,2,3-triol) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Glycin Pufferan® | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Hot Start Taq DNA Polymerase | Qiagen GmbH, Hilden |
| Hot Start Taq 2x Mastermix (#M04965) | BioLabs® New England |
| Kresolrot | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Salzsäure / Chlorwasserstoff (HCl) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Methanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natronlauge / Natriumhydroxid (NaOH) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Nonidet NP-40 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Odyssey Block-Reagenz | LI-COR Corp. Offices, Lincoln, NE, USA |
| Orange G | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |

Material

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Phosphataseinhibitor Mix I | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Proteinase K | Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen |
| RLT Pufferlösung | Qiagen GmbH, Hilden |
| Rotiphorese® gel 30 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Sucrose | Merck KGaA, Darmstadt |
| TE-Puffer, pH 8.0 | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| TEMED | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Triton® X-100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Tween® 20 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

2.4 Antikörper

Tabelle 2.4 Antikörper

| Bezeichnung | Hersteller |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Biotinylated Anti-rabbit | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Biotinylated Anti-rat | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA |
| Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight® 680 Conjugate) #5470 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Anti-mouse IgG (H+L) (DyLight® 800 Conjugate) #5257 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight® 680 Conjugate) #5366 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Anti-rabbit IgG (H+L) (DyLight® 800 Conjugate) #5151 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| pan-AKT (C67E7), #4691 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-AKT (Ser473), #4060 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-AKT (Thr308), #2965 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |

Material

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Phospho-GSK-3 β (Ser9), #9336 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| GSK-3 β (27C10), #9315 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-SGK (Ser78), #3271 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| SGK, #3272 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-PKC (pan), #9371 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-p90RSK (Thr359/Ser363), #9344 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-p90RSK (Thr573), #9346 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| RSK1/RSK2/RSK3 (32D7), #9355 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| Phospho-RSK2 (Ser277), #3556 | Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, USA |
| α -Tubulin, # T9026 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| β -Actin, # A5316 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

2.5 Primer

All Primer wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) hergestellt und in H₂O in einer Konzentration von 10 μ M gelöst.

Tabelle 2.5 Primer

| Bezeichnung | Primersequenz |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Genotypisierung Ptf1a-Cre | |
| 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 LSL-KrasG12D | |
| Kras-WT_UP1 | 5'-CACCAGCTTCGGCTTCCTATT-3' |
| Kras-URP_LP1 | 5'-AGCTAATGGCTCTCAAAGGAATGTA-3' |
| KrasG12Dmut_UP | 5'-CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC-3' |

Material

| | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Genotypisierung PDK1lox | |
| PDK1_UP | 5'-ATCCCAAGTTACTGAGTTGTGTTGGAAG-3' |
| PDK1_LP | 5'-TGTGGACAAACAGCAATGAACATACACGC-3' |
| Genotypisierung K465E | |
| PDK_K465E_For | 5'-GGGTGAAGCATGGAATCTGTGTCTT-3' |
| PDK_K465E_Rev | 5'-GCCAGGATACCTAAGAGTACCTAGAA-3' |
| Genotypisierung L155E | |
| Pdk_L155E_P1 | 5'-GGAACCTACTCTGTAGACCAGGCTG-3' |
| Pdk_L155E_P2 | 5'-GACGTGTCCTAATACTACCACAAGTGGC-3' |
| Rekombination Pdk | |
| Pdk1floxvek-UP1 | 5'-TCATAACTAGTGTTCGATCGACCT-3' |
| Pdk1-nonrec-UP1 | 5'-CAGCACATGGTTGAGGCTC-3' |
| Pdk1-eco5-LP | 5'-CCAGCAGACATAAAGCTGATATC-3' |
| Rekombination L155E | |
| Pdk1-155i2E5 | 5'-CACACTCCAGAGATCCGATATCA-3' |
| Pdk1MGex4+5 | 5'-GCATAACTAAGGCCAAAATACAGCTT-3' |
| Pdk1ex4muti4-LP | 5'-CATTGACCATGCAAAGGATACACTC-3' |

2.6 Kits

Tabelle 2.6 Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------|---------------------|
| QIAamp DNA Mini Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAamp DNA Micro Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen GmbH, Hilden |

2.7 Technische Geräte

Tabelle 2.7 Technische Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Mikrotom Microm HM355S | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| beheizte Paraffinausgießstation (Modell EG1150 H) | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar |

Material

| | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Gewebeinfiltrationsautomat (Modell ASP300) | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar |
| AxioCam MRc | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Mikroskop Axio Imager.A1 | Carl Zeiss AG, Oberkochen |
| Western blot system SE 260 Mighty Small II | Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA |
| Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Odyssey® infrared imaging system | LI-COR Bioscience Corporate, Lincoln, NE, USA |
| Mikroskop DME | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar |
| Zentrifuge 5415R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Thermomixer kompakt | Eppendorf AG, Hamburg |
| Thermozykler TPersonal | Biometra GmbH, Göttingen |
| Thermozykler TGradient | Biometra GmbH, Göttingen |
| Vortexmischer Vortex Genius 3 | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Agarose-Gelelektrophorese-System Compact L/XL | Biometra GmbH, Göttingen |
| Pipetten Research | Eppendorf AG, Hamburg |
| Homogenisator Silent Crusher M with tool 6F | Heidolph Instruments GmbH, Schwabach |
| Mikrowelle | Siemens, München |
| Geldokumentationssystem UVsolo TS | Biometra GmbH, Göttingen |
| Folienschweißgerät Folio (FS 3602) | Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern |
| Netzgerät für Elektrophorese Modell EV243 | Consort bvba, Turnhout, Belgien |
| Pipettierhilfe Stripettor Plus | Corning, Inc., Corning, NY, USA |
| Mikroskop Axiovert 200M | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| PALM MicroBeam | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| PALM RoboSoftware Version 1.2-1101 (DE) | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.8 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Combitips BioPur® | Eppendorf AG, Hamburg |
| Menzel-Gläser | Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Cryotubes™ | Nunc™ Brand Products, Naperville, IL, USA |
| Küvetten | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Einmal-Skalpelle | Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan |
| Glasobjektträger Superfrost® Plus | Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| MicroAmp® optical 96-well reaction plate | Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA |
| Mikrotomklingen S35 | Feather Safety Razor CO, LTD., Osaka, Japan |
| PCR-Reaktionsgefäße | Eppendorf AG, Hamburg |
| Petrischalen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße, 0.5 ml, 1.5 ml and 2 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Safe seal pipette tips, professional | Biozym Scientific GmbH, Oldenburg |
| Safe-lock Reaktionsgefäße BioPur® | Eppendorf AG, Hamburg |
| Serologische Pipetten | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Einwegnadeln Sterican® 27-Gauge | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Einwegspritzen Omnifix®-F | B.Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Gewebe-Einbettkassetten | MediteGmbH, Burgdorf |
| Immobilon-P (PVDF) Membran | Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus |
| Whatman-Paper | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| AdhesiveCap 200 opaque | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen |
| MembraneSlide 1.0 PEN (Polyethylenaphthalat membrane slides) | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen |
| Zentrifugenröhrchen | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

3. Methodik

3.1 Mauslinien

Die nachfolgend beschriebenen Mauslinien wurden miteinander verkreuzt, um ein genetisch definiertes endogenes Pankreaskarzinommodell zu generieren. Teilweise wurde in den Mausmodellen das konditionelle Cre/loxP-System genutzt. Mäuse, die ein durch eine loxP-Stopp-loxP-Kassette (LSL) inaktiviertes Transgen besitzen, können mit einer Mauslinie, die eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors besitzt, gekreuzt werden. Dadurch kommt es zu einer konditionellen Deletion der LSL-Kassette und somit auch zu einer gewebespezifischen Expression des Zielgens. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

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

Bei *Ptf1a* handelt es sich um eine Untereinheit des pankreatischen Transkriptionsfaktors Ptf, der eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des endokrinen und exokrinen Pankreas in der Maus spielt. Bei dieser Knock-in Mauslinie ist eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Ptf1a*-Promotors gestellt. Dadurch kann die Cre-Rekombinase spezifisch in pankreatischen Vorläuferzellen exprimiert werden.

3.1.2 *LSL-Kras*^{G12D/+} (Hingorani et al., 2003; Jackson et al., 2001)

Diese Knock-in Mauslinie besitzt eine G12D Punktmutation, die der Mutation in menschlichen Tumoren entspricht. Nach einer durch die Cre-Rekombinase hervorgerufenen Deletion der loxP-flankierten Stoppkassette wird onkogenes *Kras* exprimiert und führt zu einer konstitutiven Aktivierung der KRAS-abhängigen Signalkaskaden.

3.1.3 *Pdk1*^{f/+} (Lawlor et al., 2002)

In dieser Mauslinie sind Exon 3 und Exon 4 von loxP-Stellen flankiert. Eine Deletion dieser Exons durch die Cre-Rekombinase hebt die Expression des Pdk1-Proteins auf.

3.1.4 *Pdk1*^{K465E/+} (Bayascas et al., 2008)

Bei dieser Mauslinie ist im Exon 12 des *Pdk1*-Gens eine Punktmutation von Lysin 465 zu Glutaminsäure vorhanden. Diese Mutation führt zu einer Konformitätsänderung in der PH-Domäne des *Pdk1*-Gens und bewirkt dadurch eine Inhibition der Bindung von PDK1 zu PIP3. *Pdk1* wird jedoch normal exprimiert.

3.1.5 *Pdk1*^{L155E/+} (Bayascas et al., 2006)

Diese Knock-in Mauslinie besitzt eine Punktmutation von Leucin 155 zu Glutaminsäure in Exon 4 des *Pdk1*-Gens. Vor dem Exon 4 befindet sich ein Minigen, das sich aus den Exons 3 – 14 ohne die Mutation zusammensetzt. Das Minigen ist von loxP-Stellen flankiert und endet mit einem Stopp-Kodon. Eine Gendeletion des Minigens durch die Cre-Rekombinase führt zu einer Expression der Mutante und damit zu einer Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges. Dabei bleibt *Pdk1* jedoch normal exprimiert.

3.2 Sektion von Mäusen

Ziele der Sektion waren zum einen die morphologische Untersuchung der gesamten Maus und speziell des Pankreasgewebes, sowie zum anderen der Erhalt von RNS-, DNS- und Proteinproben für anschließende Analysen auf RNS-, DNS- oder Proteinebene.

3.2.1 BrdU Injektion

Die Injektion von BrdU (Bromdesoxyuridin) wurde zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen in vitalem Gewebe verwendet. Die Injektion von 50 mg/kg BrdU erfolgte intraperitoneal 2 – 4 Stunden vor der Sektion.

3.2.2 Sektion

Vor der Sektion wurde der Maus 150µl Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF) intraperitoneal injiziert und für eine ausreichende Narkose circa 15 Minuten gewartet. Zur Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe testete man die Reaktion des Tieres auf einen in die Pfote gesetzten kräftigen Schmerzreiz, die Maus durfte dabei keinerlei Reaktionen mehr zeigen. Nach der Bestimmung des Körpergewichts und der Reinigung des Bauchfells mit 80% Ethanol fand die Sektion unter sterilen Bedingungen statt. Zuerst wurde die Bauchhaut eingeschnitten und das Fell zu beiden Seiten abgezogen. Nun erfolgten mit neuem Sezierbesteck die Eröffnung des Peritoneums und eine Präparierung der inneren Organe. Diese wurden mit besonderem Augenmerk auf das Pankreas makroskopisch begutachtet. Für die RNS-Probe schnitt man daraufhin ein Stück des Pankreas ab, homogenisierte es in RLT-Puffer + beta-Mercaptoethanol und froor es in flüssigem Stickstoff ein. Eine weitere Lagerung fand bei -80°C statt. Im Anschluss wurden Pankreasproben für Protein- und DNS-Proben entnommen und diese auch in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteinprobe wurde zuvor in IP-Puffer mit Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren homogenisiert. Danach entnahm man Pankreas, Milz, Leber, Magen, Duodenum, Herz und

Lunge, wog das Pankreas und legte die Organe in PBS. Abschließend war für die Nachgenotypisierung der Maus die Biopsie eines kleinen Stückes vom Schwanz notwendig.

3.3 Histologische Analyse

3.3.1 Gewebefixation und Schneiden der Paraffinblöcke

Die in PBS entnommenen Organe wurden für 24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C in PFA fixiert, danach in dem Paraffingewebeinfiltrationsautomat ASP300 für 16 Stunden in Roti® Histofix fixiert und entwässert. Daraufhin wurden die Organe in Paraffin gegossen und ausgehärtet.

Aus den bei -20°C gekühlten Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom Modell Microm HM355S pro Block drei Serien geschnitten. Eine Serie bestand dabei aus sechsmal 2,5µm dicken Schnitten.

3.3.2 Mikrodissektion

Von dem bei -20°C gefrorenen Paraffinblock wurden mit dem Mikrotom Modell Microm HM355S 8µm dicke serielle Schnitte erstellt und die für die Mikrodissektion in Frage kommende Gewebestelle isoliert auf die Polyethylenaphthalat-Membran der Objektträger (MembraneSlide 1.0 PEN) platziert, sodass die gleiche Gewebestelle der nachfolgenden seriellen Schnitte auf dieselbe Membran passte. So sollte sichergestellt werden, dass ausreichend Gewebe mit derselben PanIN vorhanden war. Darauf trockneten die Membranen über Nacht bei 37°C und wurden am nächsten Tag mit Roti® Histol zweimal für jeweils 15 Minuten entparaffiniert. Darauf folgte eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe und einmaliges Waschen in destilliertem Wasser für 1 Minute. Gefärbt wurde mit Hämatoxylin für 2,5 Minuten, darauf folgte das Bläuen mit Leitungswasser. Zur anschließenden Differenzierung und Dehydrierung, siehe Kapitel 3.4.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung. Die gefärbten Membranen trockneten bei 37°C, da dadurch der Laser effektiver schneiden konnte. Das Softwareprogramm PALM ROBO bediente den Laser und markierte die auszuschneidende Stelle, die zuvor mit dem Mikroskop Axiovert 200M in 40facher Vergrößerung ausgewählt worden war. Der Laser mikrodissezierte mit einer Intensität von 50-75 und einem Fokus von 45.

3.3.3 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Zuerst wurden die Paraffinschnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in Roti® Histol entparaffiniert. Daraufhin erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe für jeweils 2,5 Minuten

zweimal in 99%, zweimal in 96% und zweimal in 80%. Anschließend wusch man die Schnitte für 1 Minute in destilliertem Wasser, um diese daraufhin in Hämatoxylin für 15 Sekunden zu färben. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Eosin Färbung, die auf das Bläuen folgte, dauerte 20 Sekunden und zog viermaliges Waschen in destilliertem Wasser für jeweils 1 Minute nach sich. Die Differenzierung in 80%igem Alkohol und die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (zweimal in 90% und zweimal in 96%) wurde für jeweils 30 Sekunden durchgeführt. Abschließend klärte man die Schnitte in Roti® Histol zweimal für jeweils 5 Minuten und bettete diese dann in Pertex® Eindeckmedium ein.

3.3.4 Alcianblaufärbung

Die Entparaffinierung und Rehydrierung entsprach den ersten Schritten der Hämatoxylin und Eosin Färbung (siehe 3.4.1). Daraufhin wurden die Schnitte in destilliertem Wasser für 1 Minute gewaschen, in Alcianblaulösung für 5 Minuten gefärbt und dann mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte mit 0,1%iger Kernechtrotlösung die Gegenfärbung für 5 Minuten sowie das Ausspülen der Schnitte in destilliertem Wasser. Die Differenzierung, Dehydrierung und Klärung in Roti® Histol entsprach wiederum der oben beschriebenen Hämatoxylin und Eosin Färbung. Abschließend wurden die Schnitte in Pertex® Eindeckmedium eingebettet.

3.3.5 Immunhistochemie

Die Paraffingewebeschnitte wurden, wie bei der Hämatoxylin und Eosin Färbung bereits beschrieben (siehe 3.4.1), entparaffiniert und rehydriert. Anschließend erfolgte bei der immunhistochemischen Färbung die Antigendemaskierung in Unmasking Solution, dabei wurde die Lösung zum Kochen gebracht und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten folgte der Demaskierung. Danach blockte man die endogene Peroxidase bei vollkommener Dunkelheit in 3% H₂O₂ für 20 Minuten. Als nächstes wurden die Schnitte in 5% Serum und Avidin für eine Stunde geblockt und im Anschluss dreimal in PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der erste Antikörper inkubierte über Nacht bei 4°C in 5% Serum, 1% BSA und Biotin. Diesem folgte dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten um dann die Schnitte mit dem zweiten Antikörper, 1:500 verdünnt, in 5% Serum und 1% BSA für 1 Stunde zu inkubieren. Das Blocken und die Inkubation erfolgten jeweils in PBS. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten folgten die Inkubation mit Vectastain® elite ABC Kit bei 4°C für 30 Minuten und wiederum dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten. Die Detektion erfolgte bei Raumtemperatur mittels Inkubation in DAB-Lösung für 1 bis 3 Minuten. Danach wurden die Schnitte dreimal in

H₂O gespült und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Abschließende Schritte waren die für die H&E Färbung bereits beschriebene Differenzierung, Dehydrierung, Klärung und Eindeckelung.

3.3.6 Auszählung von PanIN Läsionen

Ausgezählt wurden entsprechend histologischer Kriterien ADM, PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 und PanIN3 (Hruban et al., 2001). Pro Tier wurden jeweils drei H&E gefärbte Schnitte betrachtet, die Auszählung erfolgte bezüglich des Genotyps des Präparates verblindet. Ausgezählt wurden mit einem Leica Mikroskop in 20-facher Vergrößerung alle Gesichtsfelder eines jeden Schnittes und die darin enthaltenen Läsionen. Der Quotient aus Läsionen pro Gesichtsfeld ermöglichte die Quantifizierung und Vergleichbarkeit. Die Auszählung erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben von Aichler et al. (Aichler et al., 2012).

3.4 DNS-Analyse

3.4.1 DNS-Isolierung

2-3mm Schwanzspitzen-Biopsie wurden mit jeweils 49µl Soriano-Lysepuffer und 1µl Proteinase K versetzt und anschließend für 1 Stunde und 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K 15 Minuten lang bei 95°C. Anschließend wurden die Proben gevortext und bei 14000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthielt die DNS für die nachfolgende PCR-Analyse.

3.4.2 Isolation von DNS aus Gewebe

Die DNS-Isolation aus Gewebe für die Etablierung der Rekombinations-PCR erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit nach Herstellerangaben. Die Konzentration wurde mittels Spektrometrie im Nano Drop 1000 gemessen.

3.4.3 Isolation von DNS aus mikrodissezierten Proben

Die Isolation von DNS aus einer mikrodissezierten Probe für die Rekombinations-Analyse erfolgte mit dem QIAamp DNA Micro Kit nach standardisiertem Verfahren und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Für die standardmäßige Polymerase-Kettenreaktion wurde folgende Zusammensetzung und nachstehende PCR-Kondition genutzt:

Tabelle 3.9 Reaktionsmix

| Menge | Name |
|-------------|------------------------|
| 12,5µl | Premix |
| 0,25 - 1µl | Vorwärtsprimer (10µM) |
| 0,25 - 1µl | Rückwärtsprimer (10µM) |
| 1,0 - 1,5µl | DNS |
| ad 25µl | H ₂ O |

Tabelle 3.10 PCR-Kondition

| Temperatur | Zeit | Wiederholungen |
|-------------|-------------|----------------|
| 95°C | 5 Minuten | |
| 95°C | 45 Sekunden | |
| 55°C - 63°C | 1 Minute | 40x |
| 72°C | 1,5 Minuten | |

3.4.4.1 Genotypisierung und Nachgenotypisierung

Um den Genotyp zu bestimmen wurde aus dem Mausschwanz isolierte DNS genutzt. Die PCR erfolgte wie in 3.5.4 bereits beschreiben. Für jedes Allel sind spezifische Primer vorhanden. Die Temperatur der Primerhybridisierung und die Größe der Amplifikate sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3.11 Primerhybridisierung und Bandengrößen der Genotypisierungs-PCR
mut=mutiertes Allel, WT=Wildtyp-Allel

| Allel | Temperatur | Bandengrößen |
|---------------------------------|------------|----------------------|
| <i>Ptf1a</i> ^{Cre} | 60°C | 400 (mut) / 600 (WT) |
| <i>LSL-Kras</i> ^{G12D} | 55°C | 170 (mut) / 270 (WT) |
| <i>Pdk1</i> ^{f/+} | 63°C | 280 (mut) / 200 (WT) |
| <i>Pdk1</i> ^{K465E/+} | 63°C | 236 (mut) / 196 (WT) |
| <i>Pdk1</i> ^{L155E/+} | 63°C | 212 (mut) / 171 (WT) |

3.4.4.2 Rekombinations-PCR

Für die Rekombinations-PCR wurde pro Ansatz 5µl mikrodissizierte DNS beziehungsweise bei den Kontrollen eine Endkonzentration von 5ng/5µl angesetzt. Die Verdünnung der DNS fand in ATE Puffer statt und es wurde der Hot Start Taq Mastermix genutzt, sodass sich folgendes Pipettierschema ergab:

Tabelle 3.12 Reaktionsmix Rekombinations-PCR

| Name | Menge |
|-------------------------|-------------|
| Mastermix Hot Start Taq | 25µl |
| Vorwärtsprimer | 0,8µl |
| Rückwärtsprimer | 0,8µl |
| Aqua dest. + DNS | 18,4µl |
| DNS | 5µl |
| <i>Summe</i> | <i>50µl</i> |

Die Rekombinations-PCR erfolgte unter folgenden Konditionen:

Tabelle 3.5 Konditionen Rekombinations-PCR

| Temperatur | Zeit | Wiederholungen |
|------------|-------------|----------------|
| 95°C | 2 Minuten | |
| 95°C | 30 Sekunden | |
| 68°C | 2 Minuten | |
| 95°C | 30 Sekunden | |
| 67°C | 30 Sekunden | |
| 68°C | 2 Minuten | |
| 95°C | 30 Sekunden | |
| 66°C | 30 Sekunden | 2x |
| 68°C | 2 Minuten | |
| 95°C | 30 Sekunden | |
| 65°C | 30 Sekunden | 2x |
| 68°C | 2 Minuten | |
| 95°C | 30 Sekunden | |
| 64°C | 30 Sekunden | 65x |
| 68°C | 2 Minuten | |
| 68°C | 5 Minuten | |
| 22°C | Pause | |

Für die verschiedenen Nachweise wurden folgende Primer eingesetzt:

Tabelle 3.6 Primer und Bandengrößen Rekombinations-PCR

| Name der PCR | Primerpaar | PCR-Produkt | Temperatur |
|------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------|
| Pdk1 ^{L155E-rek} | pdk1-155i2E5 + pdk1ex4muti4-LP | 1077BP | 64°C |
| Pdk1 ^{L155E-nonrek} | pdk1-155i2E5 + pdk1MGex4+5 | 811BP | 64°C |
| Pdk1 ^{f-rek} | pdk1floxvek-UP1 + pdk1-eco5-LP | 125BP | 64°C |
| Pdk1 ^{f-nonrek} | pdk1floxvek-UP1 + pdk1-eco5-LP | 1918BP (uspez.) | 64°C |
| Pdk1 ^{f-nonrek} | pdk1-nonrec-UP1 + pdk1-eco5-LP | 416BP | 64°C |
| Gabra | Gabra1-UP + Gabra1-LP | 290BP | 58°C |

3.4.5 Gelelektrophorese bei PCR

Das Agarosegel und der Laufpuffer wurden mit TAE-Puffer hergestellt. Für die Gelelektrophorese nutze man ein 1,5%iges Agarosegel mit 24µl Ethidiumbromid. Der Laufpuffer wurde mit 150µl Ethidiumbromid versetzt. Für die Analyse der Genotypisierungs-PCR trug man 12,5µl des PCR Produktes und 18µl des GeneRuler als Marker auf. Für die Analyse der Rekombinations-PCR wurden auf das Gel 15µl PCR-Produkt (Amplifikat) + 5µl Ladepuffer Orange G (OL) sowie als Marker 18µl des 2-Log DNA Ladder mit Ladepuffer Blue sechsfach aufgetragen. Das Gel lief bei 120V für 1 bis 2 Stunden, bis sich die Banden ausreichend getrennt hatten. Die Detektion der Banden erfolgte mittels UV Transillumination durch das Geldokumentationssystem UVsolo TS.

3.4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten für eine anschließende Sequenzierung wurde das QIAquick® PCR Purification Kit genutzt.

3.5 Protein-Analyse

3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolgte durch die Methode nach Bradford. In eine Mikrotiterplatte wurde pro Well 300µl des 1:5 in destilliertem Wasser verdünnten Bradford Reagenz gegeben. Als Referenz diente Rinderalbumin (BSA) in einer Standardreihe von 0,5µg/µl – 8,0µg/µl. Es wurde je 1µl Probe in Triplikaten zu den vorgelegten 300µl dazu gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die 96-Well Platte in das Mikroplatten-Absorptionsphotometer Anthos 2001 gestellt und die Farbreaktion bei einer

Wellenlänge von 595nm gemessen. Unter Zuhilfenahme der als Referenz dienenden Standardreihe konnten die gemessenen Absorptionswerte in die Proteinkonzentration umgerechnet werden. Alle Proben wurden daraufhin mit IP-Puffer auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt. Anschließend wurden die Proben in 5x Lämmli aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.2 Western-Blot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Das Trenngel und das Sammelgel wurden nach untenstehendem Protokoll hergestellt. Das Trenngel wurde in eine vertikale Gelkammer gegossen, Isopropanol zur Begradigung dazu gegeben und mindestens 15 Minuten bis zur Polymerisation gewartet. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel bis zum Rand mit Sammelgel überschichtet, in das der Probenkamm gesteckt wurde. Für die Auftrennung der Proteine wurden die Proben in der Gellaufkammer in 1% Laufpuffer zuerst bei 80V gesammelt und dann für mindestens 2 Stunden bei 120V aufgetrennt. Als Marker diente der PageRuler™. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 120µg.

Tabelle 3.13 Sammelgel

| Menge | Name |
|--------|--------------------|
| 1500µl | ddH ₂ O |
| 650µl | Sammelgelpuffer |
| 375µl | 30% Acrylamid |
| 25µl | 10% SDS |
| 12,5µl | 10% APS |
| 5µl | TEMED |

Tabelle 3.14 Trenngel 12%

| Menge | Name |
|--------|--------------------|
| 1700µl | ddH ₂ O |
| 1300µl | Trenngelpuffer |
| 2000µl | 30% Acrylamid |
| 50µl | 10% SDS |
| 25µl | 10% APS |
| 7,5µl | TEMED |

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe einer WET-Blotapparatur auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Das Blotting erfolgte für 2 Stunden auf Eis bei 400mA (200V) beziehungsweise für 16h bei 90mA bei 4°C. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 Minute in PBS-Tween gewaschen sowie für 1 Stunde in 5% Milchpulver in PBS-Tween (Blockingpuffer) zur Vermeidung unspezifischer Bindungsstellen geblockt. Auf das Blocken folgte dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in PBS-Tween. Anschließend wurde der in Blockingpuffer verdünnte Antikörper auf die Membran aufgetragen und inkubiert 1-2 Tage bei 4°C unter leichtem Schwenken. Danach wurde die Membran dreimal jeweils 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor die Membran dreimal jeweils 5 Minuten in PBS-Tween lichtgeschützt gewaschen wurde. Daraufhin wurde die Membran mittels Odyssey Infrared Imaging System gescannt und die Intensität der Fluoreszenz bei den Wellenlängen 700nm und 800nm detektiert.

3.6 Statistische Datenanalyse

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse, die Korrelation der Daten sowie die statistische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism5 Software (La Jolla, USA) verwendet. Überlebenszeitanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier Kurven. Um die statistische Signifikanz nachzuweisen, wurde der Zweistichproben-t-Test und der Logrank-Test verwendet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der PDK1-abhängigen Signalwege im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und anderen Karzinomen wie dem großzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) oder dem Kolonkarzinom spielt die Mutation von *Kras* eine entscheidende Rolle. Onkogenes KRAS initiiert dabei die Karzinogenese über verschiedene Signalkaskaden, einschließlich des PI3K/AKT-Signalweges und ist maßgeblich an Proliferation und Erhaltung des Tumors beteiligt. Da bisher noch keine effektive anti-RAS Therapie für die Klinik erforscht wurde, ist es wesentlich, die Rolle der KRAS-abhängigen Signalwege in der Karzinogenese genauer zu untersuchen. Bisher konnte im murinen Modell gezeigt werden, dass die Ausschaltung des PI3K/AKT-Signalweges durch eine pankreasspezifische Inaktivierung von PDK1 trotz Expression von onkogenem *Kras* zu einer vollständigen Blockade der Tumovorläuferläsionen und der Tumorgenese im Pankreas selbst führte (Eser et al., 2013). In dieser Arbeit wurden anhand von zwei verschiedenen Mausmodellen, dem *Pdk1*^{K465E/+}- und dem *Pdk1*^{L155E/+}-Mausmodell, die beiden regulatorischen Untereinheiten von PDK1, PH-Domäne und PIF-Domäne einzeln blockiert und auf eine mögliche Bedeutung in der Karzinogenese des PDAC hin analysiert.

4.2 Analyse des PH-abhängigen Signalweges von PDK1 im *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Mausmodell

Um zu analysieren, ob die Ausschaltung des PH-abhängigen Signalweges von PDK1 die durch KRAS induzierte Entstehung des duktalem Adenokarzinoms im Pankreas verhindert, wurde die *Pdk1*^{K465E/+}-Mauslinie mit dem endogenen *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Pankreaskarzinommodell verkreuzt (Hingorani et al., 2003). Zusätzlich wurde mit dem Ziel, das andere Allel des *Pdk1*-Gens vollständig zu inaktivieren, die etablierte *Pdk1*^{f/+}-Mauslinie dazu gekreuzt (Lawlor et al., 2002) (Abbildung 4.1A). Sowohl männliche als auch weibliche *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E} Mäuse erwiesen sich als lebens- und fortpflanzungsfähig. Eine Überprüfung des Genotyps fand mittels spezifischer Genotypisierung-PCR statt (Abbildung 4.1B) und die *Ptf1a*^{Cre/+}-abhängige Inaktivierung von PDK1 im Pankreas konnte mittels PCR überprüft werden (Abbildung 4.1C).

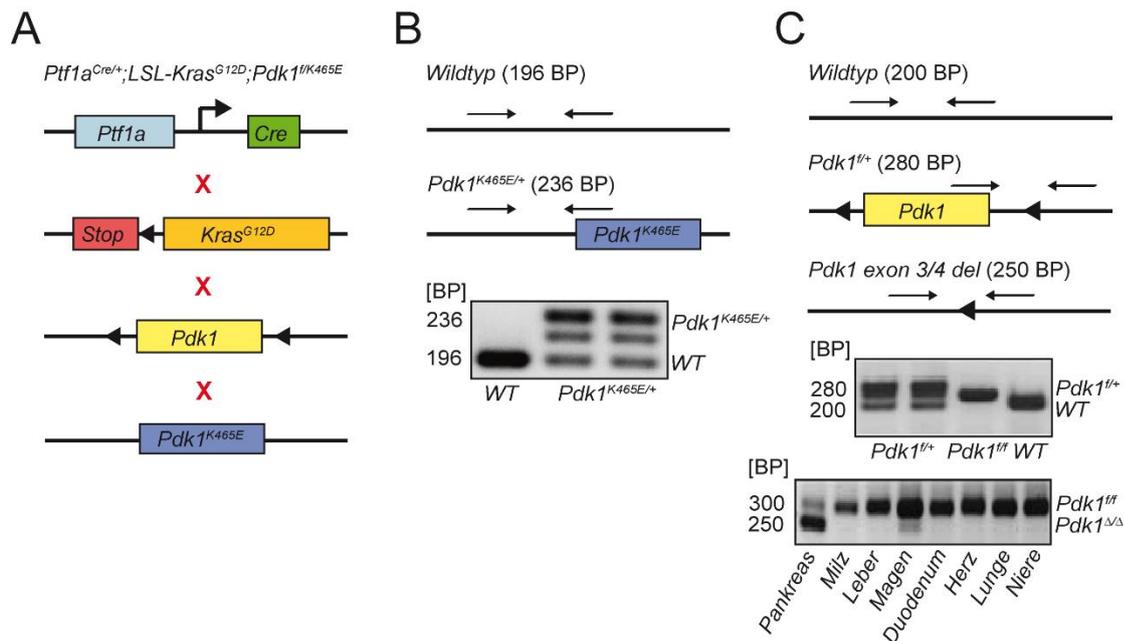


Abbildung 4.1: Aufbau und Nachweis der *Pdk1^{fl/K465E}*-Mauslinie

A) Genetischer Aufbau mit dem Ziel den PIF-unabhängigen Signalweg des *Pdk1*-Gens zu inaktivieren.

B) Genotypisierungsschema der *Pdk1^{K465E/+}*-Mutante (oben). PCR-Analyse der DNS von der Schwanzspitze für Wildtyp (WT) mit 196 Basenpaaren und *Pdk1^{K465E/+}* mit 236 Basenpaaren Größe (unten).

C) Genotypisierungsschema der *Pdk1^{fl/+}*-Mutante (oben). PCR-Analyse der DNS von der Schwanzspitze für Wildtyp (WT) mit 200 Basenpaaren und *Pdk1^{fl/+}* mit 280 Basenpaaren Größe (mittig). PCR-Analyse der DNS von indizierten Organen mit Nachweis *Ptf1a^{Cre/+}*-vermittelter pankreasspezifischer Deletion von Exon 3 und 4 von *Pdk1* (*Pdk1^{ΔΔ}*) in *Ptf1a^{Cre/+}*;*Pdk1^{fl}*-Mäusen (unten).

4.2.1 Die Inhibierung der PH-Domäne verhindert die Karzinogenese des PDAC in den ersten 12 Monaten trotz Expression von onkogenem *Kras*

In vorausgehenden Experimenten von Bayascas et al. mit der generellen Knock-in Mutation *Pdk1^{K465E/+}* wurde gezeigt, dass *Pdk1^{K465E/K465E}*-Mäuse von Geburt an circa 35% weniger als ihre *Pdk1^{+/+}*-Geschwister wogen (Bayascas et al., 2008). Zur Analyse des Körpergewichtes der *Ptf1a^{Cre/+}*;*LSL-Kras^{G12D/+}*;*Pdk1^{fl/K465E}*-Mäuse wurden Tiere zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate gewogen und mit gleichaltrigen Wildtyptieren verglichen. Es zeigte sich, dass zu den ausgewählten Zeitpunkten das Körpergewicht der *Ptf1a^{Cre/+}*;*LSL-Kras^{G12D/+}*;*Pdk1^{fl/K465E}*-Mäuse nicht signifikant von demjenigen der Wildtypmäuse abwich, sodass von einem normalen Wachstum ausgegangen werden konnte (Abbildung 4.2A). Die Zunahme des Pankreasgewichtes kann Hinweise auf einen Tumor geben, sodass das Pankreasgewicht der *Ptf1a^{Cre/+}*;*LSL-Kras^{G12D/+}*;*Pdk1^{fl/K465E}*-Mäuse bestimmt und im Alter von 6 Monaten mit demjenigen der Wildtyp- und *Ptf1a^{Cre/+}*;*LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere verglichen wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Pankreasgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. In der Analyse glich der prozentuale Anteil der *Ptf1a^{Cre/+}*;*LSL-Kras^{G12D/+}*;*Pdk1^{fl/K465E}*-Mäuse dem Anteil der Wildtyptiere, es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Das Pankreasgewicht nahm jeweils circa 1% des Körpergewichtes ein. Im Gegensatz dazu wiesen

Ergebnisse

die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere ein doppelt so hohes Pankreasgewicht auf. Der Unterschied zwischen den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen und den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren war signifikant (Abbildung 4.2B). Eine makroskopische Untersuchung des Pankreas und der angrenzenden Organe mit der Frage nach Anzeichen auf ein PDAC zeigte bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate ein morphologisch unauffälliges Pankreas. Es zeigten sich keinerlei knotige oder zystische Veränderungen im Pankreas, keine makroskopischen Hinweise auf Metastasen in Lymphknoten, Lunge oder Leber sowie kein (blutiger) Aszites als Anzeichen einer möglichen Peritonealkarzinose. Die Pankreata der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse wiesen hingegen makroskopisch knotige Veränderungen auf (Abbildung 4.2C).

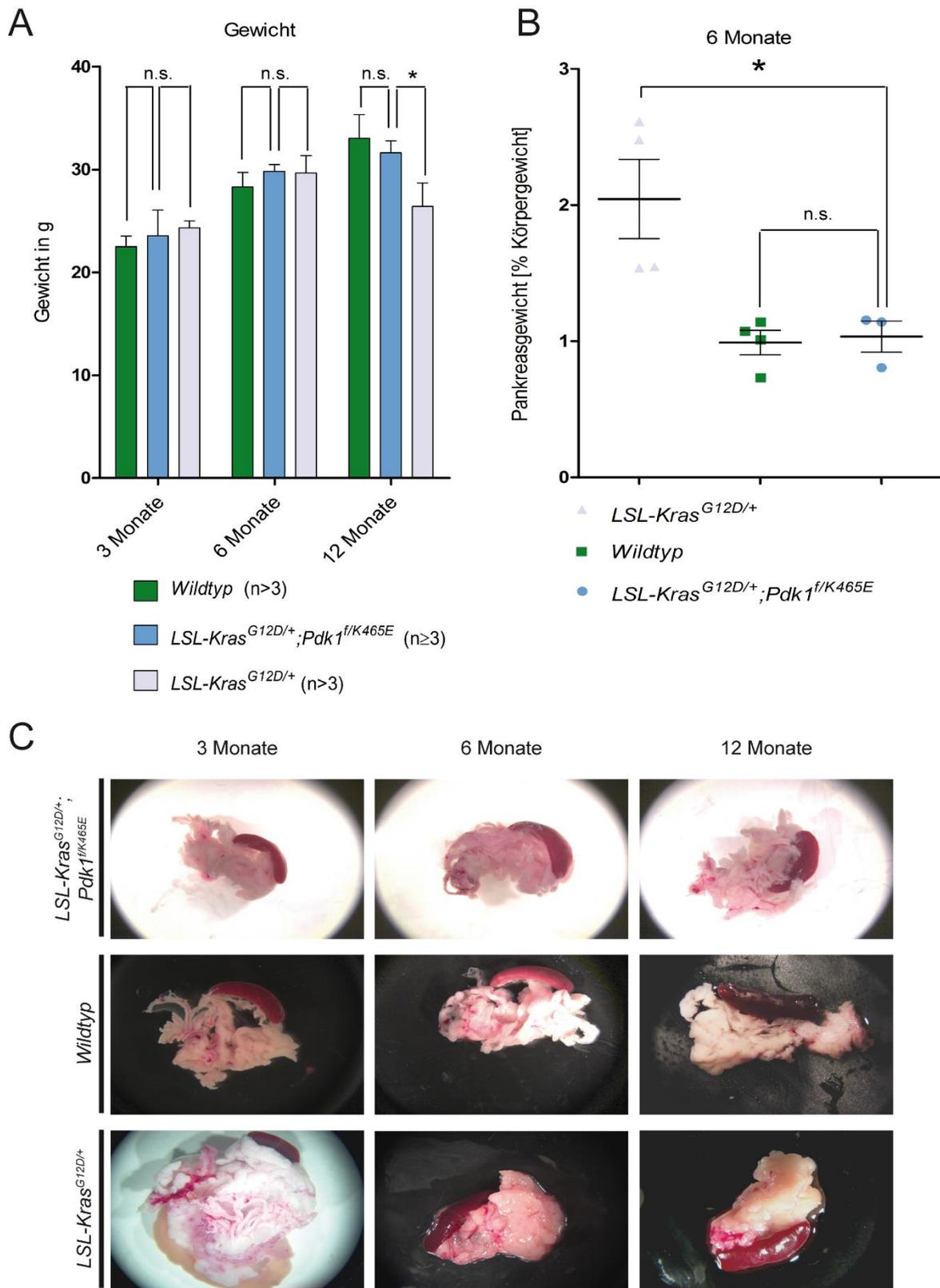


Abbildung 4.2: Normales Wachstum und morphologisch unauffälliges Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse

A) Körpergewicht in Gramm der indizierten Genotypen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). B) Pankreasgewicht in Prozent zum Körpergewicht der indizierten Genotypen im Alter von 6 Monaten (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). C) Repräsentative makroskopische Aufnahmen vom Pankreas der indizierten Genotypen zu angezeigten Zeitpunkten.

Ergebnisse

Zur histomorphologischen Analyse bei einem phänotypisch unauffälligen Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse wurden Gewebeschnitte der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse sowie der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse von jeweils drei Tieren zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate angefertigt sowie H&E und Alcianblau gefärbt (Abbildung 4.3). Die Alcianblaufärbung diente aufgrund einer gehäuften Muzinproduktion der PanIN Läsionen der besseren Beurteilung. *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse zeigten im Alter von 3 und 6 Monaten vereinzelt auftretende ADM sowie PanIN1A Läsionen. Im Gegensatz dazu entwickelten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere in diesem Alter bereits höhergradige Vorläuferläsionen sowie eine zunehmende Desmoplasie des Pankreasgewebes mit vereinzelt auftretenden dukталen Adenokarzinomen des Pankreas.

Im zeitlichen Verlauf nahmen bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen die Vorläuferläsionen zu, sodass man im Alter von 12 Monaten bei weiterhin normaler Pankreasstruktur nun vermehrt auftretende ADM und PanIN1A vorfand. Es kam jedoch zu keiner Entwicklung eines PDAC. *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse hingegen wiesen mit zunehmendem Alter deutliche morphologische Veränderungen auf und entwickelten Tumore, die mit einem Verlust der azinären Pankreasstruktur einhergingen. Dadurch herrschten bei einem Jahr alten Tieren vor allem neoplastisches Gewebe und hochgradige Vorläuferläsionen vor (Abbildung 4.3).

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der *Pdk1*-Mutante auf die Karzinogenese im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Mausmodell, das ein Wildtyp-Allel für *Pdk1* trug. Hierbei erkannte man in den histologischen Schnitten zu allen Zeitpunkten deutlich mehr ADM und PanIN1A Läsionen als bei der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mauslinie, sowie mit zunehmendem Alter auch höhergradige PanIN Läsionen, jedoch kein PDAC (Abbildung 4.3).

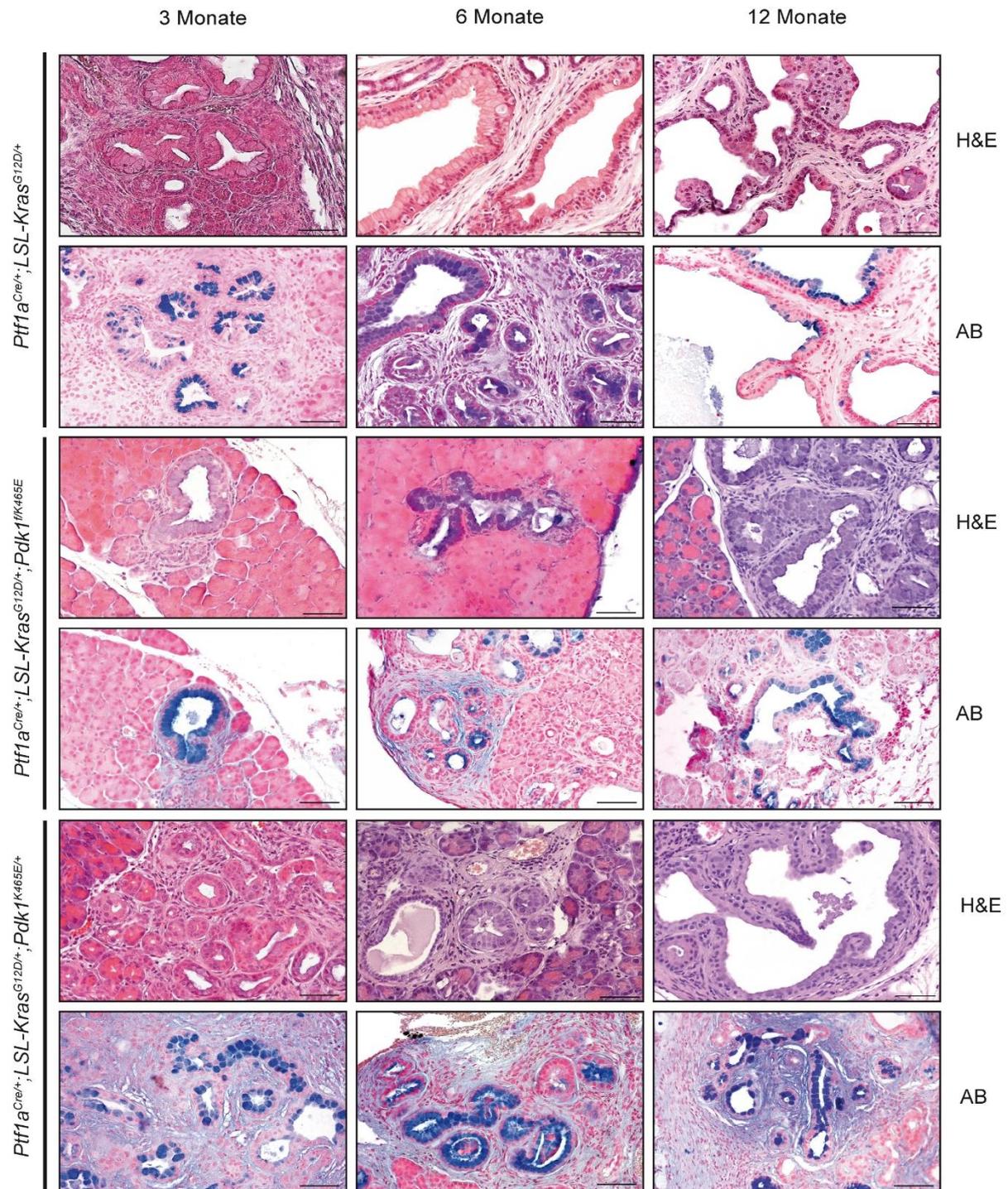


Abbildung 4.3: *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}* Tiere entwickeln PanIN Läsionen jedoch kein PDAC
 Repräsentative H&E und Alcianblaufärbung von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen (oben), *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen (mittig) und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Mäusen (unten) zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate. Maßstabsbalken 50µm.

4.2.2 Die Blockade des PI3K/AKT-Signalweges führt zu einer signifikanten Reduktion an Vorläuferläsionen

Um zu untersuchen, inwieweit die Inaktivierung der PH-Domäne die Entstehung von Vorläuferläsionen nach dem Entstehungsmodell des PDAC von Hruban et al. im Pankreas

Ergebnisse

beeinflusst, wurde eine standardisierte Auszählung der Läsionen ADM, PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 und PanIN3 zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate vorgenommen und anschließend mit *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren verglichen. Ausgezählt wurden die Pankreata der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*, *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere (Abbildung 4.4).

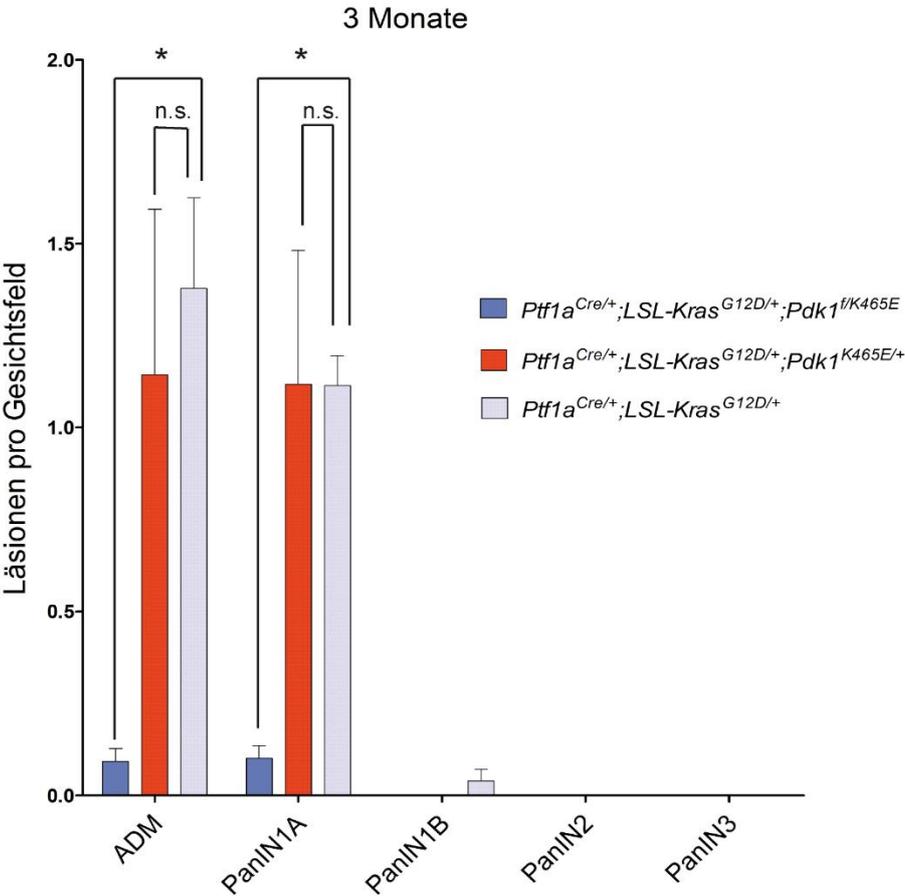
Im Alter von 3 Monaten zeigten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere ADM, PanIN1A, PanIN1B und vereinzelt PanIN2. *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Mäuse entwickelten ADM und PanIN1A, jedoch keine höhergradigen PanIN. Es zeigte sich im Vergleich mit 0,10 PanIN1A versus 2,31 PanIN1A pro Gesichtsfeld ein signifikant geringeres Auftreten bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Mäusen, was einer Reduktion um über 90% entsprach. Auch in den heterozygoten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Tieren traten im Alter von 3 Monaten lediglich ADM und PanIN1A auf. In der Auszählung ergab sich kein signifikanter Unterschied zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren (Abbildung 4.4A).

Im Alter von 6 Monaten nahm bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen die Anzahl an Läsionen zu, zusätzlich entwickelten die Tiere öfters PanIN1B und PanIN2. Die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Mauslinie entwickelte mehr ADM und PanIN1A, jedoch zeigte die Auszählung der PanIN1A für die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Mauslinie im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen einen signifikanten Unterschied mit einer Verminderung um ca. 90%. So traten im Alter von 6 Monaten bei ersteren 0,83 PanIN1A und bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren 7,49 PanIN1A pro Gesichtsfeld auf. *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Tiere entwickelten mit 2,54 PanIN1A pro Gesichtsfeld ebenfalls weniger Vorläuferläsionen als *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere, jedoch mehr als *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Tiere. Zudem zeigten sich vereinzelt PanIN1B (Abbildung 4.4B).

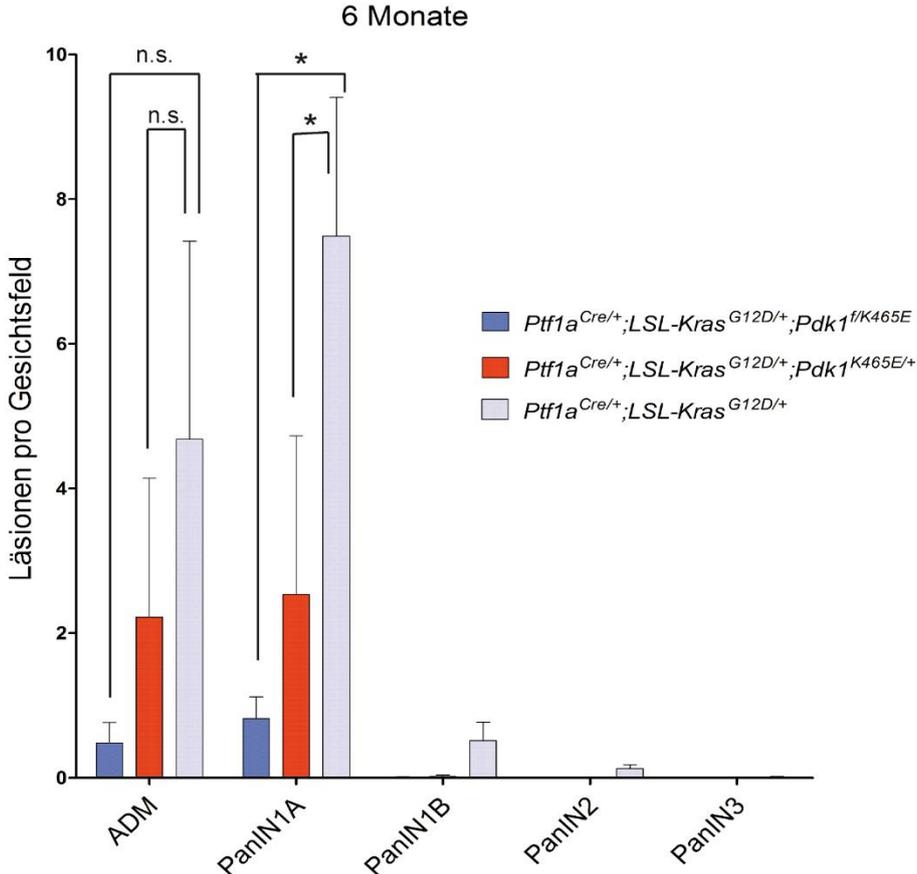
Bei 12 Monaten überwogen bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren neben PanIN1B bis PanIN3, duktales Adenokarzinome des Pankreas, die jedoch nicht ausgezählt wurden. In der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Mauslinie hingegen zeigten sich keine hochgradigen PanIN, sodass ADM und PanIN1A sowie vereinzelt PanIN1B vorkamen. Auch in den heterozygoten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Tieren war eine Reduktion der Anzahl an Vorläuferläsionen zu beobachten. Verglichen mit den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen traten weniger PanIN1A sowie keine PanIN2 und PanIN3 auf (Abbildung 4.4C).

Es konnte gezeigt werden, dass in vivo der Funktionsverlust der PH-Domäne von PDK1 in *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E-}*-Tieren die Anzahl an Vorläuferläsionen über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr signifikant verminderte und die Karzinogenese innerhalb der ersten 12 Monate vollständig unterdrückte. Eine komplette Ausschaltung der PH-Domäne führte zu einem besseren Ergebnis als die heterozygote Variante.

A



B



C

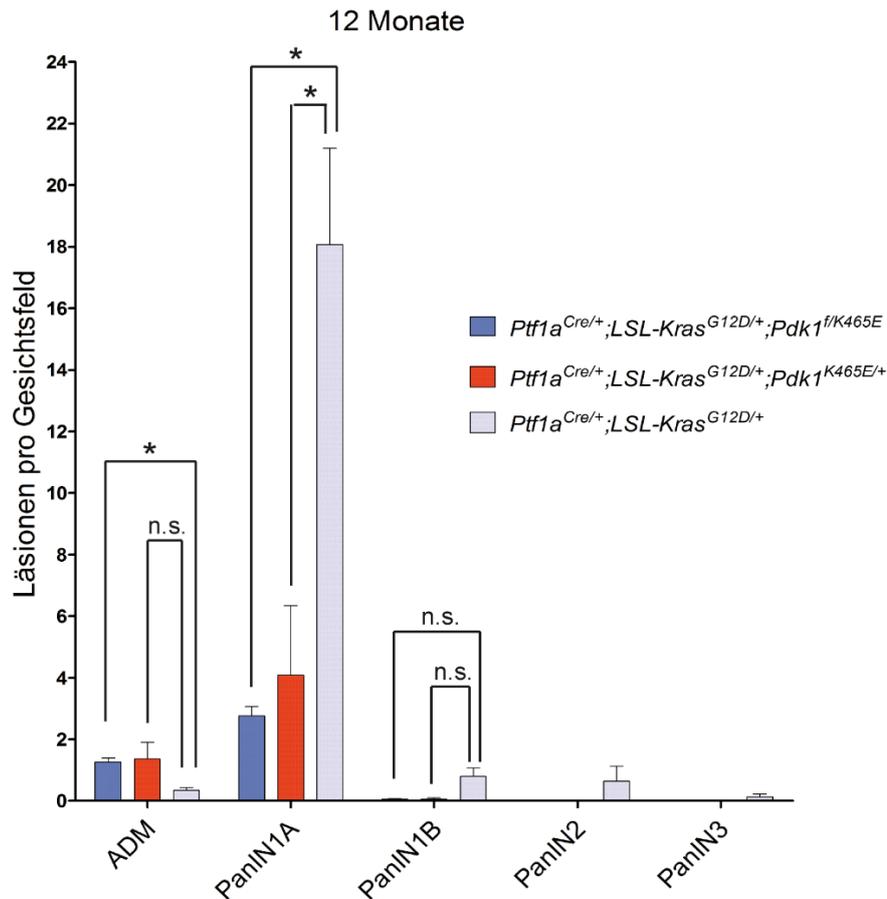


Abbildung 4.4: *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Tiere zeigen eine Reduktion an Vorläuferläsionen

A) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Tieren (n=3), *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{K465E/+}-Tieren (n=3) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 3 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). B) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Tieren (n=5), *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{K465E/+}-Tieren (n=2) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 6 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). C) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Tieren (n=2), *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{K465E/+}-Tieren (n=3) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 12 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test).

4.2.3 Der Funktionsverlust der PH-Domäne führt zu einer Dephosphorylierung von AKT

Bayascas et al. konnten zeigen, dass es bei den *Pdk1*^{K465E/K465E}-Mäusen zu einer drei- bis fünffach so geringen Phosphorylierung von AKT-T308 in Skelettmuskulatur, Herz, Leber und Fettgewebe im Vergleich zu *Pdk1*^{+/+}-Mäusen kam (Bayascas et al., 2008). Mittels immunhistochemischer Färbung zeigte sich eine Dephosphorylierung von AKT-T308 im Pankreas bei *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/K465E}-Mäusen (Abbildung 4.5). Zum Vergleich dienten *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Mäuse, die für *Pdk1* Wildtyp waren. Weiterhin wurde die

Ergebnisse

Auswirkung der heterozygoten $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}$ -Kontrollgruppe auf die Aktivierung von AKT überprüft (Abbildung 4.5). Im Rahmen der immunhistochemischen Färbung konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Aktivierung von AKT-T308 kam.

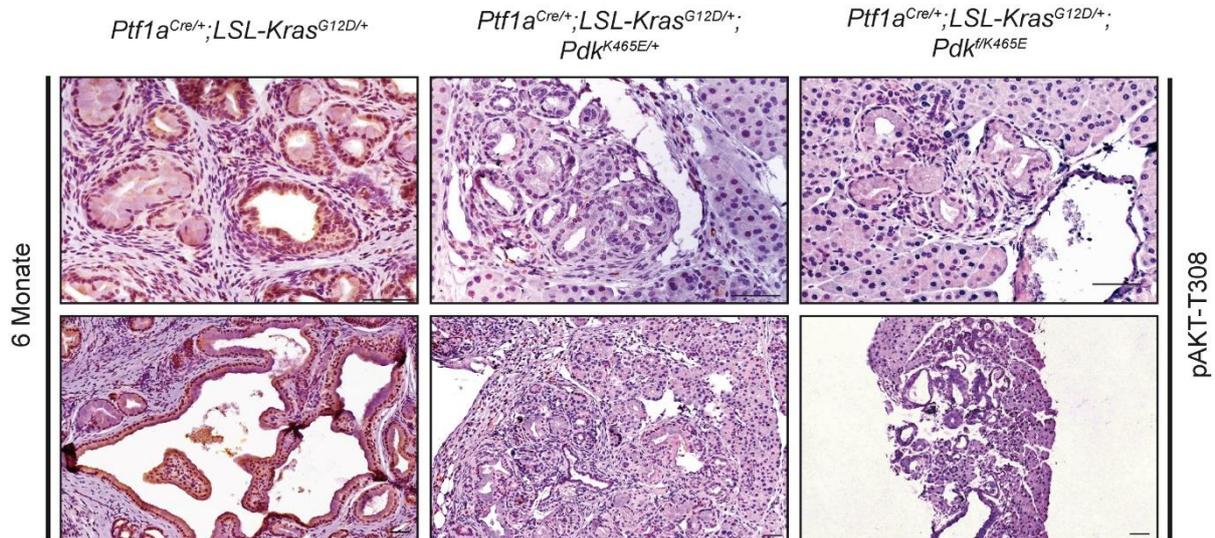


Abbildung 4.5: Die $Pdk1^{K465E/+}$ -Mutante führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT im Pankreas
Immunhistochemische Analyse von pAKT-T308 im Pankreas bei 6 Monate alten Mäusen mit indizierten Genotypen. Maßstabsbalken 50µm.

4.2.4 Blockade des PIF-unabhängigen AKT-Signalweges beeinflusst die Überlebenszeit und verhindert in bisher untersuchten Tieren die KRAS-induzierte Entstehung von PDAC in vivo

$Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ -Tumormäuse entwickeln ab 15 Monaten aus PanIN Läsionen hervorgehende PDAC und weisen ein mittleres Überleben von 466 Tagen auf. Mit einem mittleren Überleben von 720 Tagen war die Lebenserwartung von $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/f}$ -Tieren ähnlich derjenigen von Wildtyp-Tieren. Demgegenüber verlängerte der Verlust eines $Pdk1$ -Allels das mittlere Überleben im Vergleich zu $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ -Mäusen nicht. $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/+}$ -Tiere entwickelten PanIN und PDAC aufgrund aktivierter PI3K-Signalkaskaden (Eser et al., 2013). Mittels einer Überlebenszeitanalyse konnte gezeigt werden, dass 8 $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}$ -Tiere mit einer mittleren Überlebenszeit von 778 Tagen eine ähnliche Überlebenszeit wie Wildtyp-Tiere aufwiesen und sich von $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ -Tieren hinsichtlich der Überlebenszeit signifikant unterschieden (Abbildung 4.6A). Makroskopisch zeigten sich keine eindeutigen Hinweise auf ein PDAC. Histomorphologische Untersuchungen von bisher 3 analysierten $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}$ -Tieren erbrachten keine Anzeichen auf ein PDAC. Das Pankreas wies eine reguläre azinäre Struktur mit vorwiegend niedriggradigen Vorläuferläsionen auf (Abbildung 4.6B). Betrachtet man die heterozygoten $Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}$ -Tiere

Ergebnisse

entwickelte bisher ein untersuchtes Tier im Alter von 14,7 Monaten ein ausgeprägtes PDAC (Abbildung 4.6C).

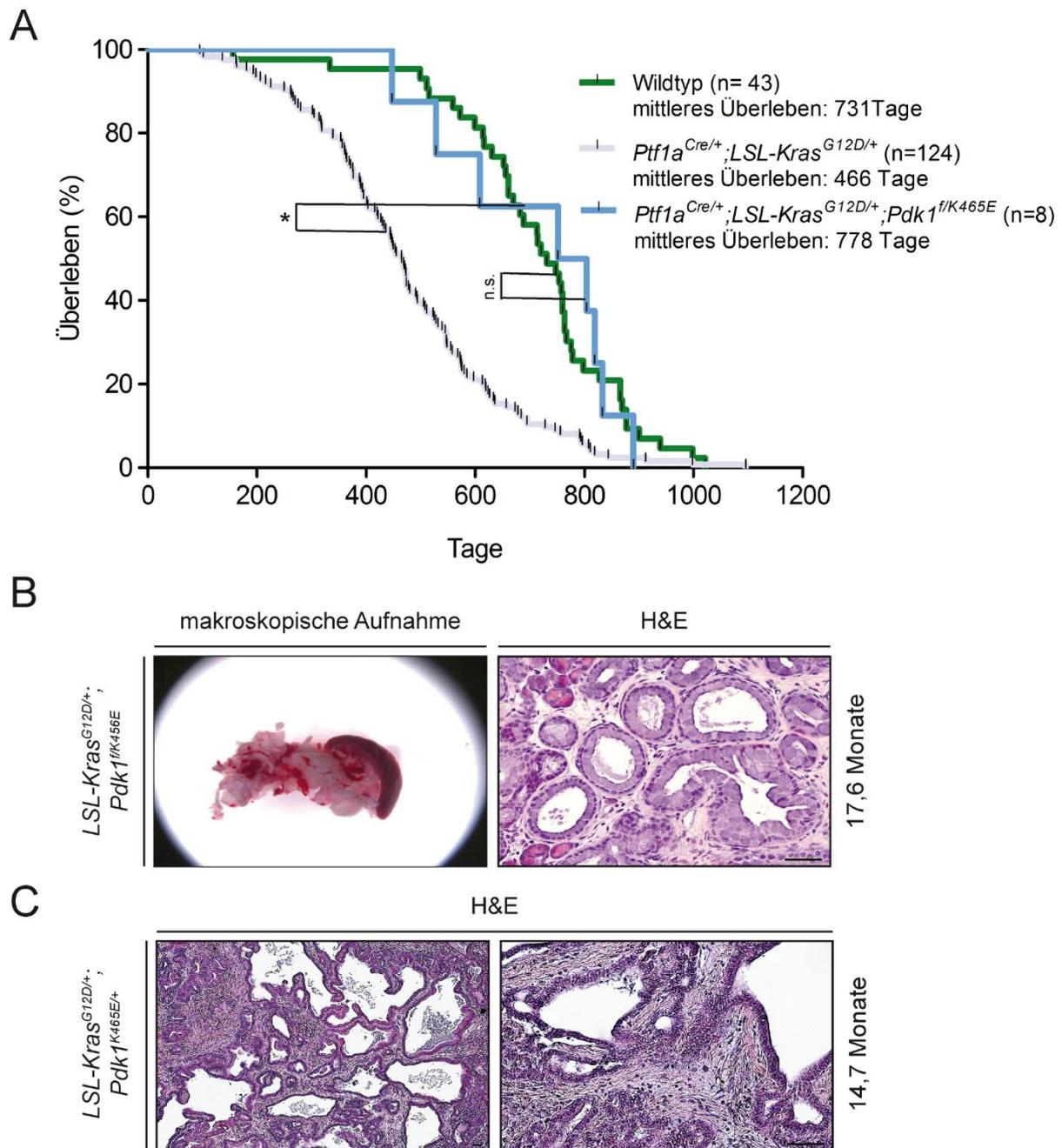


Abbildung 4.6: Die Inaktivierung des PH-abhängigen Signalweges beeinflusst die Überlebenszeit und blockiert in bisher untersuchten Tieren die KRAS-induzierte Tumorgenese des PDAC
 A) Kaplan-Meier Überlebenszeitkurve indizierter Genotypen (n.s.: nicht signifikant, *p<0,001, Log-Rank-Test). B) Repräsentative makroskopische Aufnahme und H&E Färbung von Überlebensmäusen mit indiziertem Genotyp und Alter. Maßstabsbalken 50µm. C) H&E Färbung einer *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{K465E/+}*-Maus im Alter 14,7 Monaten. Maßstabsbalken 50µm.

4.3 Analyse des PIF-abhängigen Signalweges von PDK1 im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mausmodell

Der PIF-abhängige Signalweg des *Pdk1*-Gens ist für die Phosphorylierung mehrerer AGC-Kinasen verantwortlich, darunter S6K, SGK, PKC und RSK. Um die Bedeutung des PIF-abhängigen Signalweges von PDK1 an der KRAS-induzierten Tumorgenese des duktaalen Adenokarzinoms im Pankreas in vivo zu analysieren, wurde die *Pdk1^{L155E/+}*-Mauslinie mit dem endogenen *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Pankreaskarzinommodell verkreuzt. Zur vollständigen Inaktivierung des anderen *Pdk1*-Allels wurde die etablierte *Pdk1^{f/+}*-Mauslinie dazu gekreuzt (Abbildung 4.7A). Die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäuse waren überlebens- und fortpflanzungsfähig. Der Genotyp wurde mittels spezifischer Genotypisierungs-PCR überprüft (Abbildung 4.7B) und die Rekombination der *Ptf1a^{Cre/+}*-abhängigen Mutation von PDK1 konnte durch eine spezifische PCR bestimmt werden (Abbildung 4.7C).

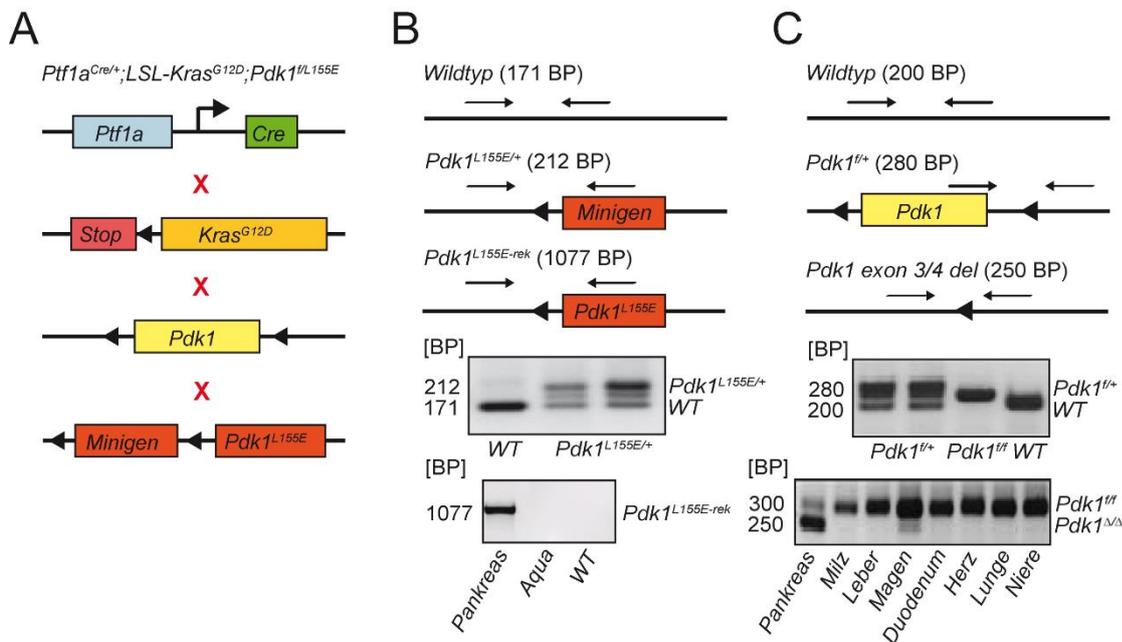


Abbildung 4.7: Aufbau und Nachweis der *Pdk1^{f/L155E}*-Mauslinie

A) Genetischer Aufbau mit dem Ziel den PIF-abhängigen Signalweg des *Pdk1*-Gens zu inaktivieren. B) Genotypisierungsschema der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante (oben). PCR-Analyse der DNS von der Schwanzspitze für Wildtyp (WT) mit 171 Basenpaaren und *Pdk1^{L155E/+}* mit 212 Basenpaaren Größe (mittig). PCR-Analyse der DNS vom Pankreas in *Ptf1a^{Cre/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen mit Nachweis *Ptf1a^{Cre/+}*-vermittelter pankreasspezifischer Deletion des Minigens (*Pdk1^{L155E-rek}*) im Vergleich zu Wildtypmäusen (unten). C) Genotypisierungsschema der *Pdk1^{f/+}*-Mutante (oben). PCR-Analyse der DNS von der Schwanzspitze für Wildtyp (WT) mit 200 Basenpaaren und *Pdk1^{f/+}* mit 280 Basenpaaren Größe (mittig). PCR-Analyse der DNS von indizierten Organen mit Nachweis *Ptf1a^{Cre/+}*-vermittelter pankreasspezifischer Deletion von Exon 3 und 4 von *Pdk1* (*Pdk1^{ΔΔ}*) in *Ptf1a^{Cre/+};Pdk1^{f/f}*-Mäusen (unten).

4.3.1 Auftreten von Vorläuferläsionen in der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Maus innerhalb eines Jahres

Um die Effekte der pankreasspezifischen Inaktivierung des PIF-abhängigen Signalweges in vivo zu analysieren, wurden insgesamt 7 *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere auf phänotypische und morphologische Veränderungen hin untersucht und mit Wildtypmäusen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate verglichen. Das Körpergewicht der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere sowie der Wildtypmäuse unterschied sich im Alter von bis zu einem Jahr nicht signifikant (Abbildung 4.8A). Damit konnte von einem normalem Wachstum der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere ausgegangen werden. Das Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere zeigte im Alter von 6 Monaten keine signifikante Differenz bezogen auf das Gewicht zu Wildtyptieren, es betrug prozentual am Gesamtgewicht gemessen bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren und Wildtypmäusen ca. 1%. Das Pankreasgewicht stellt einen Hinweis auf die Entwicklung von PDAC dar, so machte das Pankreas bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen 2% des Gesamtgewichts aus und wich somit signifikant von demjenigen der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere ab (Abbildung 4.8B). Die Morphologie des Pankreas zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate ließ bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren keine knotigen oder zystischen Veränderungen, keine Metastasen und keinen blutigen Aszites als Zeichen einer Peritonealkarzinose erkennen, sodass makroskopisch kein Hinweis auf ein PDAC bestand. Die Pankreata der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse wiesen bereits makroskopisch knotige Veränderungen auf (Abbildung 4.8C).

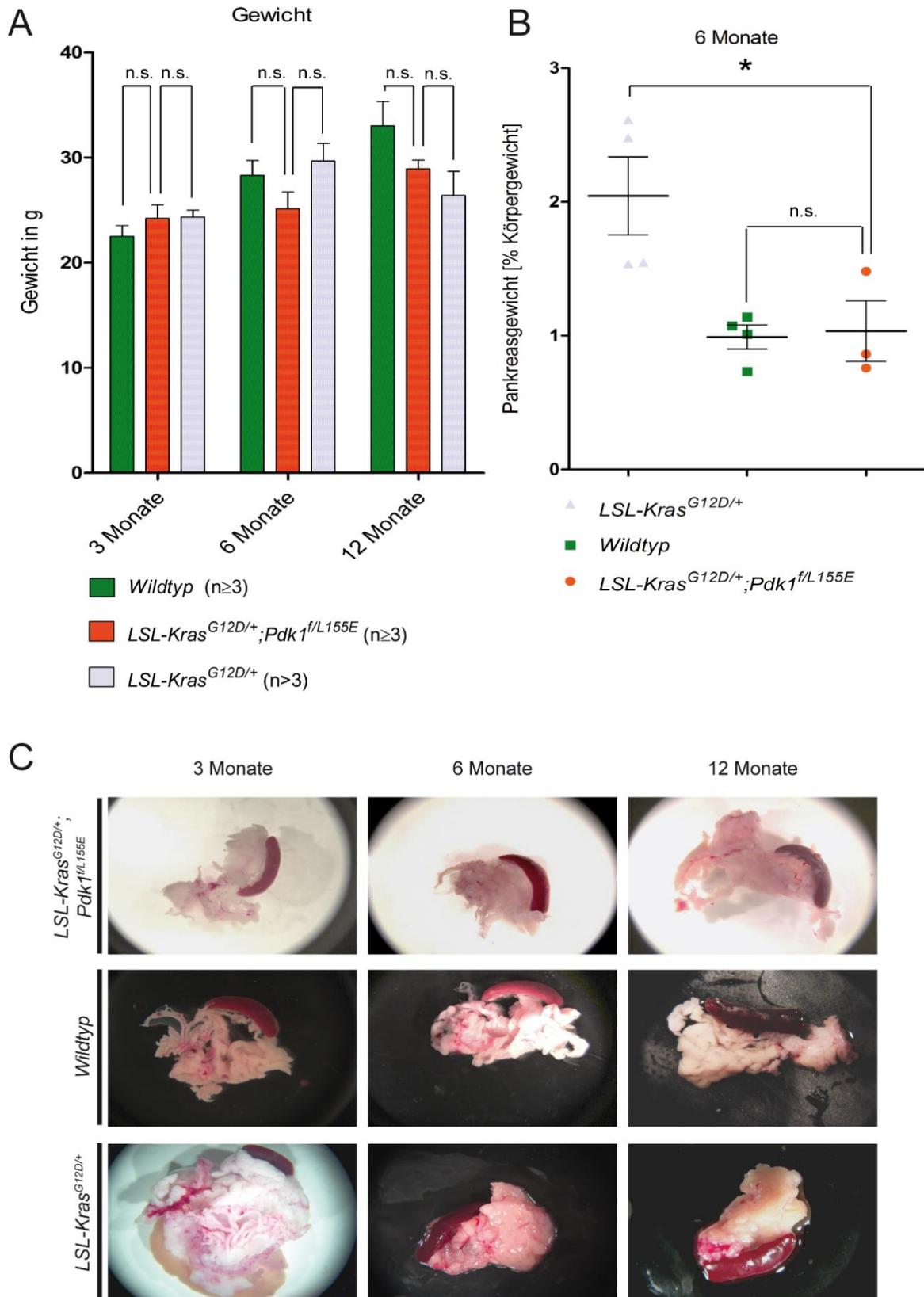


Abbildung 4.8: Unauffälliger Phänotyp und morphologisch normales Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}-Mäuse*

A) Körpergewicht in Gramm der indizierten Genotypen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate (n.s.: nicht signifikant, Zweistichproben-t-Test). B) prozentuale Angabe des Pankreas am Gesamtgewicht der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Maus, der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Maus und der Wildtypmaus im Alter von 6 Monaten, jeweils mind. drei Tiere (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). C) Repräsentative Abbildung eines Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Maus zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate.

Ergebnisse

Zur histomorphologischen Untersuchung der Pankreata wurden Gewebeschnitte von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate angefertigt sowie H&E und Alcianblau gefärbt (Abbildung 4.9). *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere wiesen im Alter von 3 und 6 Monaten vorwiegend azinäre Zellen in der für das gesunde Pankreas typischen Läppchenstruktur auf. Vereinzelt traten niedriggradige Vorläuferläsionen wie ADM, PanIN1A und PanIN1B auf. Im Alter von 12 Monaten nahmen bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen die Anzahl von PanIN1A und PanIN1B zu, jedoch zeigten sich keine höhergradigen pankreatischen intraepithelialen Neoplasien sowie keinerlei Anzeichen für ein PDAC, wie Desmoplasie, Verlust der azinären Struktur, gehäufte Mitosen oder Zellpolymorphien. Die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere entwickelten, wie bereits unter 3.1. beschrieben, im Alter von 3 bis 6 Monaten Vorläuferläsionen jeglichen Grades sowie im fortschreitenden Alter duktale Strukturen, dichtes Fibroblastenstroma und zelluläre Atypien, Polymorphie, gehäuft Mitosen und Desmoplasien des Gewebes als typische Merkmale des PDAC (Abbildung 4.9).

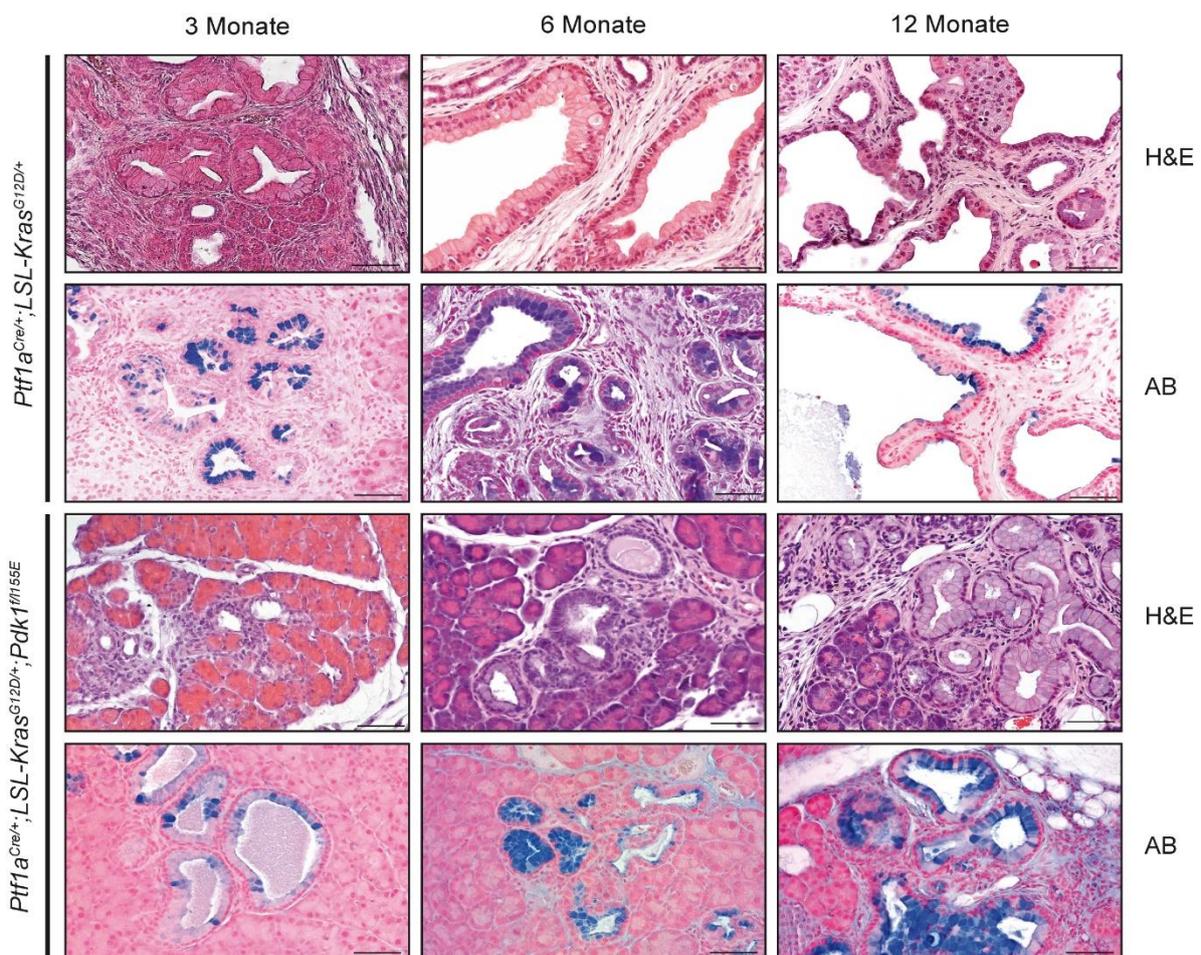


Abbildung 4.9: *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere entwickeln niedriggradige Vorläuferläsionen
Repräsentative H&E und Alcianblaufärbung von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate (oben). Repräsentative H&E und Alcianblaufärbung von *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate (unten). Maßstabsbalken 50µm.

4.3.2 Die Inhibierung der PIF-Domäne führt zu einer Reduktion an Vorläuferläsionen im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen

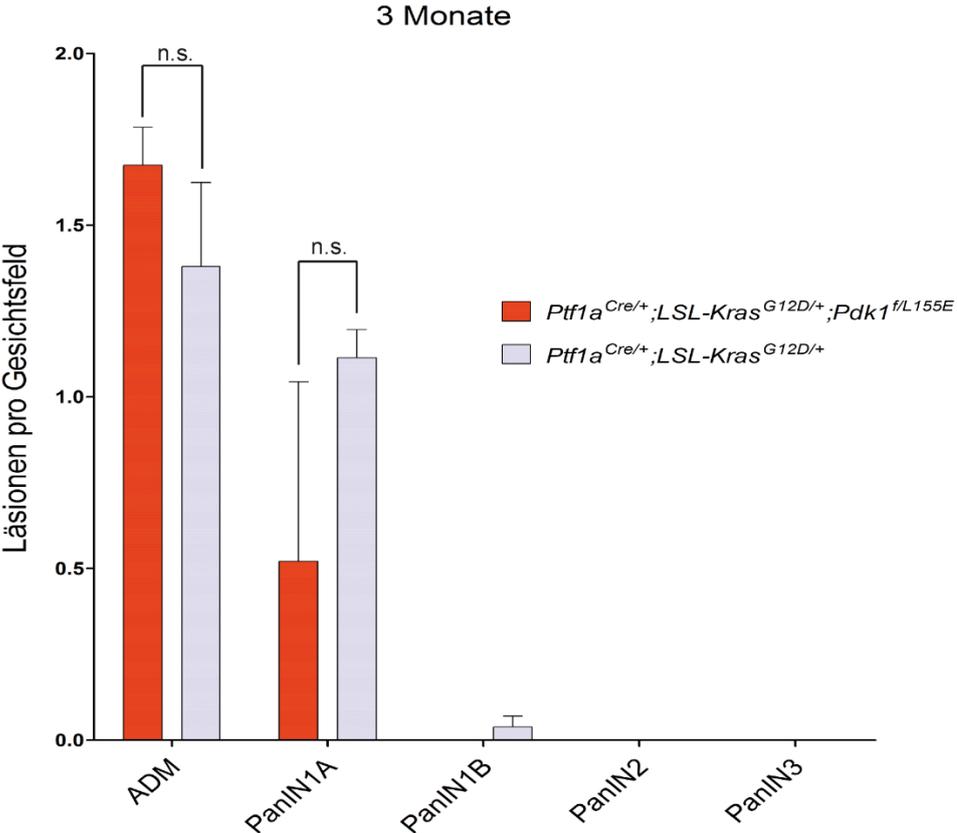
Die Histologie des Pankreasgewebes der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere zeigte ein Auftreten von Vorläuferläsionen. Zur genaueren Analyse dieser Vorläuferläsionen erfolgte eine Differenzierung zwischen ADM, PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 und PanIN3 sowie eine standardisierte Auszählung der vorhandenen Läsionen bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Monate (Abbildung 4.10). PDAC wurden berücksichtigt, aber nicht ausgezählt.

Im Alter von 3 und 6 Monaten entwickelten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäuse ADM, PanIN1A und vereinzelt PanIN1B. Im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen zeigte sich kein signifikant verändertes Auftreten an ADM, PanIN1A und PanIN1B bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren. *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse im Alter von 3 und 6 Monaten entwickelten PanIN2 und PanIN3, *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere hingegen nicht (Abbildung 4.10A + 4.10B).

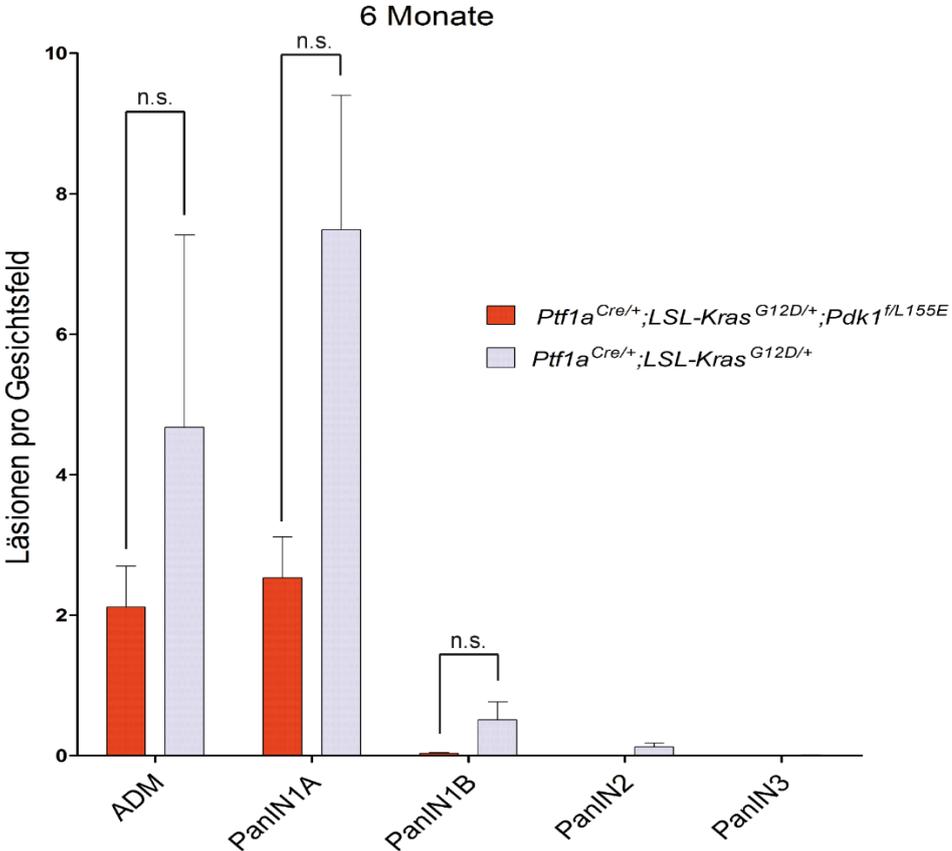
Zum Untersuchungszeitpunkt von 12 Monaten nahm die Häufigkeit der ADM bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen leicht ab. Es zeigte sich ein signifikant vermindertes Vorkommen der PanIN1A im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren und weiterhin vereinzelt auftretende PanIN1B ohne signifikanten Unterschied zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäusen. Höhergradige PanIN oder Neoplasien im Pankreas bildeten die untersuchten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tiere nicht (Abbildung 4.10C). Passend zur Histologie entwickelten 12 Monate alte *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Mäuse, wie unter 4.2.3 bereits beschreiben, neben an Häufigkeit zunehmenden PanIN jeglichen Grades, duktale Adenokarzinome des Pankreas.

Die Differenzierung und standardisierte Auszählung der Läsionen innerhalb des ersten Jahres zeigte, dass in den untersuchten Tieren durch die *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante in den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen eine Karzinogenese des PDAC vollständig unterdrückt und ein Auftreten hochgradiger PanIN verhindert werden konnte. Eine signifikante Reduktion niedriggradiger Vorläuferläsionen konnte hingegen nicht beobachtet werden.

A



B



C

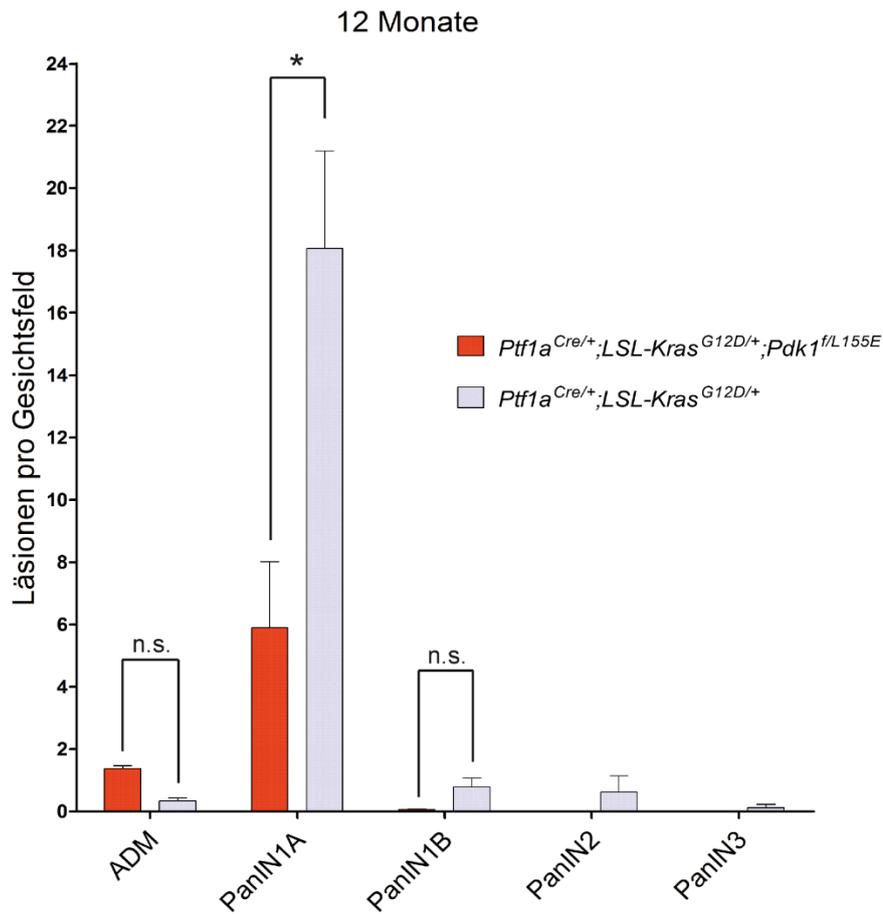


Abbildung 4.10: *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}-Tiere weisen eine Blockade höhergradiger PanIN innerhalb eines Jahres auf

A) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}-Tieren (n=2) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 3 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). B) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}-Tieren (n=3) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 6 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test). C) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}-Tieren (n=2) und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 12 Monate (n.s.: nicht signifikant, *p<0,05, Zweistichproben-t-Test).

4.3.3 Die Inaktivierung des PIF-abhängigen Signalweges durch die *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante beeinflusst die Phosphorylierung von AKT nicht

Um die in 4.3.2 festgestellten Effekte der *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante weiter zu analysieren und um eine reduzierte Phosphorylierung von AKT als mögliche Ursache auszuschließen, wurde eine immunhistochemische Färbung für pAKT-T308 des pankreatischen Gewebes von 6 Monate alten *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}- und *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tieren angefertigt (Abbildung 4.11). Es zeigte sich im Pankreasgewebe der *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{fl/L155E}-Mäuse, dort vor allem in den neoplastischen Vorläuferläsionen, phosphoryliertes AKT-T308

Ergebnisse

vergleichbar zur immunhistochemischen Färbung der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tiere, die für *Pdk1* Wildtyp sind. Dies entsprach der erwarteten Hypothese, dass die *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante keinen Einfluss auf die PKD1-abhängige Phosphorylierung von AKT hat.

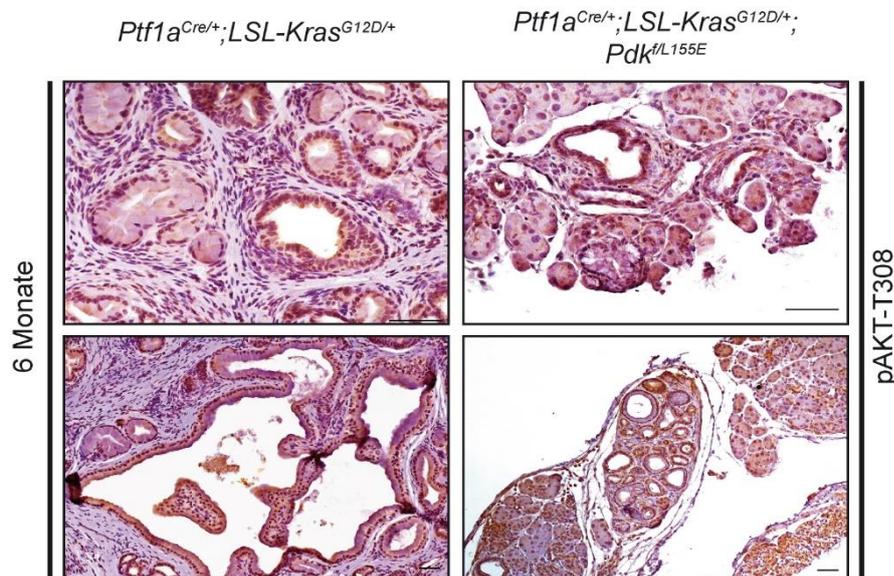


Abbildung 4.11: Die *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante beeinflusst die Phosphorylierung von AKT-T308 im Pankreas nicht Immunhistochemische Analyse von pAKT-T308 im Pankreas bei 6 Monate alten Mäusen mit induzierten Genotypen. Maßstabsbalken 50µm.

4.3.4 Die *Ptf1a^{Cre/+}*-Rekombinase führt zu einer pankreasspezifischen Rekombination der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante

Es handelt sich bei der *Pdk1^{f/+}*- und bei der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante um konditionelle Knock-in Gene, die in den verwendeten Mausmodellen mittels *Ptf1a^{Cre/+}*-Rekombinase pankreasspezifisch aktiviert werden. Eine unvollständige oder fehlende Rekombination in einzelnen Zellen könnte eine mögliche Ursache für das Auftreten von PanIN im Pankreas der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäuse darstellen. Um die spezifische Rekombination der *Pdk1^{f/+}*- und der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante in den genutzten Mausmodellen zu verifizieren, wurden per Mikrodissektion einzelne PanIN des Pankreas von 3 und 6 Monate alten *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{L155E/L155E}*-Tieren isoliert und diese dann mittels spezifischer PCR auf eine erfolgte Rekombination sowie auf eine nicht-erfolgte Rekombination getestet (Abbildung 4.12). Zur PCR-Analyse wurden drei verschiedene PanIN von jeweils zwei Mäusen pro Genotyp mikrodisseziert. In allen isolierten PanIN zeigte sich eine erfolgte Rekombination der *Pdk1^{f/+}*- und der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante. Des Weiteren ergaben die PCR-Ergebnisse in denselben Proben eine fehlende Rekombination der *Pdk1^{f/+}*- und der *Pdk1^{L155E/+}*-Mutanten (Abbildung 4.12).

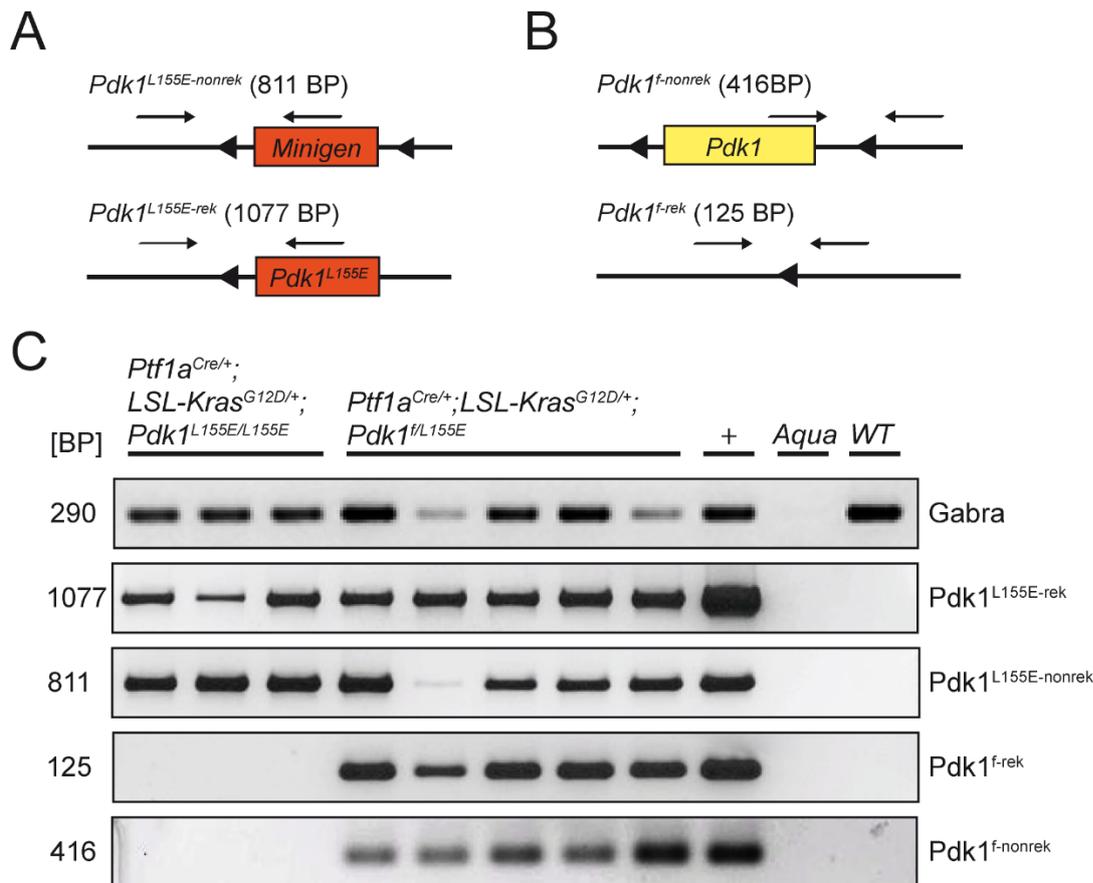


Abbildung 4.12: Die *Ptf1a*^{Cre/+}-Rekombinase führt zu einer pankreasspezifischen Rekombination der *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante

A) Rekombinationsschema der *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante. Spezifischer Nachweis nicht-rekombinierter *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante (oben). Spezifischer Nachweis rekombinierter *Pdk1*^{L155E/+}-Mutante (unten). B) Rekombinationsschema der *Pdk1*^{f/+}-Mutante. Spezifischer Nachweis nicht-rekombinierter *Pdk1*^{f/+}-Mutante (oben). Spezifischer Nachweis rekombinierter *Pdk1*^{f/+}-Mutante (unten). C) Repräsentative Rekombinations-PCR von mikrodissezierten PanIN bei induzierten Genotypen. + entspricht einer für die PCR spezifischen Positivkontrolle, Aqua entspricht einer Wasserkontrolle und WT entspricht einer Wildtypkontrolle. Gabra zum Nachweis von DNS in der Probe.

4.3.5 Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges verkürzt das Überleben ohne Nachweis einer KRAS-induzierten Tumorgenese des PDAC

Ptf1a^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäuse entwickeln ab 15 Monaten aus PanIN Läsionen hervorgehende PDAC und weisen ein mittleres Überleben von 466 Tagen auf. Mit einem mittleren Überleben von 720 Tagen war die Lebenserwartung von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/f}-Tieren ähnlich derjenigen von Wildtyptieren (Eser et al., 2013). In einer Überlebenszeitanalyse mit 14 *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/L155E}-Tieren zeigte sich ein mittleres Überleben von 220,5 Tagen. Damit verkürzte sich das Überleben verglichen mit Wildtyptieren um knapp 500 Tage und verglichen mit *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-Tumormäusen um knapp 246 Tage (Abbildung 4.13A). Fast ausnahmslos mussten die 14 *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/L155E}-Tiere aufgrund eines deutlich reduzierten Allgemeinzustands erlöst werden. Histomorphologische Untersuchungen von *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pdk1*^{f/L155E}-Tieren ergaben keine Hinweise auf ein PDAC. Auffällig zeigte sich jedoch bei älteren Tieren eine

Ergebnisse

ausgeprägte lipomatöse Atrophie des Pankreas, die hauptsächlich aus Fettvakuolen, lymphozytären Zellen und gruppierten PanIN bestand (Abbildung 4.13B). Somit verkürzte die Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges das Überleben signifikant, jedoch konnte trotz onkogenem KRAS in untersuchten Tieren kein Auftreten von PDAC festgestellt werden. Schlussfolgernd ist die herabgesetzte Lebenserwartung nicht auf eine KRAS-induzierte Tumorgenese des Pankreas zurückzuführen. Eine Aussage, inwieweit die Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges die KRAS-induzierte Entstehung von PDAC blockiert, ist aufgrund der verkürzten Lebenserwartung nicht sicher möglich.

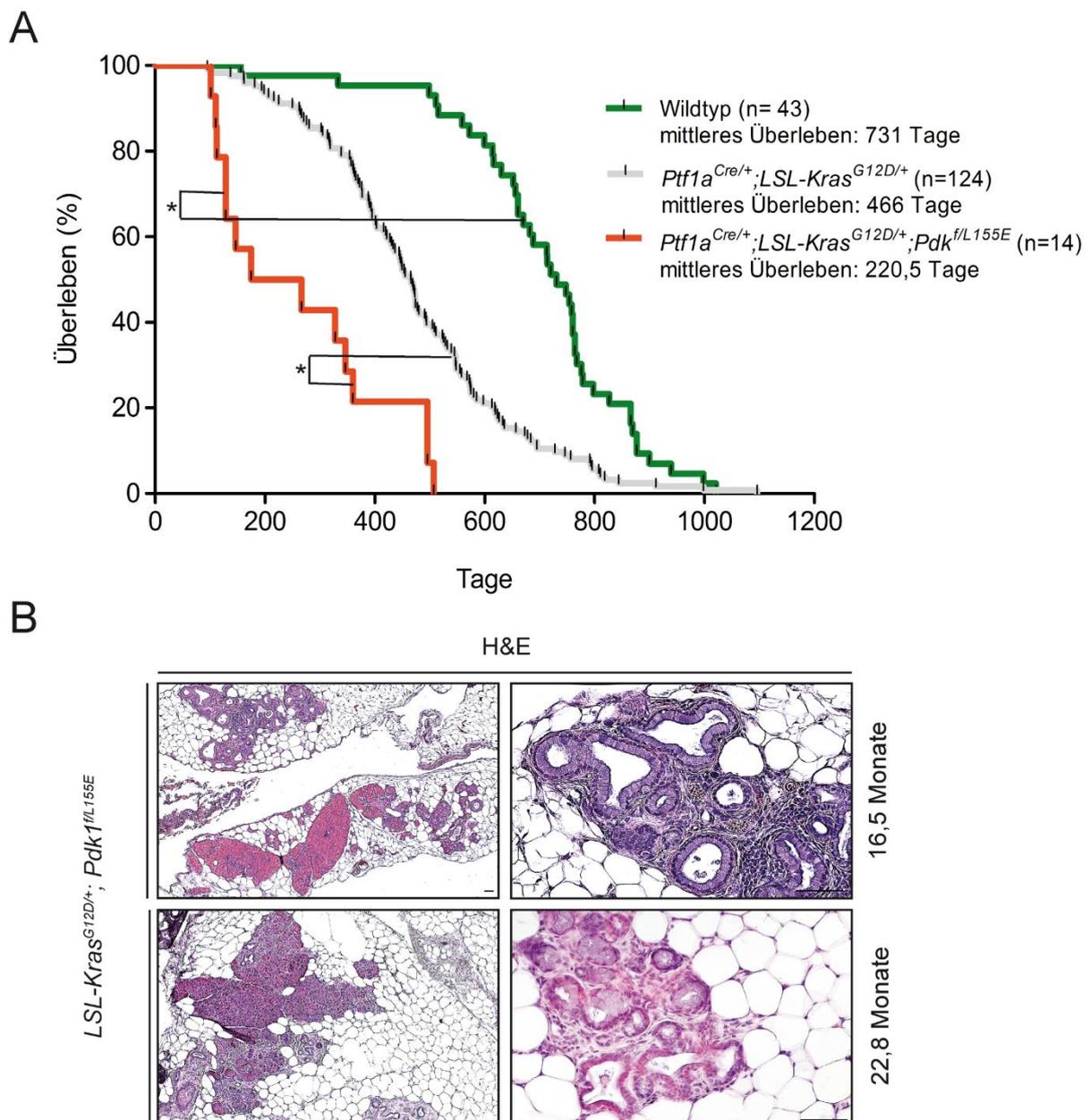


Abbildung 4.13: Hemmung des PIF-abhängigen Signalweges verkürzt das Überleben ohne Nachweis einer KRAS-induzierten Tumorgenese des PDAC und führt zu einer lipomatösen Atrophie des Pankreas
 A) Kaplan-Meier Überlebenszeitkurve indizierter Genotypen (n.s.: nicht signifikant, * $p < 0,001$, Log-Rank-Test). B) H&E Färbung der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{fl/L155E}*-Mäuse mit indiziertem Alter. Maßstabsbalken 50 μ m.

4.4 Vergleich der beiden Mutanten im *Kras*-Modell

Sowohl die Inhibierung der PH-Domäne als auch der Funktionsverlust der PIF-Bindungstasche führten innerhalb eines Jahres im endogenen Pankreaskarzinommodell zu einer Reduktion an niedriggradigen Vorläuferläsionen und zu einer Blockade höhergradiger PanIN im Pankreas im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren. Zu dem Zeitpunkt von 6 Monaten fanden sich signifikant weniger ADM und PanIN1A bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen als bei den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen. PanIN1B traten nur bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren auf, höhergradige PanIN entwickelten beide Versuchsreihen nicht (Abbildung 4.14A). Das mittlere Überleben wich signifikant voneinander ab, *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse lebten im Schnitt 550 Tage länger (Abbildung 4.14B). Immunhistochemisch konnte eine AKT-Blockade durch die Inhibierung der PH-Domäne im endogenen Pankreaskarzinommodell gezeigt werden. Im Unterschied hierzu bewirkte der Funktionsverlust der PIF-Bindungstasche keine AKT-Blockade (Abbildung 4.14C). Zusammenfassend unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass die Ausschaltung des PIF-unabhängigen AKT-Signalweges mittels stärkerer Reduktion an Vorläuferläsionen die KRAS-induzierte Tumorgenese wesentlich beeinflusste. Die Überlebenszeitanalyse wies wiederum auf die entscheidende Beeinflussung der KRAS-induzierten Tumorgenese durch die AKT-Blockade und verdeutlichte das signifikant kürzere Überleben der Tiere mit Funktionsverlust der PIF-Bindungstasche.

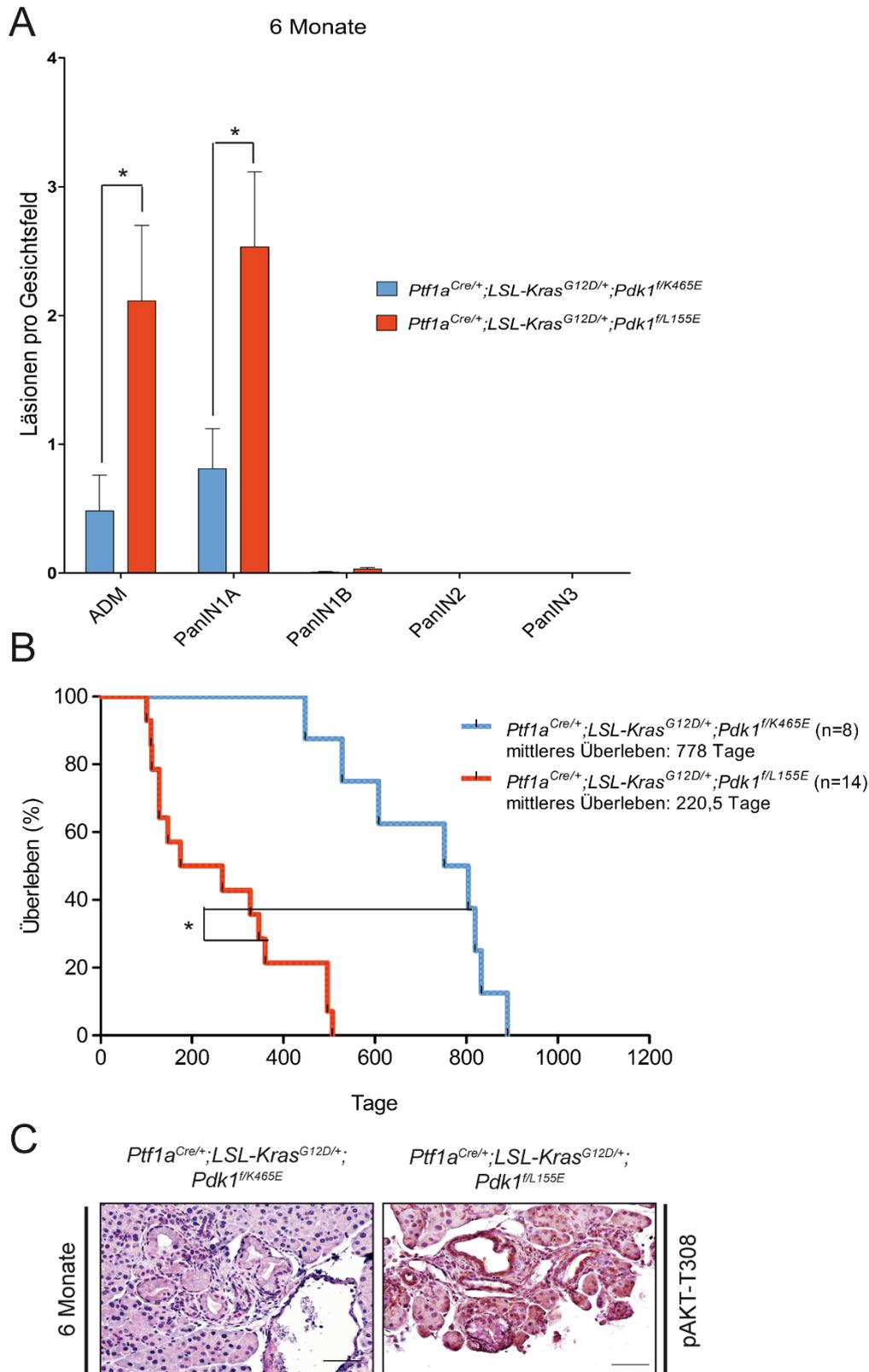


Abbildung 4.14: Durch die Blockade der PH-Domäne kommt es zu weniger Vorläuferläsionen und einem längerem Überleben als durch die Blockade der PIF-Bindungstasche in endogenen Pankreaskarzinommodell

A) Quantifizierung der ADM und PanIN Läsionen von *Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pdk1*^{fl/K465E}-Tieren (n=5) und *Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pdk1*^{fl/L155E}-Tieren (n=3) zum Zeitpunkt 6 Monate (*p<0,05, Zweistichproben-t-Test). B) Kaplan-Meier Überlebenszeitkurve indizierter Genotypen (*p<0,001, Log-Rank-Test). C) Repräsentative immunhistochemische Analyse von pAKT-T308 im Pankreas von *Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pdk1*^{fl/K465E}-Mäusen und *Ptf1a*^{Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pdk1*^{fl/L155E}-Mäusen zum Zeitpunkt 6 Monate. Maßstabsbalken 50µm.

4.5 Analyse der Expression des PDK1-abhängigen Signalweges von AKT, SGK und RSK2

Um den Einfluss der beiden Mutanten auf die Expression der *Pdk1*-abhängigen Kinasen genauer zu untersuchen, wurde eine Immunoblotanalyse durchgeführt. Dafür wurde die Phosphorylierung der PDK1-Effektoren AKT, RSK2 und SGK im Pankreasgewebe 3 Monate alter Tiere getestet. Die Immunoblotanalyse ergab in Übereinstimmung mit der gezeigten Reduktion der Phosphorylierung von AKT-T308 in der Immunhistochemie eine nahezu fehlende Expression von pAKT-T308 im Pankreasgewebe der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäuse (Abbildung 4.15A). Die Expression von pAKT wurde anhand der Ladungskontrolle α -Tubulin quantifiziert (Abbildung 4.15B). Eine verminderte Aktivität von pAKT in den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen ließ sich nachweisen. Ebenfalls führte die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Maus zu einer reduzierten Expression von pAKT. Die Inhibierung des PIF-abhängigen Signalweges mittels *Pdk1^{L155E/+}*-Mutante, wie von Bayascas et al. 2006 beschreiben, bewirkt eine fehlende Expression mehrerer AGC-Kinasen, einschließlich SGK und RSK2. In der Immunoblotanalyse wurde eine Expression von SGK und RSK2 in den Pankreata der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-, *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren festgestellt. Um eine mögliche Reduktion festzustellen, wurde die Expression von SGK und RSK2 anhand der Ladungskontrolle α -Tubulin quantifiziert (Abbildung 4.15B). Es zeigte sich eine verminderte Aktivierung von SGK und RSK2 bei *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäusen im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*- und *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Mäusen. Die *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/K465E}*-Tiere wiesen sogar eine leicht erhöhte Expression an SGK und RSK2 im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren, die für *Pdk1* Wildtyp sind, auf. Alle Kinasen waren im Vergleich zu *Pdk1*-Wildtyp unverändert exprimiert (Abbildung 4.15A).

Ergebnisse

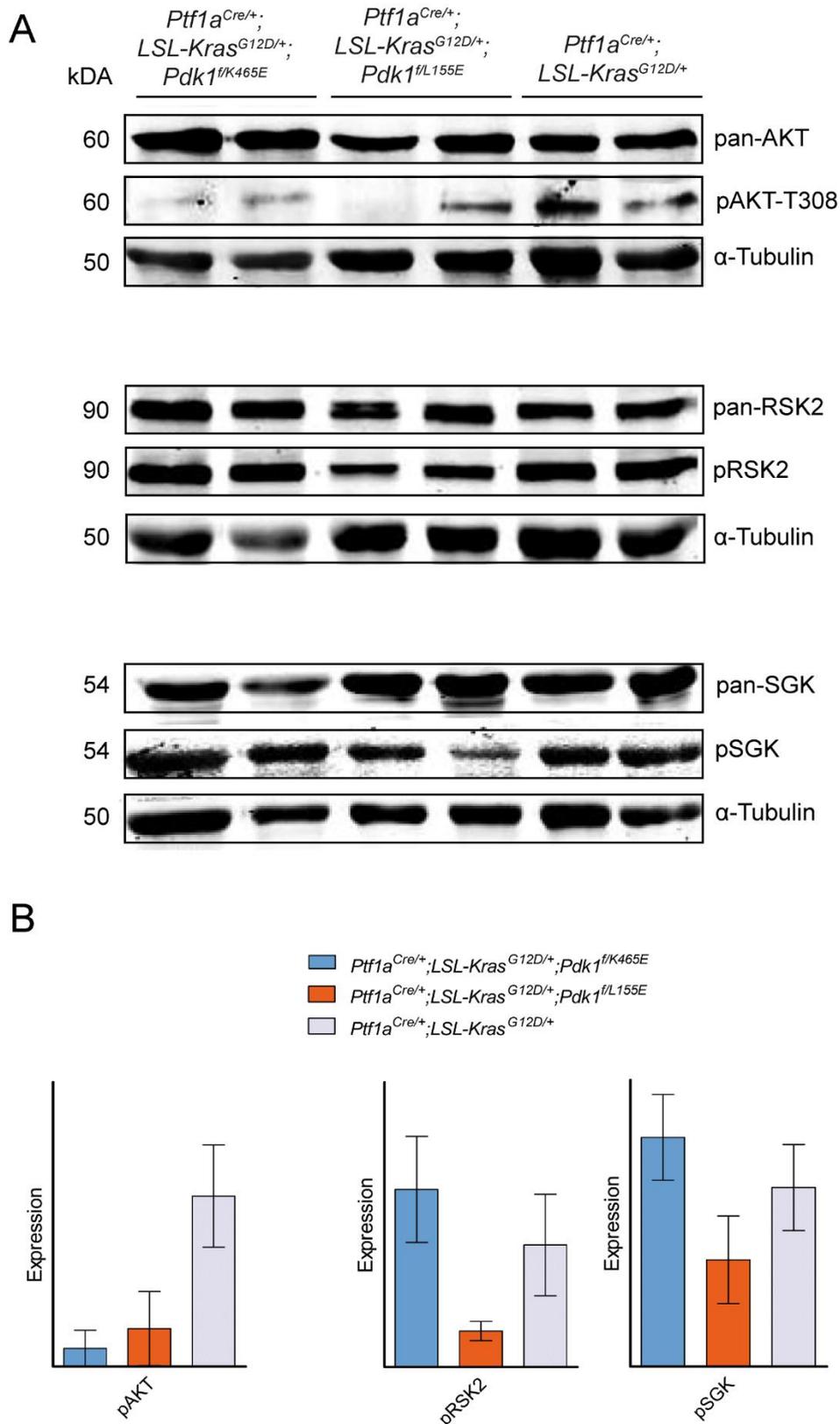


Abbildung 4.15: Funktionsverlust der PH-Domäne resultiert in einer Reduktion von AKT, die Inaktivierung der PIF-Bindungsstasche bewirkt eine Reduktion von SGK und RSK2
 A) Immunoblotanalyse der PDK1-abhängigen Signalwegaktivierung von AKT, SGK und RSK2 in Pankreata 3 Monate alter Mäuse bei indizierten Genotypen. α -Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet.
 B) Quantifizierung der Expression in der Immunoblotanalyse bezogen auf α -Tubulin von indizierten Kinasen bei genannten Genotypen.

5. Diskussion

Onkogenes KRAS ist ein zentrales Element in der Karzinogenese des menschlichen PDAC, jedoch alle therapeutischen Versuche, die auf aktiviertes KRAS zielten, schlugen fehl. Die englischsprachige Literatur spricht davon, dass KRAS „non druggable“ sei (Dunne & Hezel, 2015; Fang, 2015). KRAS entfaltet seine onkogene Wirkung hauptsächlich über drei Signalkaskaden, den PI3K/AKT-, den Raf/MEK/ERK- und den Ral/GDS-Signalweg. Eser et al. wiesen auf die zentrale Bedeutung des PI3K/AKT-Weges in der Onkogenese des PDAC in vitro als auch in vivo hin (Eser et al., 2013). Die Aktivierung des Signalweges in vivo führte im murinen Pankreas zu PanIN und PDAC, wohingegen dessen Inaktivierung im pankreasspezifischen *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormausmodell die PanIN und PDAC Entwicklung vollständig blockierte. Auch setzten die Autoren PDK1-Inhibitoren ein, die die Onkogenese erfolgreich blockierten. Zur Erweiterung entsprechend einer Spezifizierung des therapeutischen Ansatzes war es sinnvoll, die beiden regulatorischen Untereinheiten von PDK1, PH- und PIF-Domäne, und ihre abhängigen Kinasen hinsichtlich der Blockade von PDAC einzeln zu untersuchen.

5.1 Inaktivierung der PH-Domäne von PDK1

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die spezifische Blockade der PH-Domäne von PDK1 im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{i/K465E}*-Tumormausmodell ein Überleben äquivalent zu Wildtyptieren erreicht und die KRAS-induzierte Entstehung von PDAC in bisher untersuchten Tieren verhindert werden konnten. Innerhalb des ersten Jahres zeigte sich eine signifikante Reduktion von niedriggradigen Vorläuferläsionen im Vergleich zu *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren und eine Unterdrückung von höhergradigen PanIN. Damit konnte erstmalig in vivo gezeigt werden, dass der PH-Domäne von PDK1 und der von ihr vermittelten Phosphorylierung von AKT in der KRAS-induzierten Karzinogenese des PDAC eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Auf die zentrale Rolle von AKT in der Tumorneogenese wiesen bereits mehrere Arbeiten hin, sodass die Expression von AKT als entscheidender tumorinduzierender Faktor etabliert und AKT als molekulares Ziel für eine Krebstherapie anerkannt ist (Berg & Soreide, 2012). Eine in vielen Arbeiten gezeigte Amplifizierung und Überexpression von AKT in humanen pankreatischen Zelllinien sowie der Nachweis von AKT in PDAC und Metastasen verdeutlicht zudem die Relevanz von AKT für das Pankreaskarzinom im Menschen (Albury et al., 2015; Altomare et al., 2002; Cheng et al., 1996; Tokunaga et al., 2008). So zeigten Albury et al., dass Mäuse mit kontinuierlich aktivem AKT (*Akt1^{Myr}*) im pankreasspezifischen *Pdx^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormausmodell deutlich schneller PDAC entwickelten als Tiere im *Pdx^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormausmodell. Zusätzlich stellte die Arbeitsgruppe in den PanIN der *Akt1^{Myr}/Kras^{G12D}*-Tiere eine gesteigerte Proliferation fest (Albury et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit resultierte der Funktionsverlust der PH-Domäne von PDK1 in einer Reduktion von aktiviertem AKT. Eine Restaktivität wurde im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{fl/K465E}*-Tumormausmodell mittels Immunoblotanalyse nachgewiesen. Eine Stromakontamination könnte für die Restaktivität von AKT in der Immunoblotanalyse ursächlich sein. Anders als die *Pdk1^{K465E/+}*-Mutante findet die Rekombination des geflochtenen *Pdk1*-Allels nur in pankreatischen Zellen und somit nicht im Stroma statt. Allerdings zeigten Bayascas et al., dass das von ihnen eingeführte *Pdk1^{K465E/+}*-Mausmodell die Phosphorylierung um einen Faktor zwei bis drei minderte, sie beobachteten eine Restaktivität von AKT in der Größenordnung um 30% (Bayascas et al., 2008). Unter Berücksichtigung der Bedeutung von AKT als tumorinduzierender Faktor könnte die restliche Aktivität in den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{fl/K465E}*-Tieren für das Auftreten von PanIN verantwortlich sein. Dafür würden auch die Ergebnisse von Eser et al. sprechen, die durch die Inaktivierung von PDK1 im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{fl/fl}*-Tumormausmodell eine restlose Unterdrückung von AKT erreichten. Dabei wiesen die Versuchstiere ein normales Pankreasgewebe auf, doch weder PanIN noch PDAC (Eser et al., 2013).

Die vollständige Inhibierung von AKT in pankreatischen Zellen erfolgte im *Pdk1^{fl/+}*-Modell bei einer Blockade von PH- und PIF-Domäne, im *Pdk1^{K465E/+}*-Modell bei einer ausschließlichen Blockade der PH-Domäne jedoch nicht. Folglich stellt sich die Frage, ob der Funktionsverlust der PIF-Bindungstasche zur vollständigen Unterdrückung von AKT gegebenenfalls notwendig ist. AKT wird an der Stelle Threonin 308 durch PK1 aktiviert. Wesentlicher Schritt dafür ist die Ko-Lokalisation mit PDK1 an der Plasmamembran, die durch die PH-Domäne ermöglicht wird (Alessi et al., 1997; Currie et al., 1999; Milburn et al., 2003). Zusätzlich stimuliert die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs von AKT an der Stelle Serin 473 durch mTORC2 die Phosphorylierung von AKT durch PDK1 und führt zu dessen vollständiger Aktivierung (Sarbasov, Guertin, Ali, & Sabatini, 2005).

Bei anderen AGC-Kinasen wie SGK, PKC oder RSK bewirkt die Phosphorylierung des hydrophoben Motives eine Interaktion mit der PIF-Bindungstasche von PDK1, die in einer Phosphorylierung der Kinase resultiert (Pearce, Komander, & Alessi, 2010). Bisher wurde davon ausgegangen, dass die PIF-Bindungstasche bei der Aktivierung von AKT keine Rolle spielt. Allerdings konnten Najafov et al. zeigen, dass die Phosphorylierung von AKT an der Stelle Threonin 308 in vivo ebenfalls durch die vorausgegangene Interaktion zwischen hydrophobem Motiv und PIF-Bindungstasche möglich ist. Die Autoren wiesen in einem ersten Schritt nach, dass in *Pdk1^{L155E/L155E}*-Stammzelllinien die Phosphorylierung von AKT an der Stelle Threonin 308 durch den ATP-kompetitiven PDK1-Inhibitor GSK2334470 deutlich stärker unterdrückt wurde als in Wildtyp-Stammzelllinien. Weiterhin zeigten sie, dass in *Pdk1^{K465E/K465E}*-Stammzelllinien durch die Expression von AKT[S473A], einer Funktionsverlustmutation an der Stelle Serin 473, die Phosphorylierung von Threonin 308

komplett verhindert wurde. Die alleinige Expression von AKT[S473A] in Wildtyp-Tieren resultierte dagegen in einer normalen Phosphorylierung von AKT an der Stelle Threonin 308. In einem weiteren experimentellen Schritt aktivierten sie in *Pdk1^{K465E/K465E}*-Stammzelllinien den PIF-Weg durch eine AKT[S373D]-Mutation dauerhaft, was zu einer AKT-Aktivierung trotz Blockade der PH-Domäne führte (Najafov, Shpiro, & Alessi, 2012).

Die Ergebnisse lassen sich so zusammenfassen, dass es zwei verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von AKT durch PDK1 gibt. Entweder wird AKT PH-abhängig oder nach Phosphorylierung durch mTORC2 über die Interaktion mit der PIF-Bindungstasche aktiviert. Die zweite Möglichkeit wird offensichtlich nur relevant, wenn wie im *Pdk1^{K465E/+}*-Modell die PH-Domäne blockiert ist. Es könnte sich daher um einen minder effizienten Reserveweg handeln um AKT zu aktivieren.

Um den PIF-abhängigen Signalweg weiter zu analysieren und gegebenenfalls therapeutisch zu beeinflussen, setzten Najafov et al. zusätzlich einen mTOR-Inhibitor ein, der die Phosphorylierung von Serin 473 blockierte. Auch dieser führte in den *Pdk1^{K465E/K465E}*-Stammzelllinien dazu, dass die Aktivierung von AKT vollständig ausblieb. Die Autoren werteten dies als einen weiteren Beleg für den oben diskutierten PIF-abhängigen Reserveweg (Najafov et al., 2012). Der mTOR-Inhibitor böte auch ein therapeutisches Potential, indem gezeigt werden konnte, dass der mTOR-Inhibitor die Effektivität des hochspezifischen ATP-kompetitiven PDK1-Inhibitor GSK2334470 verstärkte (Najafov, Sommer, Axten, Deyoung, & Alessi, 2011).

Die Ergebnisse und die Literatur sprechen dafür, dass die PIF-Bindungstasche auch zu einer Phosphorylierung von AKT führen kann. Dies würde die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Restaktivität von AKT und die damit einhergehende Entwicklung von PanIN in den Versuchstieren erklären.

5.2 Inaktivierung der PIF-Domäne von PDK1

Gemäß den obigen Ausführungen zur Bedeutung der PH-Domäne und von AKT in der Onkogenese wäre im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tumormausmodell eine dem *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell vergleichbare Penetranz an Vorläuferzellen und Ausbildung an Karzinomen zu erwarten gewesen. Jedoch zeigte sich, dass die Inaktivierung der PIF-Domäne in Versuchstieren verglichen mit *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tieren zu weniger PanIN und zu einer Blockade höhergradiger PanIN innerhalb eines Jahres führte. KRAS-induzierte Tumorgenese des PDAC wurde im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Modell nicht beobachtet. Wie kann man die Reduktion der Vorläuferzellen und die Blockade höhergradiger PanIN in den *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren mit seiner selektiven Blockade der PIF-Bindungstasche erklären? Tatsächlich war die AKT-Aktivierung im vorliegenden Mausmodell mit der im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Modell in der immunhistochemischen Analyse

vergleichbar. Die Ergebnisse des Western Blots zeigten allerdings eine Reduktion an phosphoryliertem AKT, die oben genannte Beobachtungen erklären könnte. Ferner ließ sich in der Immunoblotanalyse nachweisen, dass RSK2 in *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tieren pankreasspezifisch reduziert war. Die Kinase ist Teil des RAS/ERK/RSK2-Signalweges, über den onkogenes KRAS u.a. die Zellproliferation induziert (Dunne & Hezel, 2015; Pylayeva-Gupta et al., 2011). RSK2 spielt eine wichtige Rolle in Zellproliferation, Transformation und Apoptose (Cho et al., 2007; Yoo, Cho, & Cho, 2015). Aktiviertes RSK2 wirkt antiapoptotisch indem es die Fas induzierte Apoptose inhibiert (Peng et al., 2011). Eine Expression von *RSK2* zeigte sich in verschiedenen Tumorzelllinien und soliden Tumoren, so hatten Cho et al. auf die Bedeutung von RSK2 in der Onkogenese des Hautkrebses hingewiesen. In menschlichen Hautkrebsgeweben war aktiviertes RSK2 vorhanden und mehr als zweimal so häufig exprimiert, wie in normalem Hautgewebe (Cho, 2017; Cho et al., 2012). Cho et al. zeigten, dass RSK2 eine entscheidende Rolle in Tumor-Promotor induzierter Zelltransformation spielt. Sie wiesen nach, dass die Koexpression von konstitutiv aktiviertem *Ras^{G12V}* und RSK2 in NIH3T3-Zellen im Vergleich zur singulären Expression von *Ras^{G12V}* zu einer vermehrten Fokusbildung in zellbasierten Assay führte. Der Gen-Knockdown von RSK2 in NIH3T3-Zellen führte trotz Expression von *Ras^{G12V}* zu einer kompletten Blockade der Fokusbildung (Cho et al., 2007). Zusätzlich konnten Frodin et al. zeigen, dass die Phosphorylierung des hydrophoben Motivs an der Stelle Ser386 von RSK2 eine Bindungsstelle schuf, die PDK1 rekrutierte, das ferner RSK2 an der Stelle Ser277 vollständig stimulierte (Frodin, Jensen, Merienne, & Gammeltoft, 2000). Somit kann geschlussfolgert werden, dass das hydrophobe Motiv von RSK2 mit der PIF-Domäne von PDK1 interagiert und die beobachtete Verminderung von RSK2 erklärt.

Zusammenfassend ist von einer additiven Wirkung von RSK2 in der Onkogenese auszugehen, so dass seine Blockade im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tumormausmodell auch die nicht erwartete Reduktion des Auftretens von PanIN erklären könnte. Es wäre somit zu diskutieren, ob AKT auf die zusätzliche Wirkung von RSK2 angewiesen ist. Eser et al. hatten zwar die zentrale Bedeutung des ersten Weges belegt, dessen ungeachtet scheint es einen Crosstalk auch in KRAS-abhängigen Tumoren zwischen den Signalwegen, insbesondere zwischen MEK und AKT zu geben. So konnten unter anderen Chen et al. zeigen, dass die Inhibition von MEK zu einer kompensatorischen Aktivierung des PI3K-Weges in vivo führte. Interessanterweise zeigten Eser et al. in vitro, dass der RSK-spezifische Inhibitor BI-D1870 keinen Effekt auf die ADM Formation hatte. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Unterbrechung des PI3K/AKT-Signalweges und nicht die Unterbrechung des Raf/MEK/ERK-Signalweges für die Blockade der Tumorentstehung verantwortlich sei. Dieser offensichtliche Widerspruch zwischen der angenommenen Interaktion beider Signalwege bzw. der ausschließlichen Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges erklärt sich ggf. in den

unterschiedlichen Methoden. Eser et al. verwandten zur Untersuchung der Inhibitoren azinäre Zellen. Die vorliegende Arbeit hingegen untersuchte ein in vivo-Modell, dessen PIF-abhängige Signalwege blockiert waren. Diese wiederum haben einen Einfluss auf verschiedenste nachgeschaltete Kinasen, was Interaktionen zwischen Signalwegen wahrscheinlicher macht. Die obigen Ausführungen fokussierten auf den RSK2-Weg, jedoch kann die Beeinflussung weiterer Kinasen hinsichtlich der Karzinogenese nicht ausgeschlossen werden. Aufgeführt seien unter anderem SGK und PKC, deren Bedeutung für die Karzinogenese des PDAC bisher unklar ist.

In der Überlebenszeitanalyse ließ sich ein im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verkürztes mittleres Überleben der *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mäuse trotz fehlendem Nachweis von PDAC beobachten. Folglich kam eine KRAS-induzierte Tumorgenese des PDAC ursächlich nicht in Frage. Auffällig zeigte sich eine deutliche Atrophie des älteren Pankreasgewebes. Die verminderte Aktivierung von RSK2, das zellproliferativ und anti-apoptotisch wirkt, könnte dabei helfen, diese Beobachtung zu erklären. Eser et al. hatten in ihrer Studie zum PDK1-Knockout bereits eine Atrophie des Pankreasgewebes beschrieben. Die Zellen wiesen eine fettige Degeneration in älteren Tieren auf, was die Autoren als Hinweis auf onkogenen Stress durch KRAS werteten. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch eine Atrophie des Pankreasgewebes auch bei den Tieren des *Ptf1a^{Cre/+};Pdk1^{f/L155E}*-Modells, was die angenommene Bedeutung von RSK2 als mögliche Erklärung der Atrophie unterstreichen würde.

Die Ergebnisse der Mikrodissektion wiesen sowohl rekombinierte als auch nicht rekombinierte Anteile in den PanIN nach. Somit lag im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Mausmodell keine vollständige Blockade der PIF-Bindungstasche vor. Dies könnte die Ergebnisse des Immunoblots, die eine Reduktion der PIF-abhängigen Kinasen SGK und RSK2 im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{f/L155E}*-Tumormausmodell und keine komplette Inaktivierung zeigte und gesetzt den Fall, dass RSK2 mitentscheidend für die Tumorneogenese des PDAC ist, das Auftreten der PanIN erklären. Bayascas et al. hatten eine herzmuskelspezifische Cre-Rekombinase genutzt und damit eine 100%ige Rekombination erreicht, in der vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine pankreasspezifische Rekombinase genutzt (Bayascas et al., 2006). Es könnte somit sein, dass die pankreasspezifische Cre-Rekombinase das *Pdk1^{L155E/+}*-Allel nicht zu 100% rekombinierte. Des Weiteren kann eine Verunreinigung in der Mikrodissektion durch eine Stromakontamination nicht ausgeschlossen werden, beim Laserschnitt der Zellen könnten trotz größter Sorgfalt nicht dazugehörige Zellkerne die Probe verunreinigen. Es erfolgte eine spezifische Rekombinations-PCR als Touchdown mit über 60 Zyklen, so dass auch einzelne Zellkerne eine signifikante Bande generieren können. 60 Zyklen sind jedoch empfohlen, da in der Ausgangsprobe Zellkerne zum Teil nur angeschnitten sind und somit wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung stand.

5.3 Ausblick

Wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die selektive Blockade des PIF-unabhängigen AKT-Signalweges trotz onkogenem KRAS ein Überleben äquivalent zu Wildtyp-Tieren ermöglicht, innerhalb des ersten Lebensjahres eine Blockade höhergradiger PanIN bei Auftreten von niedriggradigen PanIN bewirkt und die KRAS-induzierte Entstehung von PDAC in bisher untersuchten Tieren *in vivo* verhindert. Im Gegensatz zur kompletten Inaktivierung von PDK1 im endogenen Pankreaskarzinommodell, bei der es zu einer vollständigen Unterdrückung von PanIN kommt, hemmt die Blockade des PI3K/AKT-Signalweges im *Kras^{G12D}*-abhängigen Modell die Entstehung niedriggradiger PanIN nicht. Diese Differenz ist auffällig und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Blockade des PI3K/AKT-Signalweges in Bezug auf die Karzinogenese des PDAC. Die Ergebnisse im *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pdk1^{fl/155E}*-Tumormausmodell deuten zum einen auf die Relevanz des PIF-abhängigen Weges in der Karzinogenese hin, zum anderen weisen sie auf einen Einfluss der PIF-abhängigen Signalkaskaden hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Ferner lenken sie die Aufmerksamkeit auf RSK2, einen Teil des RAF/MEK/ERK-Signalweges. RSK2 wurde in anderen Tumorentitäten bereits als onkogener Treiber etabliert und ist in mehreren KRAS-vermittelten Tumorentitäten überexprimiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit empfehlen, den Ansatz der alleinigen respektive der zusätzlichen Blockade von RSK2 *in vivo* weiter zu verfolgen. Interessant ist hierbei auch die Frage einer gegenseitigen Beeinflussung von RAF/MEK/ERK- und PI3K/AKT-Signalwegen. In dieser Arbeit wurde anhand beider Tumormausmodelle die *Kras*-induzierte Karzinogenese des PDAC untersucht. Eine Aussage darüber, inwieweit die regulatorischen Untereinheiten von PDK1 ein mögliches Angriffsziel für die Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen, konnte anhand der Arbeit nicht getroffen werden. Durch ein induzierbares duales Rekombinationsmodell für pankreatische duktales Adenokarzinome könnten in weiteren Schritten potenzielle Zielstrukturen für molekulare Therapieansätze *in vivo* getestet werden. Hierzu bietet sich das von *Pdx1^{Flp/+};FSF-Kras^{G12D/+}*-Mausmodell an (Schonhuber et al., 2014). In diesem Mausmodell wurden die Flp/frt und Cre/loxP Rekombinationssysteme kombiniert, um in verschiedenen Kompartimenten des Pankreas sequenziell Gene an- oder abzuschalten. Um eine spezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase zu ermöglichen, wurden zwei Mauslinien generiert, die ein Tamoxifen-induzierbares CreERT2-Fusionsprotein unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten CAG-Promotors oder des Proliferationsmarkers Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) exprimieren. Die PanIN und PDAC Entstehung in *Pdx1^{Flp/+};FSF-Kras^{G12D/+}*-Tieren ist vergleichbar mit der im etablierten *Pdx1^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-Tumormausmodell (Schonhuber et al., 2014). Weiterhin könnte das Modell dafür benutzt werden, die Beteiligung der Mikroumgebung des Tumors an der Initiierung und Unterhaltung des PDAC zu analysieren. Das Stroma unterstützt das Tumorstromawachstum. Es wird ferner mit der Entwicklung von

Diskussion

Medikamentenresistenzen in Verbindung gebracht und ist daher für die Entwicklung neuer Therapieansätze von enormer Relevanz (Kraman et al., 2010; Perez-Mancera, Guerra, Barbacid, & Tuveson, 2012; Provenzano et al., 2012). Folglich ist es wichtig die Rolle der unterschiedlichen Stromakompartimente zu unterscheiden. Mit der Hilfe unterschiedlicher Cre-Rekombinasen wäre es möglich auf Fibroblasten, Sternzellen, Mastzellen, Immunzellen oder andere Zellen zu zielen und diese hinsichtlich ihrer Rolle in genetisch veränderten Modellen zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit einer 5-Jahresüberlebensrate unter 10% eines der aggressivsten und tödlichsten Krebserkrankungen. Die Mutation von onkogenem KRAS spielt in der Genese des duktales Adenokarzinoms eine entscheidende Rolle. Es initiiert die Karzinogenese über verschiedene Signalkaskaden einschließlich des PI3K/AKT-Signalweges. Der Verlust der 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (PDK1) blockiert die Entwicklung von Vorläuferläsionen und PDAC in einem pankreatischen Tumormausmodell vollständig.

PDK1 besitzt zwei regulatorische Untereinheiten, die PH-Domäne, die AKT aktiviert, und die PIF-Bindungstasche, die SGK, PKC und RSK reguliert. Mit der Hilfe von zwei verschiedenen *Pdk1*-Mutationen, *Pdk1^{K465E}* und *Pdk1^{L155E}*, wurde die Funktion jeder der beiden Untereinheiten selektiv blockiert. Beide Allele wurden in das genetisch hergestellte, endogene *Ptf1a^{Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}*-pankreatische Tumormausmodell gekreuzt. Die Tiere entwickelten sich normal und zeigten innerhalb des ersten Jahres keine phänotypischen Auffälligkeiten.

Western Blot und Immunhistochemie zeigten eine verminderte Aktivierung der PDK1-abhängigen Kinasen in den jeweiligen Mausmodellen an. Im *Pdk1^{K465E}*-Modell wurde AKT und im *Pdk1^{L155E}*-Modell wurden SGK und RSK2 vermindert phosphoryliert. Die Rekombination der mutierten *Pdk1*-Allele im Pankreas konnte mittels spezifischer PCR nachgewiesen werden.

Trotz Expression von onkogenem *Kras* verhinderte die Inaktivierung der PH-Domäne die Entwicklung von PDAC in bisher untersuchten Tieren in vivo, das mittlere Überleben entsprach Wildtyptieren. Die Tiere wiesen ausnahmslos präneoplastische Läsionen, es handelte sich um pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), auf. PanIN traten im Vergleich zu Tumormäusen im *Pdk1^{K465E}*-Modell signifikant geringer auf, zudem konnte eine Blockade höhergradiger PanIN beobachtet werden.

Die Inaktivierung der PIF-Bindungstasche führte im *Pdk1^{L155E}*-Modell zu einer herabgesetzten Überlebenszeit. Die untersuchten Tiere entwickelten trotz Expression von onkogenem *Kras* kein PDAC, präneoplastische Läsionen traten hingegen auf. Als mögliche Ursache für das kurze Überleben ist eine beobachtete Pankreasatrophie weiter zu erforschen.

Die Ergebnisse der Arbeit bestätigen die zentrale Rolle von PDK1 und implizieren, dass der PI3K/AKT-Signalweg wesentlich an der *Kras*-induzierten Tumorgenese im Pankreas beteiligt ist. Weitere Erkenntnis der Arbeit ist die Bedeutung der PIF-Bindungstasche von PDK1 und ihrer Signalkaskaden hinsichtlich Gesamtüberleben.

7. Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is nearly uniformly fatal despite maximal treatment, with less than 10% of patients surviving 5 years. In pancreatic ductal adenocarcinoma, the mutation of the oncogene KRAS plays a decisive role. It initiates carcinogenesis via different signalling cascades including the PI3K/AKT-pathway. The deletion of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) entirely blocks the formation of precursor lesions and PDAC in a pancreatic cancer mouse model.

PDK1 has two regulatory domains, namely the PH-domain activating AKT and the PIF-binding pocket regulating SGK, PKC and RSK. Using two different *Pdk1* mutant alleles, *Pdk1*^{K465E} and *Pdk1*^{L155E}, the activation of each domain was blocked particularly. We crossed these alleles into the genetically engineered endogenous *Ptf1a*^{Cre/+};*LSL-Kras*^{G12D/+}-pancreatic cancer model. Animals developed normally and showed no phenotypic abnormality within one year.

Western blot and immunohistochemistry indicated a downregulation of targets of PDK1 in the respective knock-in mice. *Pdk1*^{K465E}-model showed reduction of AKT and *Pdk1*^{L155E}-model showed reduction of SGK and RSK2. Recombination of the mutant *Pdk1* alleles in the pancreas was shown by specific PCR.

So far, inactivation of PH-domain, despite expression of oncogenic *Kras*, blocked pancreatic cancer development in analysed animals in vivo, the median survival was equivalent to wildtype animals. The animals presented without exception preneoplastic lesions, so-called pancreatic intraepithelial lesions (PanIN). PanIN occurred significantly less in the *Pdk1*^{K465E}-model in comparison to tumour mice, further a blockade of high-grade PanIN was observed.

Inactivation of the PIF-binding pocket in *Pdk1*^{L155E}-mutant animals resulted in decreased survival time. Analysed animals did not develop KRAS-driven carcinogenesis of PDAC, however, precursor lesions occurred. As a cause of decreased median survival is the noticed pancreatic atrophy further to explore.

These results support the pivotal of PDK1 and imply that the PI3K/AKT-signalling pathway is essentially involved in pancreatic tumorigenesis. Further, the blockade of PIF-dependent signalling pathways seems to affect overall survival.

8. Quellen

- Adamska, A., Domenichini, A., & Falasca, M. (2017). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci*, *18*(7). doi:10.3390/ijms18071338
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D. K., Langer, P., Chiblak, S., Durr, A., Hofler, H., Kloppel, G., Muller-Decker, K., Brielmeier, M., & Esposito, I. (2012). Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, *226*(5), 723-734. doi:10.1002/path.3017
- Albury, T. M., Pandey, V., Gitto, S. B., Dominguez, L., Spinel, L. P., Talarchek, J., Klein-Szanto, A. J., Testa, J. R., & Altomare, D. A. (2015). Constitutively active Akt1 cooperates with KRas(G12D) to accelerate in vivo pancreatic tumor onset and progression. *Neoplasia*, *17*(2), 175-182. doi:10.1016/j.neo.2014.12.006
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, *7*(4), 261-269.
- Altomare, D. A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A. J., Tanno, S., Skele, K. L., Hoffman, J. P., & Testa, J. R. (2002). Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*, *87*(4), 470-476.
- Bayascas, J. R., Sakamoto, K., Armit, L., Arthur, J. S., & Alessi, D. R. (2006). Evaluation of approaches to generation of tissue-specific knock-in mice. *J Biol Chem*, *281*(39), 28772-28781. doi:10.1074/jbc.M606789200
- Bayascas, J. R., Wullschleger, S., Sakamoto, K., Garcia-Martinez, J. M., Clacher, C., Komander, D., van Aalten, D. M., Boini, K. M., Lang, F., Lipina, C., Logie, L., Sutherland, C., Chudek, J. A., van Diepen, J. A., Voshol, P. J., Lucocq, J. M., & Alessi, D. R. (2008). Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol Cell Biol*, *28*(10), 3258-3272. doi:10.1128/MCB.02032-07
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*, *20*(32), 11182-11198. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11182
- Berg, M., & Soreide, K. (2012). EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med*, *14*(76), 207-214.
- Berrington de Gonzalez, A., Sweetland, S., & Spencer, E. (2003). A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *89*(3), 519-523. doi:10.1038/sj.bjc.6601140
- Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., & Alessi, D. R. (2000). Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J*, *19*(5), 979-988. doi:10.1093/emboj/19.5.979
- Brugge, W. R., Lauwers, G. Y., Sahani, D., Fernandez-del Castillo, C., & Warshaw, A. L. (2004). Cystic neoplasms of the pancreas. *N Engl J Med*, *351*(12), 1218-1226. doi:10.1056/NEJMra031623
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., & Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, *15*(6), 2403-2413.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, *296*(5573), 1655-1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655
- Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K., & Testa, J. R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(8), 3636-3641.
- Cho, Y. Y. (2017). RSK2 and its binding partners in cell proliferation, transformation and cancer development. *Arch Pharm Res*, *40*(3), 291-303. doi:10.1007/s12272-016-0880-z
- Cho, Y. Y., Lee, M. H., Lee, C. J., Yao, K., Lee, H. S., Bode, A. M., & Dong, Z. (2012). RSK2 as a key regulator in human skin cancer. *Carcinogenesis*, *33*(12), 2529-2537. doi:10.1093/carcin/bgs271

Quellen

- Cho, Y. Y., Yao, K., Kim, H. G., Kang, B. S., Zheng, D., Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. *Cancer Res*, *67*(17), 8104-8112. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4668
- Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galban, S., Galban, C. J., Rakshit, S., Flannagan, K. S., Adsay, N. V., & Pasca di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest*, *122*(2), 639-653. doi:10.1172/JCI59227
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U., & Intergroup, P. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, *364*(19), 1817-1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923
- Currie, R. A., Walker, K. S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C. P., Cohen, P., Alessi, D. R., & Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J*, *337* (Pt 3), 575-583.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., Funakoshi, A., Wakasugi, H., Asano, T., Hishinuma, S., Ogata, Y., Sunamura, M., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Takao, S., Aikou, T., Hirata, K., Maguchi, H., Aiura, K., Aoki, T., Kakita, A., Sasaki, M., Ozaki, M., Matsusue, S., Higashide, S., Noda, H., Ikeda, S., Maetani, S., Yoshida, S., & Japan Pancreatic Cancer Study, G. (2008). Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today*, *38*(11), 1021-1028. doi:10.1007/s00595-007-3745-8
- Dunne, R. F., & Hezel, A. F. (2015). Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, *29*(4), 595-608. doi:10.1016/j.hoc.2015.04.003
- Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., Michalski, C. W., Schlitter, A. M., Esposito, I., Kind, A. J., Rad, L., Schnieke, A. E., Baccarini, M., Alessi, D. R., Rad, R., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2013). Selective requirement of PI3K/PDK1 signaling for Kras oncogene-driven pancreatic cell plasticity and cancer. *Cancer Cell*, *23*(3), 406-420. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.023
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Kloppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*, *20*(38), 13833-13841. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13833
- Fang, B. (2015). RAS signaling and anti-RAS therapy: lessons learned from genetically engineered mouse models, human cancer cells, and patient-related studies. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. doi:10.1093/abbs/gmv090
- Frodin, M., Jensen, C. J., Merienne, K., & Gammeltoft, S. (2000). A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J*, *19*(12), 2924-2934. doi:10.1093/emboj/19.12.2924
- Gall, T. M., Tsakok, M., Wasan, H., & Jiao, L. R. (2015). Pancreatic cancer: current management and treatment strategies. *Postgrad Med J*, *91*(1080), 601-607. doi:10.1136/postgradmedj-2014-133222
- Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., English, D. R., Freudenheim, J. L., Fuchs, C. S., Giles, G. G., Giovannucci, E., Hankinson, S. E., Horn-Ross, P. L., Leitzmann, M., Mannisto, S., Marshall, J. R., McCullough, M. L., Miller, A. B., Reding, D. J., Robien, K., Rohan, T. E., Schatzkin, A., Stevens, V. L., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Verhage, B. A., Wolk, A., Ziegler, R. G., & Smith-Warner, S. A. (2009). Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(3), 765-776. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0880
- Goldstein, D., El-Maraghi, R. H., Hammel, P., Heinemann, V., Kunzmann, V., Sastre, J., Scheithauer, W., Siena, S., Tabernero, J., Teixeira, L., Tortora, G., Van Laethem, J. L., Young, R., Penenberg, D. N., Lu, B., Romano, A., & Von Hoff, D. D. (2015). nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic

Quellen

- pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst*, 107(2). doi:10.1093/jnci/dju413
- Goodman, M. D., & Saif, M. W. (2014). Adjuvant therapy for pancreatic cancer. *JOP*, 15(2), 87-90. doi:10.6092/1590-8577/2324
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10), 1218-1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450. doi:10.1016/s1535-6108(03)00309-x
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., & Offerhaus, G. J. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, 25(5), 579-586.
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 6(8), 2969-2972.
- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., & Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 28(8), 977-987.
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de Gonzalez, A., Barzi, F., & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*, 92(11), 2076-2083. doi:10.1038/sj.bjc.6602619
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*, 393(4), 535-545. doi:10.1007/s00423-007-0266-2
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., & Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*, 15(24), 3243-3248. doi:10.1101/gad.943001
- 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., & Hidalgo, M. (2008). Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 68(8), 2841-2849. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5200
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R. H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., & Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730-733 e739. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.042
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*, 32(1), 128-134. doi:10.1038/ng959
- Kennedy, A. L., Morton, J. P., Manoharan, I., Nelson, D. M., Jamieson, N. B., Pawlikowski, J. S., McBryan, T., Doyle, B., McKay, C., Oien, K. A., Enders, G. H., Zhang, R., Sansom, O. J., & Adams, P. D. (2011). Activation of the PIK3CA/AKT pathway suppresses senescence induced by an activated RAS oncogene to promote tumorigenesis. *Mol Cell*, 42(1), 36-49. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.020
- Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., Gopinathan, A., Tuveson, D. A., & Fearon, D. T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science*, 330(6005), 827-830. doi:10.1126/science.1195300

Quellen

- Larsson, S. C., Permert, J., Hakansson, N., Naslund, I., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*, *93*(11), 1310-1315. doi:10.1038/sj.bjc.6602868
- Lawlor, M. A., & Alessi, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*, *114*(Pt 16), 2903-2910.
- Lawlor, M. A., Mora, A., Ashby, P. R., Williams, M. R., Murray-Tait, V., Malone, L., Prescott, A. R., Lucocq, J. M., & Alessi, D. R. (2002). Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J*, *21*(14), 3728-3738. doi:10.1093/emboj/cdf387
- McManus, E. J., Collins, B. J., Ashby, P. R., Prescott, A. R., Murray-Tait, V., Armit, L. J., Arthur, J. S., & Alessi, D. R. (2004). The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P₃ binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *EMBO J*, *23*(10), 2071-2082. doi:10.1038/sj.emboj.7600218
- Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M., Price, N. C., Alessi, D. R., & Van Aalten, D. M. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J*, *375*(Pt 3), 531-538. doi:10.1042/BJ20031229
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W., & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, *25*(15), 1960-1966. doi:10.1200/JCO.2006.07.9525
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*, *15*(2), 161-170.
- Morris, J. P. t., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*, *10*(10), 683-695. doi:10.1038/nrc2899
- Najafov, A., Shpiro, N., & Alessi, D. R. (2012). Akt is efficiently activated by PIF-pocket- and PtdIns(3,4,5)P₃-dependent mechanisms leading to resistance to PDK1 inhibitors. *Biochem J*, *448*(2), 285-295. doi:10.1042/BJ20121287
- Najafov, A., Sommer, E. M., Axten, J. M., Deyoung, M. P., & Alessi, D. R. (2011). Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochem J*, *433*(2), 357-369. doi:10.1042/BJ20101732
- Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G. I., & Schmid, R. M. (2007). Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development*, *134*(6), 1151-1160. doi:10.1242/dev.02781
- Neoptolemos, J. P., Moore, M. J., Cox, T. F., Valle, J. W., Palmer, D. H., McDonald, A. C., Carter, R., Tebbutt, N. C., Dervenis, C., Smith, D., Glimelius, B., Charnley, R. M., Lacaine, F., Scarfe, A. G., Middleton, M. R., Anthoney, A., Ghaneh, P., Halloran, C. M., Lerch, M. M., Olah, A., Rawcliffe, C. L., Verbeke, C. S., Campbell, F., Buchler, M. W., & European Study Group for Pancreatic, C. (2012). Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected periampullary adenocarcinoma: the ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial. *JAMA*, *308*(2), 147-156. doi:10.1001/jama.2012.7352
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zulke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Sinn, M., Hinke, A., & Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*, *310*(14), 1473-1481. doi:10.1001/jama.2013.279201
- Pearce, L. R., Komander, D., & Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(1), 9-22. doi:10.1038/nrm2822
- Peng, C., Cho, Y. Y., Zhu, F., Zhang, J., Wen, W., Xu, Y., Yao, K., Ma, W. Y., Bode, A. M., & Dong, Z. (2011). Phosphorylation of caspase-8 (Thr-263) by ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) mediates caspase-8 ubiquitination and stability. *J Biol Chem*, *286*(9), 6946-6954. doi:10.1074/jbc.M110.172338

Quellen

- Perez-Mancera, P. A., Guerra, C., Barbacid, M., & Tuveson, D. A. (2012). What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology*, *142*(5), 1079-1092. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.002
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, *21*(3), 418-429. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, *11*(11), 761-774. doi:10.1038/nrc3106
- Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *24*(3), 349-358. doi:10.1016/j.bpg.2010.02.007
- Reichert, M., Saur, D., Hamacher, R., Schmid, R. M., & Schneider, G. (2007). Phosphoinositide-3-kinase signaling controls S-phase kinase-associated protein 2 transcription via E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Res*, *67*(9), 4149-4156. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4484
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101. doi:10.1126/science.1106148
- Schneider, G., Siveke, J. T., Eckel, F., & Schmid, R. M. (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, *128*(6), 1606-1625.
- Schonhuber, N., Seidler, B., Schuck, K., Veltkamp, C., Schachtler, C., Zukowska, M., Eser, S., Feyerabend, T. B., Paul, M. C., Eser, P., Klein, S., Lowy, A. M., Banerjee, R., Yang, F., Lee, C. L., Moding, E. J., Kirsch, D. G., Scheideler, A., Alessi, D. R., Varela, I., Bradley, A., Kind, A., Schnieke, A. E., Rodewald, H. R., Rad, R., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2014). A next-generation dual-recombinase system for time- and host-specific targeting of pancreatic cancer. *Nat Med*, *20*(11), 1340-1347. doi:10.1038/nm.3646
- Shi, C., Hruban, R. H., & Klein, A. P. (2009). Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*, *133*(3), 365-374. doi:10.1043/1543-2165-133.3.365
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, *65*(1), 5-29. doi:10.3322/caac.21254
- Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *25*(18), 2607-2615. doi:10.1200/JCO.2006.09.2551
- Tokunaga, E., Oki, E., Egashira, A., Sadanaga, N., Morita, M., Kakeji, Y., & Maehara, Y. (2008). Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, *8*(1), 27-36.
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Taberner, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J., & Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, *369*(18), 1691-1703. doi:10.1056/NEJMoa1304369
- Ying, H., Elpek, K. G., Vinjamoori, A., Zimmerman, S. M., Chu, G. C., Yan, H., Fletcher-Sananikone, E., Zhang, H., Liu, Y., Wang, W., Ren, X., Zheng, H., Kimmelman, A. C., Paik, J. H., Lim, C., Perry, S. R., Jiang, S., Malinn, B., Protopopov, A., Colla, S., Xiao, Y., Hezel, A. F., Bardeesy, N., Turley, S. J., Wang, Y. A., Chin, L., Thayer, S. P., & DePinho, R. A. (2011). PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF-kappaB-cytokine network. *Cancer Discov*, *1*(2), 158-169. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0031
- Yoo, S. M., Cho, S. J., & Cho, Y. Y. (2015). Molecular Targeting of ERKs/RSK2 Signaling Axis in Cancer Prevention. *J Cancer Prev*, *20*(3), 165-171. doi:10.15430/JCP.2015.20.3.165

9. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. med. Roland M. Schmid, Direktor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der TU München, für die Möglichkeit in seiner Abteilung grundlagenwissenschaftlich forschen zu dürfen.

Insbesondere bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Dieter Saur für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung der Dissertation. Seine herausragende Expertise sowie seine fortwährende Unterstützung haben einen enormen Beitrag zur Arbeit geleistet und begeisterten mich für das Thema.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Nina Schönhuber für die Einarbeitung, Hilfestellung in jeglicher Hinsicht und die konstruktive Kritik. Sie stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und hat damit wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dieter Saur, insbesondere Barbara Seidler, Juliana Götzfried und Kathleen Schuck, für ihre Mithilfe und die großartige Arbeitsatmosphäre im Labor.

Abschließend danke ich meiner Familie, die mich mit großem Interesse und Engagement während meiner Dissertation begleitet hat.