

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

**Die Rolle von NF κ B/RelA in der Onkogenese des
Pankreaskarzinoms – genetisch basierte *in vivo*-Studien**

Gelia Kolb

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. H. Algül
2. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 29.01.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013
angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

I. EINLEITUNG1

1. Das Pankreaskarzinom1

 1.1 Epidemiologie und Ätiologie1

 1.2 Diagnostik und Therapie2

2. Molekularbiologie und Molekulargenetik des Pankreaskarzinoms3

 2.1 Pathophysiologische Aspekte des Pankreaskarzinoms.....3

 2.2 Vorläuferläsionen: PanIN-Progression.....5

3. Mausmodelle.....7

 3.1 Überexpression von Proteinen in Mauslinien: Das Transgen-Technologie-System....7

 3.2 Konditionaler Knockout in Mauslinien: Das Cre-loxP-System9

4. Der IKK/ IκB/ NFκB- Signalweg11

 4.1 Transkriptionsfaktor NFκB12

5. Zielsetzung der Arbeit.....15

II. MATERIAL UND METHODEN17

1 Material.....17

 1.1 Chemikalien17

 1.2 Kommerziell erhältliche Kits19

 1.3 Verbrauchsmaterial.....19

 1.4 Puffer und Lösungen20

 1.5 Geräte.....23

 1.6 Software25

2. Methoden.....25

 2.1 Versuchstiere25

 2.1.1 Herkunft.....25

 2.1.2 Haltung26

 2.1.3 Behandlung mit BrdU26

 2.1.4 Gewebeentnahme26

 2.2 Zellkultur27

 2.2.1 Kulturbedingungen.....27

 2.2.2 Isolation von Tumorzellen aus Gewebe27

 2.2.3 Zellkultivierung und Zellpassage.....28

 2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....28

 2.2.5 Isolation von DNA aus Zelllinien29

 2.2.6 Isolation von nukleären Extrakten29

 2.2.7 Isolation von Proteinen aus Zelllinien.....30

 2.2.8 Immunfluoreszenz.....30

 2.2.8.1 Antikörper.....31

2.3 Immunhistochemie	31
2.3.1 Fixierung.....	31
2.3.2 Entwässerung von Gewebe.....	31
2.3.3 Anfertigung von Paraffingewebeschnitten	31
2.3.4 H&E-Färbung	32
2.3.5 Immunhistochemische Färbungen	32
2.3.5.1 Antikörper.....	34
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.4.1 Isolation von DNA aus Mausschwänzen.....	34
2.4.2 Isolation von DNA aus Pankreasgewebe	34
2.4.3 PCR	35
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.4.4.1 Primer	36
2.5 Proteinbiochemische Methoden	37
2.5.1 Proteinlysate.....	37
2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	37
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.5.4 Westernblot-Analyse	39
2.5.4.1 Wiederverwendung von Membranen	40
2.5.4.2 Antikörper.....	40
2.6 Angaben zur Statistik	41
III. ERGEBNISSE	42
1. Pankreasspezifische Inaktivierung des NFκB-Signalweges in der Maus.....	42
1.1 Generierung einer pankreasspezifisch <i>Rela</i>-defizienten Mauslinie unter Anwendung des <i>Cre-loxP</i>-Systems.....	42
1.2 Proteinbiochemischer Nachweis fehlender RelA/p65-Expression im TPa-Modell ...	47
1.3 Nachweis der fehlenden nukleären Translokation von RelA/p65 im TPa-Modell....	48
2. TPa-Mäuse zeigen ein signifikant längeres Überleben	49
3. Proteinbiochemische und morphologische Analysen zur Zellzyklusregulation und Apoptose <i>in vivo</i> vier Wochen alter Mäuse	50
3.1 TPa-Mäuse zeigen signifikant geringere Proliferation.....	50
3.2 TPa-Mäuse zeigen zum Zeitpunkt vier Wochen keine signifikant erhöhte Apoptoserate	54
4. Morphologische Charakterisierung von <i>Rela</i>-defizienten Mäusen <i>in vivo</i>.....	57
5. Proteinbiochemische und morphologische <i>in vitro</i>-Charakterisierung von Tumorzellen	60
5.1 <i>In vitro</i> zeigen TPa-Tumorzellen einen epithelialen Phänotyp	61
5.2 Nachweis fehlender nukleärer Translokation und Expression von RelA/p65 <i>in vitro</i> im TPa-Modell.....	61
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	63
IV. DISKUSSION	64
1. Das murine TP-Pankreaskarzinommodell rekapituliert die genetischen und morphologischen Veränderungen des humanen Pankreaskarzinoms.....	64

2. NFκB fördert die Pankreaskarzinogenese.....	67
2.1 NFκB fördert Proliferation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> im TP-Modell des Pankreas-	
karzinoms.....	70
2.2 NFκB beeinflusst die Apoptose in späteren Stadien der Pankreaskarzinom-	
entwicklung.....	73
3. NFκB fördert die Metastasierung und epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	
im Pankreaskarzinom	76
4. Ausblick - NFκB als Target in der Therapie des PDAC?	80
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	81
VI. LITERATURVERZEICHNIS	83
VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	99
VIII. TABELLENVERZEICHNIS	100
IX. DANKSAGUNG	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
APS	Ammoniumpersulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-x _L	B-cell lymphoma-extra large
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRCA#	Breast cancer gene #
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CBP	CREB binding protein
CDK	Cyclin dependent kinase
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CK-19	Cytokeratin-19
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Cre	Cyclization recombination
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DAC	Ductal adenocarcinoma
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
dTTP	Deoxy-Thymidin-Triphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
Ela	Elastase
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ES	Embryonale Stammzellen
F	Flox
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAMMM	Familial atypical mole-malignant melanome
FCS	Fetal Calf Serum
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme
FLIP	FLICE inhibitory protein
G	Gauge
g	Gramm
Hdm2	Human double minute 2 homolog
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Her2neu	Human epidermal growth factor receptor-2
H&E	Hämatoxylin-Eosin
hGH	Human growth hormone
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
IκB	Inhibitor of NFκB

IKK	IκB-Kinase
IL-#	Interleukin #
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
IVC	Individually ventilated cage
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LOH	Loss of heterozygosity
loxP	Locus of x-over P1
LSL	Lox-stop-lox
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mM	Millimolar
MMP-#	Matrix Metalloproteinase #
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLB	Mg ²⁺ Lysis/Wash Buffer
NFκB	Nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
OTI	Oval Trypsin Inhibitor
p	Phospho
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	Platlet derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol myristat acetat
Ptf1	Pankreastranskriptionsfaktor-1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RHD	Rel homology domain
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SCA	Seröses Zystadenom
SDS	sodium dodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfat-Polyacrylgelelektrophorese
sec	Sekunden
S-Phase	Synthese-Phase
Std.	Stunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TGF-α	Transforming growth factor alpha
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
Trp53	Transformation related protein 53

TRAF#	TNF-receptor associated factor #
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
uPA	Urokinase-ähnlicher Plasminogenaktivator
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular epidermal growth factor
W	Watt
z.B.	Zum Beispiel
ZEB#	Zinc finger E-box-binding homeobox #
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

I. EINLEITUNG

1. Das Pankreaskarzinom

1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer Prävalenz von 0,01% stellt das Pankreaskarzinom nach Lungen-, Prostata- und Darmkrebs als vierthäufigste Krebstodesursache eines der aggressivsten und bösartigsten Malignome des Menschen dar [78]. Allein im Jahre 2010 erkrankten 43.140 Menschen in den USA, von welchen 36.800 verstarben [78]. In Deutschland waren im Jahre 2008 7.390 Männer und 7.570 Frauen von dieser Krankheit betroffen [136]. Trotz jahrzehntelanger Forschung und Entwicklung verschiedener Therapiestrategien, ist es bisher nicht gelungen, die fatale Prognose zu verbessern. Seit 1980 verzeichnen die Erkrankungs- und Sterberaten sogar eine geringfügige, aber stetige Zunahme in allen Altersgruppen bei einer Inzidenz von 10-13 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und Jahr [136].

Aufgrund fehlender Frühsymptomatik ist die Krankheit bei Diagnosestellung meist schon so weit fortgeschritten, dass nur noch eine palliative Behandlung in Frage kommt. Die meisten Patienten haben dann nur noch wenige Monate zu leben, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern nur 8%, bei Frauen 7% [136]. Selbst bei frühzeitiger Diagnose sind die Heilungschancen gering.

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist noch unzureichend geklärt, jedoch sind aus vielen Studien etablierte Risikofaktoren, die mit dem Pankreaskarzinom assoziiert sind, bekannt. Dazu gehören demographische Faktoren wie Alter - das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen der 6. und 8. Lebensdekade -, Geschlecht - Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen - und Ethnischem Ursprung, dabei ist die Mortalität in der schwarzen Bevölkerung am höchsten. Insgesamt kann damit gerechnet werden, dass bei der heutigen demographischen Entwicklung mit steigender Lebenserwartung die Zahl der Pankreaskarzinome zunehmen wird. Auch Umweltfaktoren und Lebensstil spielen eine Rolle: Nikotinkonsum konnte einheitlich als Risikofaktor deklariert werden und verursacht etwa 25% der Pankreaskarzinome [54, 74, 99]. Erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht auch bei Patienten mit Vorerkrankungen wie langjähriger chronischer Pankreatitis [109] und Diabetes mellitus Typ II [73]. Für Alkoholkonsum ist keine direkte Assoziation bekannt und Adipositas scheint nur schwach mit dem Pankreaskarzinom assoziiert zu sein [135]. Die

Wirkung von Faktoren wie einer Ernährung reich an tierischen Fetten und arm an Obst und Gemüse ist nicht eindeutig gesichert [1].

Erhöhte Inzidenz geht auch mit positiver Familienanamnese sowie einigen genetischen Syndromen mit autosomal dominant vererbten Keimbahnmutationen bestimmter Gene einher. Zu diesen Tumorprädispositionssyndromen zählen unter anderem die hereditäre Pankreatitis [110], das Peutz-Jeghers-Syndrom, hereditärer Brustkrebs, das familiäre atypische Nävus und Melanom-Syndrom (FAMMM), das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und das Li-Fraumeni-Syndrom [131]. Für den Großteil der familiären Dispositionen ist die genetische Basis des gehäufteten Auftretens maligner Pankreasneoplasien jedoch unklar.

1.2 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose Pankreaskarzinom ist meist mit einer fatalen Prognose und einer Lebenserwartung von nur wenigen Monaten verbunden. Dies liegt zum einen an der frühen lymphogenen, perineuralen und hämatogenen Metastasierung aufgrund fehlender Kapsel des Organs, zum anderen an der Resistenz gegen Strahlentherapie und den meisten Chemotherapeutika. Klinische Symptome treten spät auf, meist erst, wenn umliegende Strukturen wie Magen, Leber oder Kolon durch Invasion oder Tumorwachstum in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Auch Fernmetastasen in Leber (80%), Lunge (50-60%), Peritoneum (20-30%) und Nebennieren (20%) können für Erstsymptome verantwortlich sein [101, 104]. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 28,4% schon einen lokal fortgeschrittenen Tumor auf, bei 54,2% hat der Tumor bereits Metastasen gesetzt [8].

Die Therapiemöglichkeiten wie Strahlentherapie, Chemotherapie, Chirurgie oder Kombinationen dieser haben heute, trotz jahrzehntelanger Forschung, noch immer wenig Einfluss auf den Verlauf dieses aggressiven Malignoms. Generell stellt derzeit die chirurgische Resektion die einzig kurative Therapieoption des Pankreaskarzinoms dar, jedoch sind nur 10-20% der Pankreaskarzinome bei klinischer Präsentation resektabel [151]. Angewandte Techniken sind bei Pankreaskopfkarzinom die partielle Duodenopankreatektomie (Whipple-OP) mit oder ohne Pyloruserhalt, bei Pankreasschwanzkarzinom eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie und bei Pankreaskorpuskarzinom eine subtotale Pankreaslinks-resektion bzw. totale Duodenopankreatektomie. Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin für sechs Monate bietet einen krankheitsfreien und Gesamtüberlebensvorteil [123, 157]. Ungeachtet der Resektion im Gesunden liegt die 5-Jahres-Überlebenszeit aufgrund von Tumorrezidiven in Form von sowohl Lokalrezidiven als auch Fernmetastasen

noch unter 20% [151, 169]. Ist der Tumor schon lokal fortgeschritten oder metastasiert, so ist nur noch eine palliative systemische Chemotherapie mit Gemcitabin möglich.

Während in den vergangenen Jahrzehnten Gemcitabin im Vergleich mit anderen Substanzen deren Monotherapie überlegen war [163], zeigen Metaanalysen aktueller Studien bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem PDAC einen statistisch signifikanten Benefit im Gesamtüberleben bei Kombinationstherapien von Gemcitabin plus Platinanaloga [51], Capecitabine [27, 52] oder dem EGFR-Inhibitor Erlotinib [116]. Große Hoffnung lässt auch die FOLFIRINOX-Studie Phase III mit einer Kombination von Oxaliplatin, Irinotecan, Leucovorin und 5-FU für selektive Patienten bei einem erhöhten Gesamtüberleben von 11,1 Monaten im Vergleich zu 6,8 Monaten im Gemcitabin-Arm ($p < 0,001$) schöpfen [25].

2. Molekularbiologie und Molekulargenetik des Pankreaskarzinoms

2.1 Pathophysiologische Aspekte des Pankreaskarzinoms

Neben dem azinären, medullären, undifferenzierten und kolloiden Karzinom des Pankreas, stellt das duktales Adenokarzinom mit 80-90% die häufigste epitheliale exokrine Pankreasneoplasie dar [62]. Die Begriffe duktales Adenokarzinom des Pankreas und Pankreaskarzinom werden daher in dieser Arbeit synonym verwendet.

Aus zahlreichen Studien ist heute bekannt, dass invasive duktales Pankreaskarzinome aus Vorläuferläsionen mit Zunahme an Dysplasien entstehen. Zu diesen zählen die Muzinöse zystische Neoplasie (MCN), die intraduktales papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die am häufigsten vorkommende pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) [53, 66]. Abbildung 1 zeigt die Histopathologie der einzelnen Vorläuferläsionen sowie frühe und späte genetische Ereignisse bei der Progression zum duktales Pankreasadenokarzinom [53].

Die wichtigsten Eigenschaften der einzelnen Vorläuferläsionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

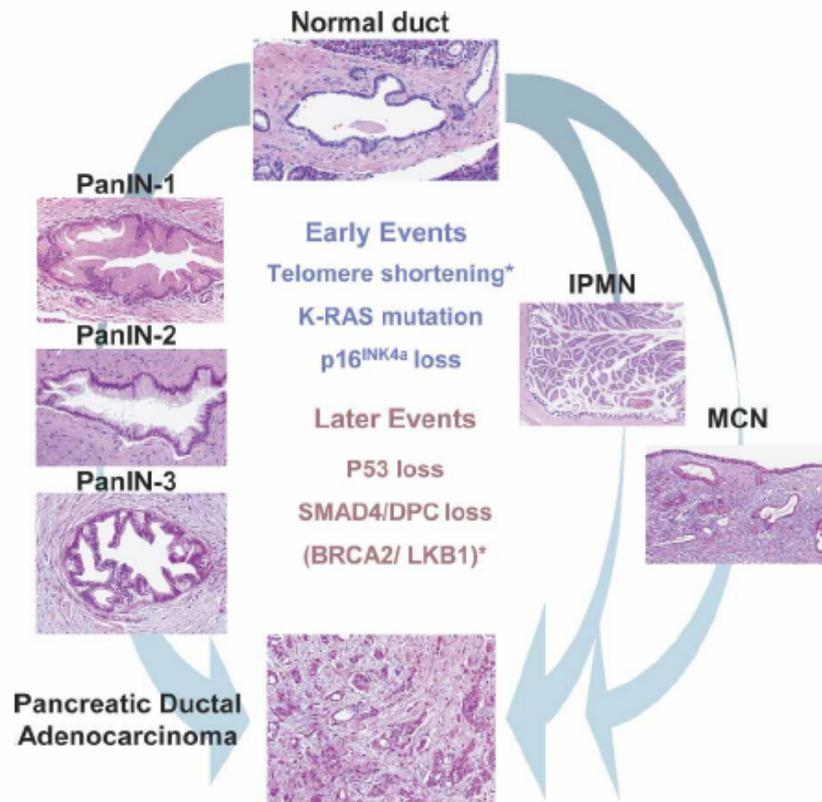


Abb. 1: Vorläuferläsionen und genetische Ereignisse bei der Progression zum duktalem Pankreaskarzinom.

Aus normalem Gangepithel entstehen durch genetische Ereignisse Vorläuferläsionen des duktalem Pankreaskarzinoms: PanIN-Läsionen mit zunehmendem Grad an Atypien (links), IPMN und MCN (rechts). Modifiziert nach Hezel et al., 2006 [53].

*genetische Ereignisse, bei welchen nicht bekannt ist, ob diese sich üblicherweise in allen Vorläuferläsionen ereignen.

Eigenschaft	PanIN	IPMN	MCN
Vorwiegendes Alter	mit dem Alter zunehmend	60	40-50
Geschlecht	w = m	m > w	w >> m
Lokalisation	Pankreaskopf >> -korpus/-schwanz	Pankreaskopf	Pankreaskorpus/-schwanz
Relation der Zysten zu großen Gängen	-	immer verbunden	normalerweise nicht verbunden
Zysteninhalte	-	mukös	mukös
Stroma	kollagenreich	kollagenreich	ovartypisch
Multifokalität	häufig	in 20-30%	sehr selten

Tab. 1: Eigenschaften und Vergleich von Vorläuferläsionen des duktalem Pankreaskarzinoms, modifiziert nach Hruban et al., 2007 [66].D

2.2 Vorläuferläsionen: PanIN-Progression

Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz als Erklärungsmodell der Entstehung des Kolonkarzinoms konnte in den letzten Jahren auch ein stufenweise ablaufendes Progressionsmodell für das invasive duktales Adenokarzinom des Pankreas etabliert werden [64]: Eine Progression von intraduktaler Proliferation zum invasiven duktalem Karzinom. Diese intraduktalen Proliferationen, genannt PanIN-Läsionen, werden nach dem Grad ihrer Dysplasie in drei Stadien unterteilt. Sie unterscheiden sich von normalen Gängen dabei zunehmend durch architekturelle und zytologische Veränderungen im Bereich der duktalem Strukturen (Abb. 2). PanIN-1 sind charakterisiert durch reichlich muzinbildendes, säulenförmiges, flaches (PanIN-1A) oder papilläres Epithel (PanIN-1B) mit basal orientierten, uniformen, runden Kernen. Sie kommen in etwa 40% nicht kanzerös veränderter Pankreata von über 50-jährigen Patienten vor. PanIN-2 zeichnen sich durch komplexere architekturelle Veränderungen wie Verlust der Kernpolarität, Kernpleomorphismus, Kernhyperchromasie und nukleäre Pseudostratifikation aus. PanIN-3, bzw. Carcinoma in situ, zeigen den höchsten Grad an Dysplasie; sie bilden Papillen und kribriiforme Strukturen, auch Zellabsonderungen ins Ganglumen sind zu sehen. Die Kerne sind vergrößert, pleomorph und ohne Orientierung, die Nukleoli sind häufig prominent und zeigen Mitosen [65]. Während PanIN-3-Läsionen in weniger als 5% gesunder Pankreata gefunden werden, sind sie in Pankreata mit PDAC mit 30-50% präsent.

Ergebnisse histopathologischer und molekulargenetischer Analysen unterstützen die Vorstellung eines Progressionsmodells: Dieselben genetischen Mutationen, vor allem in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, welche im invasiven PDAC auftreten, konnten auch in PanIN-Läsionen nachgewiesen werden. Obwohl sich diese Mutationen nicht in Reihenfolge nacheinander ereignen, so gibt es doch Mutationen, die früh bzw. spät in der Tumorgenese auftreten. Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass als initiale Läsion der „multi-hit“-Hypothese der Tumorgenese das Onkogen *Kras* in 36% der humanen PanIN-1A, in 44% der PanIN-1B, in 87% der PanIN-2/-3-Läsionen und in beinahe 100% des PDAC eine Punktmutation in Codon 12, die zur Onkogenaktivierung führt, tragen [108]. Auch die Überexpression von *Her2/neu* stellt eines der frühen genetischen Ereignisse dar [28]. In späteren Stadien, und in etwa 80% bis 95% humaner Pankreaskarzinome, tritt die Inaktivierung von *Ink4A/ARF*, kodierend für das p16-Protein, auf [117, 139, 179]. Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *Trp53* und *DPC4/Smad4* tritt mit 76% bzw. 53%, sowie auch gelegentlich die Inaktivierung von *BRCA2*, nur bei Läsionen mit hochgradigen Atypien wie es PanIN-3 zeigen, auf [139, 180].

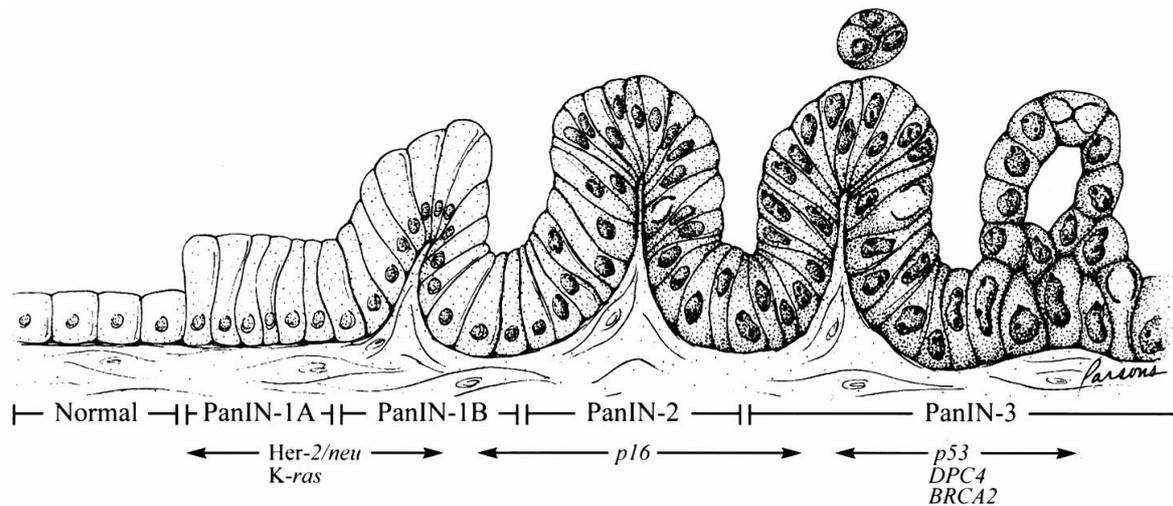


Abb. 2: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms.

Die stufenweise fortschreitende Akkumulation genetischer Veränderungen führt zu assoziierter Pathomorphologie des normalen Gangepithels über PanIN-Läsionen zum invasiven duktalem Adenokarzinom des Pankreas (modifiziert nach Hruban et al., 2000 [67]).

In humanen Malignomen ist *Trp53* das am häufigsten mutierte Gen [170]. Dessen Genprodukt p53, der „Wächter des Genoms“, ist ein ubiquitär vorkommendes Transkriptionsprotein, welches eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation spielt. Zu den wichtigsten Funktionen gehören Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase über Stimulation der p21-Transkription, Apoptose, DNA-Reparatur sowie die Erhaltung der genomischen Stabilität und stellt somit einen Zellmechanismus zum Schutz vor Tumorgenese dar. Neben Mutationen in späten PanIN-Läsionen konnte in 76% der Pankreaskarzinome eine somatische Mutation im *Trp53*-Gen nachgewiesen werden, die größtenteils bei Mutation eines Allels, von Verlust des zweiten Wildtypallels (LOH) begleitet wird und damit zur Inaktivierung der Proteinfunktion führt [139]. Während die p53-Konzentration unter normalen Bedingungen durch die rasche Degradation aufgrund der Hdm2/Mdm2-Ubiquitin-Ligase niedrig gehalten wird, führen zelluläre Stresssignale wie DNA-Schäden durch Strahlenbelastung, Hypoxie oder auch Onkogenaktivierung durch Hemmung der Hdm2/Mdm2-Funktion zur Akkumulation von p53, und damit indirekt zu dessen Aktivierung [152]. Ein Beispiel für die Inhibition von p53 stellt der IKK/ IκB/ NFκB-Signalweg dar. Dabei induziert die RelA/p65-Untereinheit des Transkriptionsproteins NFκB die Expression anti-apoptotischer Gene und hemmt so die pro-apoptotische Funktion von p53 [177]. Damit spielt *Trp53* eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese.

Schließlich münden die Mutationen dieser den Zellzyklus regulierenden Onkogene und Tumorsuppressorgene in die Dysregulation des Zellzyklus mit unzureichender Kontrolle der Zellzyklusprogression einhergehend mit unkontrolliertem Zellwachstum und maligner Transformation. Damit korreliert die fortschreitende Akkumulation genetischer Mutationen krebsassoziierter Gene mit histologischen Stadien, die mit Zunahme der zytologischen und architekturellen Atypien zum invasiven Karzinom führen [67, 140, 147, 184].

3. Mausmodelle

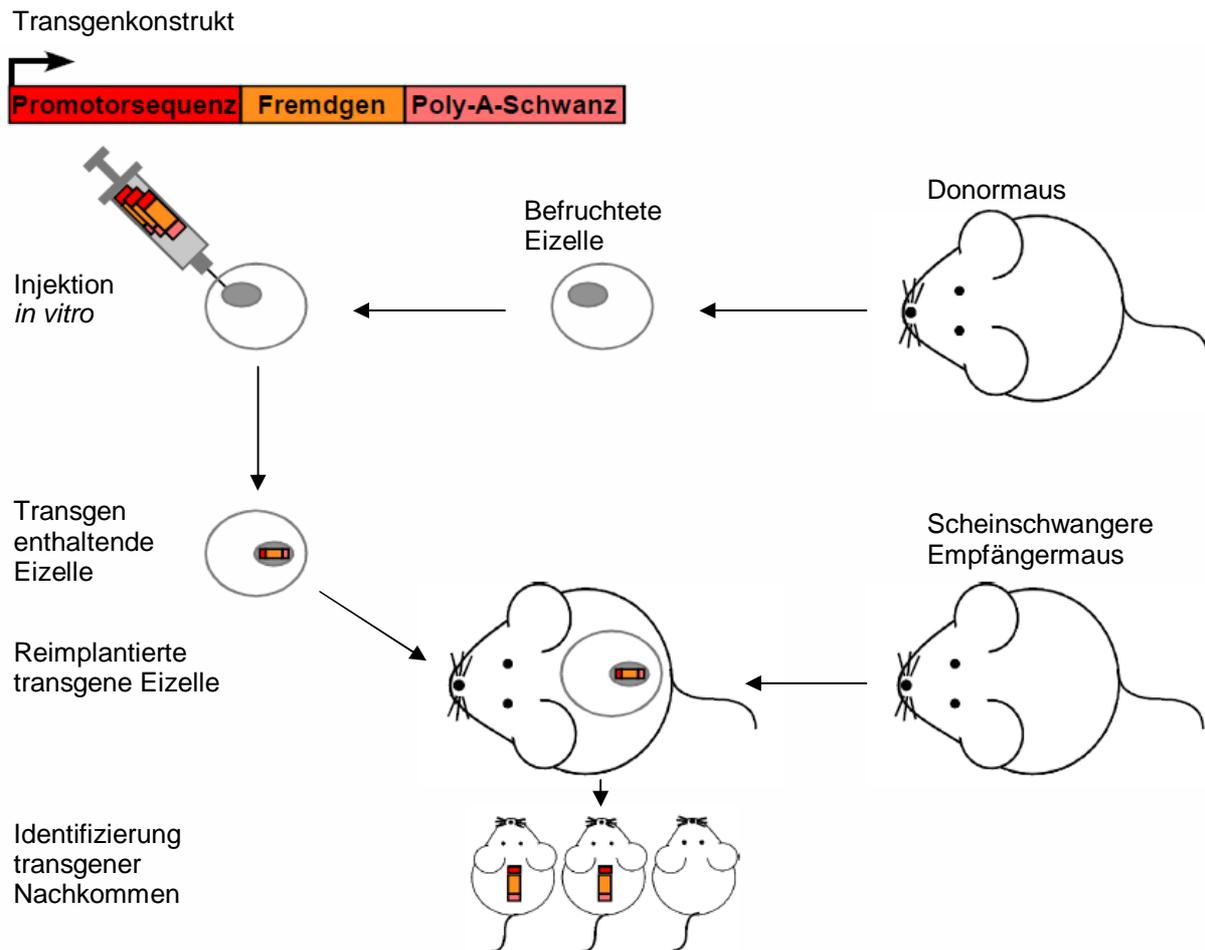
Zur genaueren Untersuchung von spezifischen Proteinen und deren Signalwegen im Pankreaskarzinom wurden in den letzten Jahren Mausmodelle mit verschiedenen Transgenen und Gen-Knockouts entwickelt. Durch Überexpression bzw. das Inaktivieren spezifischer Gene können so Rückschlüsse auf die entsprechenden Rollen dieser Proteine bzw. deren Signalwege in der Tumorentstehung und Tumorprogression in der Maus untersucht und veranschaulicht werden, und damit potenzielle neue Ansatzpunkte für effizientere Therapien aufzeigen.

3.1 Überexpression von Proteinen in Mauslinien: Das Transgen-Technologie-System

Ein für die Generierung von experimentell integrierten Fremdgenen in ein Wirtsgenom essentielles Verfahren ist die Transgen-Technologie. Dabei werden Gene einer fremden Spezies in das Genom eines anderen Organismus inseriert. Hierzu wird in erster Linie experimentell meist ein speziensfremdes Gen unter einen zelltypspezifischen Promotor des Donororganismus inseriert und mit einem Poly-A-Schwanz verknüpft. Von diesem Transgenkonstrukt werden dann ca. 200-300 Kopien in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle *in vitro* mikroinjiziert. Die befruchtete Eizelle, welche die Transgenkopien enthält, wird anschließend in eine Ammenmaus reimplantiert. Ein Teil der Nachkommen enthält das Transgen und wird durch Genotypisierung identifiziert (Abb. 3A).

Das *Ela-TGF α -hGH*-Konstrukt wurde von Sandgren et al., 1990 [141] beschrieben. Um festzustellen, ob TGF α als transformierendes Protein speziell in epitheliale Gewebe agiert, wurden transgene Mäuse mit Überexpression von TGF α unter Kontrolle eines Ratten-Elastase Enhancer/Promoters generiert. Hierzu wurde Ratten TGF α -cDNA in das fusionierte *Ela-hGH*-Genkonstrukt mit humaner Wachstumshormonsequenz [124] inseriert (Abb. 3B). In diesen Mäusen ist die Transgenexpression spezifisch auf Azinuszellen begrenzt.

A



B

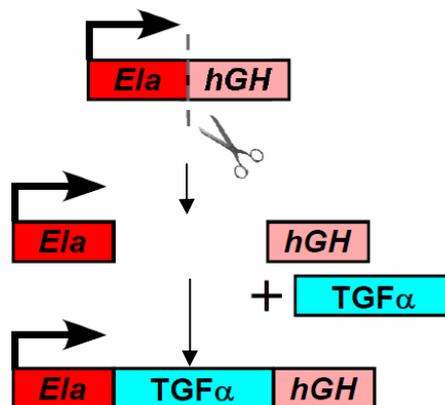


Abb. 3: Generierung einer transgenen Maus durch Einfügen eines Fremdgens in das Mausgenom.

(A) Das Transgenkonstrukt (links oben) wird in den Kern einer befruchteten Eizelle der Donormaus (rechts oben) mikroinjiziert (mitte). Die transgene Eizelle wird in eine scheinschwangere Maus implantiert (unten). In der F1-Generation wird die Insertion des Transgens anhand Genotypisierung überprüft.

(B) Insertion von Ratten TGF α -cDNA in das *Ela*-hGH-Konstrukt mit humaner Wachstumshormonsequenz [124] unter die Kontrolle eines Ratten-Elastase-Promotors (*Ela*): *Ela*-TGF α -hGH-Konstrukt [141].

TGF α gehört zur Familie der EGF-Proteine. Durch seine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit ist TGF α Ligand am EGF-Rezeptor, einer Tyrosinkinase, welche die Signaltransduktion vieler Zellen vermittelt. TGF α wird als transmembraner Vorläufer synthetisiert und anschließend an seiner extrazellulären Domäne prozessiert. Beide, sowohl mutiertes pro-TGF α als auch das prozessierte TGF α , sind in der Lage, die Signaltransduktion in der Zelle zu initiieren [13]. Mehrfach wurde nachgewiesen, dass TGF α in Karzinomen *in vivo* exprimiert wird [154] und eine Rolle in der neoplastischen Transformation von Zellen spielt. Zum Beispiel konnte Seufferlein [150] eine Aktivierung der Ha-Ras/Erk1/2-Kaskade durch TGF α zeigen, welche zur Proliferation von Zellen führt.

Die lokale Überexpression von TGF α in Pankreasazini führt zu auto- und parakrin-vermittelter sichtbarer Organvergrößerung bei einem Monat alten Mäusen. Dies kann einerseits durch Azinuszellhyperplasie, andererseits durch Proliferation von Fibroblasten, welche durch Azinuszellen über parakrine Mechanismen stimuliert werden und damit zu Fibrose des interlobulären Stromas führen, erklärt werden. Das Ausmaß der Fibrose korreliert dabei mit der Höhe der Transgenexpression. Weiterhin kommt es zur Transdifferenzierung von Azinuszellen zu so genannten duct-like cells mit erhöhter EGFR-Expression, die tubuläre Strukturen bilden und duktale Marker wie Zytokeratin-19 exprimieren. Diese tubulären Strukturen konnten als Vorläuferläsionen von invasiven duktalem Karzinomen, die diese transgenen Mäuse nach einem Jahr entwickeln, identifiziert werden [42, 172].

3.2 Konditionaler Knockout in Mauslinien: Das Cre-*loxP*-System

Ein weiteres essentielles Verfahren ist die Herstellung gewebespezifisch inaktivierter Gene mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems, welches auch in dieser Arbeit zur Generierung einer pankreasspezifischen Inaktivierung sowohl des *Trp53*- (Transformation related protein 53) als auch des *Rela*-Gens genutzt wurde. Das Cre-*loxP*-System ist ein 1980 entwickeltes Rekombinationssystem, das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt. Anders als der klassische Knockout, bei dem Gene dauerhaft und vollständig ausgeschaltet werden, ermöglicht der konditionale Knockout durch das Cre-*loxP*-System den zelltypspezifischen Gen-Knockout durch gezielte Exzision von DNA-Sequenzen [59]. Dabei steht Cre für „cyclization recombination“ und gehört zur Enzymklasse der Rekombinasen, welche die Spaltung und Neuverknüpfung zwischen spezifischen Basensequenzen katalysieren. Die 34bp langen Erkennungssequenzen werden als *loxP* („locus of X-over of P1“) bezeichnet.

Die Kernsequenz von *loxP* besteht aus acht Basenpaaren, welche von zwei jeweils 13 Basenpaaren langen, palindromischen Elementen flankiert werden. Cre kommt natürlicherweise in allen Organismen vor, es ermöglicht zum Beispiel die Reparatur von Mutationen. Wird ein DNA-Segment bzw. Gen mit *loxP*-Sequenzen in gleicher Orientierung flankiert, so wird dieses Segment durch Cre exzidiert, das Produkt in der Zelle abgebaut und es bleibt eine einzelne *loxP*-Sequenz zurück [118, 144]. Sind die *loxP*-Sequenzen gegenseitig orientiert, so wird das flankierte DNA-Segment von Cre invertiert.

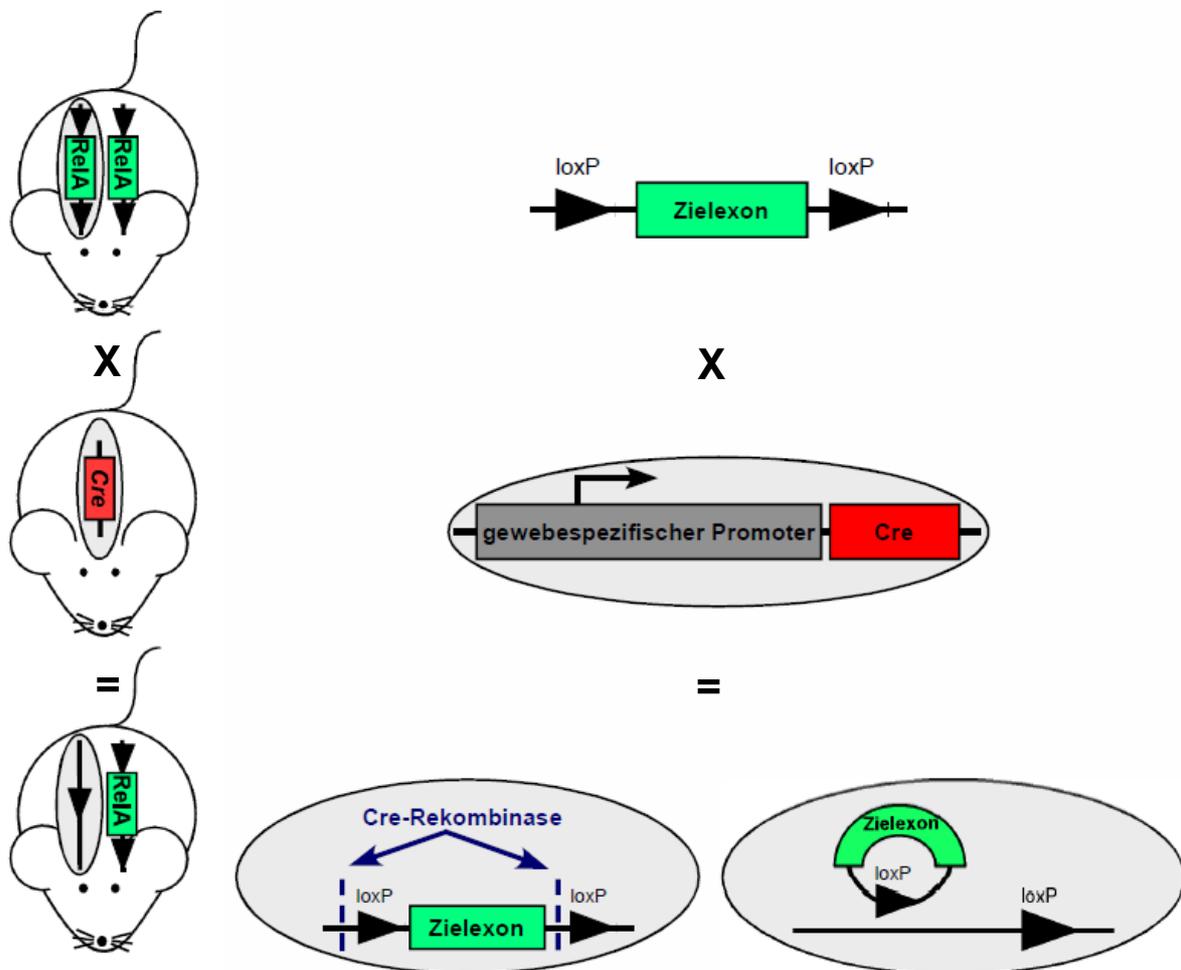


Abb. 4: Konditionaler Knockout mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems.

Bei Kreuzung einer geflochtenen Maus (oben) mit in gleicher Richtung orientierten *loxP*-Sequenzen (►) in einem Genlocus (grün) mit einer Cre-Maus (rot, Mitte), in der Cre unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert wird (grau), resultiert die gewebespezifische Deletion des Genlocus, und damit die Inaktivierung des Zielgens mit Zurückbleiben einer *loxP*-Sequenz (unten).

Um eine Maus mit Cre-*loxP*-System vermitteltem Gen-Knockout zu generieren, werden zwei genetisch veränderte Mauslinien, zum einen eine gewebespezifische Cre-Maus, zum anderen eine Maus mit funktionalem, *loxP*-flankiertem Zielgen („gefloxt“ Zielmaus), benötigt [45]. Diese Mäuse werden miteinander gekreuzt, das Rekombinationssystem so aktiviert und das Zielgen in der Tochtergeneration ausgeschaltet (Abb. 4), während in allen anderen Geweben, die das Cre-Transgen nicht exprimieren, die Funktionalität des Zielgens erhalten bleibt. Zur Herstellung einer Maus, die Cre selektiv in spezifischem Gewebe exprimiert, wird ein Cre-Transgen ins Mausgenom integriert, so dass es unter der Promotorkontrolle eines zelltypspezifischen Proteins steht. Um eine Maus mit gefloxtem Zielgen zu erhalten, wird ein Exon des Zielgens mit zwei gleichgerichteten *loxP*-Sequenzen flankiert und in die Keimbahn embryonaler Stammzellen eingebracht. Dabei müssen die *loxP*-Sequenzen so integriert werden, dass das gefloxt Gen funktionsfähig bleibt und der Phänotyp sich vom Wildtyp nicht unterscheidet.

Durch konditionale Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *Trp53* im *Ela-TGF α -hGH*-Modell konnten wir hier die genetischen Veränderungen ortholog dem humanen PDAC rekapitulieren. Dieses Mausmodell präsentiert folglich ein Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms mit genetischen Veränderungen und pathomorphologischen Wachstumseigenschaften ähnlich dem im Menschen und wurde aus diesen Gründen in dieser Arbeit untersucht.

4. Der IKK/ I κ B/ NF κ B- Signalweg

NF κ B gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, welche über verschiedene Signalwege aktiviert werden können. Abhängig vom Stimulus sind darin verschiedene Untereinheiten der NF κ B-Familie involviert. Beim klassischen Signalweg von NF κ B, mit dem Komplex aus den Untereinheiten p50 und RelA/p65, wird dieses durch I κ B's, spezifischen Inhibitoren, gebunden im Zytoplasma zurückgehalten [16, 168], indem diese die nukleäre Lokalisationssequenz maskieren. Getriggert durch Signale, wird die IKK, bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO/IKK γ , aktiviert [138]. Diese phosphoryliert I κ B α an zwei Serinen (I κ B α an den Serinen 32 und 36 bzw. I κ B β an den Serinen 19 und 23) der N-Terminalen Domäne [30, 112, 162, 186]. Die Phosphorylierung von I κ B α ist im klassischen Weg hauptsächlich von IKK β abhängig. I κ B werden dann ubiquitinyliert und über das 26S Proteasom degradiert [88, 185], während das NF κ B-Dimer freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert (Abb. 5). Dort

bindet NF κ B an Promotor/Enhancer-Sequenzen von Zielgenen und aktiviert deren Transkription [21, 33, 85, 146]. Zu diesen Zielgenen zählen vor allem Gene der Inflammation, Immunregulation, anti-apoptotische Gene, Zellzyklusregulatorgene und negative Regulatorgene von NF κ B selbst, wie beispielsweise das für I κ B α kodierende Gen. Im Zellkern kann die Funktion des NF κ B-Dimers durch Phosphorylierung durch weitere Kinasen moduliert werden.

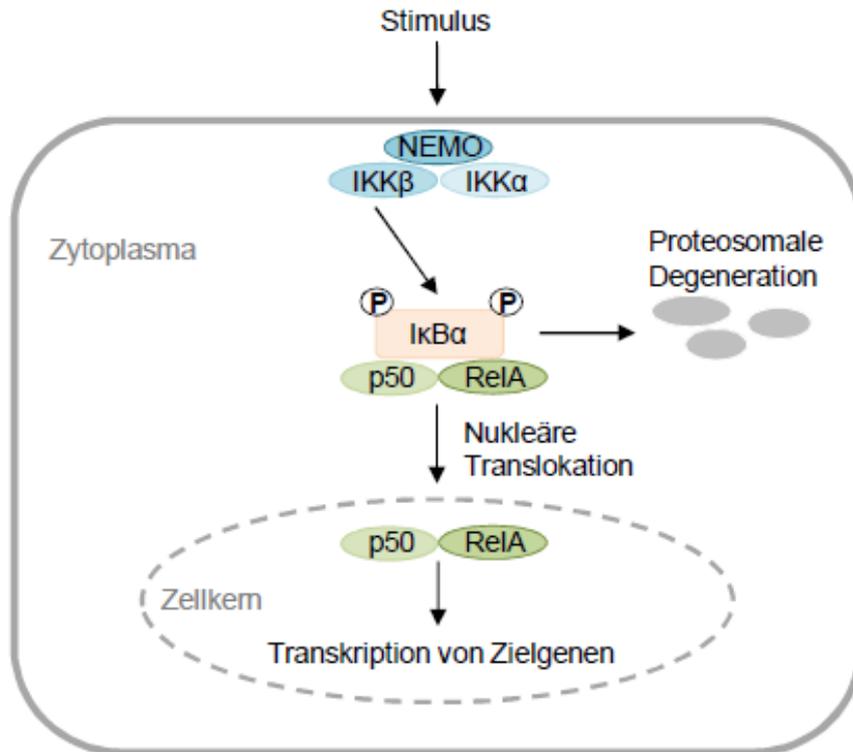


Abb. 5: Signaltransduktion im klassischen IKK/ I κ B/ NF κ B-Signalweg.

Durch externe Stimuli aktivierte IKK β phosphoryliert I κ B α , wodurch das Heterodimer NF κ B, bestehend aus den Untereinheiten p50 und RelA/p65, aus seiner zytoplasmatischen Bindung mit I κ B α freigesetzt wird. NF κ B transloziert in den Zellkern und transkribiert dort Zielgene. I κ B α wird proteosomal degradiert.

Der zweite, alternative Signalweg, resultiert in der Aktivierung des p52/RelB-Heterodimers und spielt eine Rolle in der Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen sowie Reifung und Überleben von B-Zellen, er soll hier nur erwähnt werden.

4.1 Transkriptionsfaktor NF κ B

NF κ B gehört zu der aus mehreren Untereinheiten bestehenden Rel-Familie von nukleären Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen die Proteine RelA/p65, RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50/p105),

und NFκB2 (p52/p100), die alle eine circa 300 Aminosäuren lange N-terminale RHD (Rel homology domain) gemeinsam haben [39]. Diese ist zuständig für die DNA-Bindung an κB-Bereichen und die Dimerisierung [10, 165]. Im Gegensatz zu den Untereinheiten RelA, RelB und c-Rel, die additiv eine C-terminale Transaktivierungsdomäne aufweisen, fehlt diese den Untereinheiten p105 und p100. Diese werden durch Proteasomprozessierung in die aktiven Transkriptionsfaktoren p50 bzw. p52 überführt. NFκB bildet Homo- oder Heterodimere, von welchen das p50/p65-Dimer am häufigsten vorkommt, und bindet nach Translokation aus dem Zytoplasma in den Nukleus an eine zehn Nukleotid lange DNA-Sequenz (κB). Die geringe Nukleotidvariabilität dieser DNA-Sequenz führt dabei zu einer Selektivität gegenüber bestimmten Dimerkonfigurationen [97].

Aktiviert durch externe Stimuli oder physikalischen Stress, u.a. Lipopolysaccharide, Zytokine wie TNF-α und Interleukine, virale Infektion oder virale Genprodukte, oxidativer Stress durch UV-Strahlung oder B- bzw. T-Zellen, reguliert NFκB eine weite Spanne an Genen. Hierzu zählen Mediatoren der Immunantwort und Inflammation [85] wie die Expression von Zytokinen, Interleukinen, akute-Phase-Proteine und Wachstumsfaktoren [84] sowie Zelladhäsionsmoleküle in B- und T-Zellen [126]. Auch eine entscheidende Involvierung von NFκB in die Zellzyklusregulation durch Aktivierung von u. a. Cyclin D1 [46, 58, 80], und damit der Proliferation von Zellen, wurde nachgewiesen.

Zusätzlich spielt NFκB eine zentrale Rolle in der Regulation des programmierten Zelltodes, der Apoptose: In Analysen von *Rela*^{-/-}-Knockout-Mäusen, die am 15. Tag der Embryonalentwicklung aufgrund massiver TNFα-induzierter Apoptose von Hepatozyten starben, konnte erstmals eine anti-apoptotische Funktion von NFκB nachgewiesen werden [10]. Viele weitere Studien konnten diesen anti-apoptotischen Effekt bestätigen. Jedoch wird auch eine duale Funktion von NFκB sowohl als Tumorpromoter als auch, unter gewissen Umständen, als Tumorsuppressor diskutiert [18, 130].

Darüber hinaus konnte in humanen Pankreasadenokarzinomzellen, jedoch nicht in normalem humanen Pankreasgewebe, ein konstitutiv aktivierter NFκB-Signalweg nachgewiesen werden [35, 176, 178].

Bisherige Untersuchungen zeigen eine maßgebliche Involvierung von NFκB in fundamentale biologische Prozesse, welche durch die konstitutive NFκB-Expression, wie sie humane Pankreaskarzinome zeigen, dysreguliert werden und so das Überleben und Wachstum entarteter Zellen fördern sowie die maligne Transformation von Zellen begünstigen. Folglich spielt NFκB damit eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Progression von Pankreasadenokarzinomen, die genauen molekularen Mechanismen sind bisher jedoch weitgehend

unbekannt. Eine Inhibition von NF κ B auf molekularer Ebene könnte konsequenterweise die Karzinomentstehung oder den Tumorprogress hemmen und macht dieses Molekül deshalb zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Krebsforschung. Aufgrund embryonaler Letalität bei *Rela*-defizienten Knockout-Mäusen und Mangel an NF κ B-Inhibitoren, wurde in dieser Arbeit eine pankreasspezifische konditionale Mutation mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems generiert.

5. Zielsetzung der Arbeit

Da in den letzten Jahren sowohl in Malignomen als auch in prämaligen Tumoren des Pankreas zahlreiche Alterationen verschiedener tumorverursachender Gene identifiziert werden konnten, die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen durch diese Alterationen in Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms trotzdem nur unzureichend aufgeklärt sind, gilt es, den Fokus der Forschung weiterhin auf diesen Bereich zu richten.

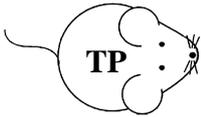
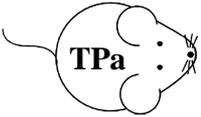
Zahlreiche Evidenzen weisen einen konstitutiv aktivierten NFκB-Signalweg in humanen Pankreasadenokarzinomzellen, jedoch nicht in normalem Pankreasgewebe nach [35, 176, 178] und sprechen für eine maßgebliche Involvierung von NFκB in der Tumorgenese und dem Tumorprogress. Die genauen Mechanismen sind jedoch bisher weitgehend unbekannt und insbesondere hier bedarf es der genaueren Beleuchtung der Rolle von NFκB bzw. den Effekt dessen Inaktivierung während der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, in einem dem Menschen in pathomorphologischen Wachstumseigenschaften sowie genetischen Veränderungen weitgehend ähnlichem Pankreaskarzinommodell, den Effekt einer Inaktivierung des *Rela*-Gens, dessen Genprodukt RelA/p65 Untereinheit des am häufigsten vorkommenden NFκB-Proteins darstellt, nachzuweisen und damit den NFκB-Signalweg als potentiellen therapeutischen Angriffspunkt zu verifizieren.

Von besonderer Relevanz waren folgende Fragen:

- Welche Rolle spielt NFκB/RelA bei der Onkogenese des Pankreaskarzinoms?
- Welchen Einfluss hat NFκB/RelA auf den Tumorprogress des Pankreaskarzinoms?

Folgende Mausmodelle wurden hierzu verwendet:

Genotyp	<i>Ela-TGFα-hGH; Trp53^{loxP/loxP}; Ptf1a-cre^{ex1}</i>	<i>Ela-TGFα-hGH; Trp53^{loxP/loxP}; Rela^{loxP/loxP}; Ptf1a-cre^{ex1}</i>
Abkürzung		

Tab. 2: Genotypen und Abkürzungen der verwendeten Mausmodelle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten somit dazu beitragen, den Einfluss und die Mechanismen des NFκB-Signalweges besser zu verstehen und damit Rückschlüsse auf Synergismen zu molekularbiologischen Prozessen humaner Pankreaskarzinome ziehen lassen. Weiterhin könnten diese Ergebnisse neue Angriffspunkte in der bisher frustranen Therapie dieser hochmalignen Tumorerkrankung aufzeigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien

Agenz	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30 # 3029.2	Roth, Karlsruhe D
Agarose	LE Agarose # 840.004	Biozym, Oldendorf D
APS	# MKBB 7171	Sigma, Steinheim D
BioRad Protein Assay (5x)	Protein Assay Dye Reagent Concentrate # 500-0006	BioRad, München D
Bromphenolblau	Bromphenol blue sodium salt # B5525	Sigma, Steinheim D
BrdU	# B5002-5G	Sigma, Steinheim D
BSA	Cohn V fraction # A4503	Sigma, Steinheim D
CaCl ₂	# C4901	Sigma, Steinheim D
DAB	DAB/ Ni Substrate Peroxidase # SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
ddH ₂ O	Aqua ad injectabilia	Laboratori Diaco Biomedicali S.p.A., Trieste It
dH ₂ O		DeltaSelect, Dreieich D
Direct PCR® Lysis Reagent	#31-102-T	PeqLab, Erlangen D
DMEM	# 41966	Gibco, Paisley UK
DNA Längenstandard	DNA-Leiter-Mix # 25-2040	PeqLab, Erlangen D
ECL (Amersham)	ECL™ Westernblotting Detection Reagents RPN2106	GE Healthcare, Buckinghamshire UK
ECL Plus (Amersham)	ECL™ Westernblotting Detection Reagents RPN2132	GE Healthcare, Buckinghamshire UK
EDTA	# E6758	Sigma, Steinheim D
EGTA	#095K5446	Sigma, Steinheim D
Eisessig	#607-002-00-6	Merck, Darmstadt D
Eosin	# 2C-140	Croma, Münster D
Ethanol		Apotheke MRI
Ethidiumbromid	# E1510	Sigma, Steinheim D
FCS	Fetal Bovine Serum Superior # S0615	Biochrom AG, Berlin D
Glycin	# 3908.3	Roth, Karlsruhe D
Goat Serum	# G9023	Sigma, Steinheim D
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung # 1094249	Merck, Darmstadt D
Hämatoxylin	# 105174	Merck, Darmstadt D
HCl	# 109057	Merck, Darmstadt D
HEPES	# H7523	Sigma, Steinheim D
Histoclear	Roti®-Histol # 6640.2	Roth, Karlsruhe D
H ₂ O ₂ 30%	# 108597	Merck, Darmstadt D
Isofluran	Forene® # B506	Abbott, Wiesbaden D
Isopropanol		Merck, Darmstadt D
KCl	# 6781.3	Roth, Karlsruhe D
Ladepuffer		PeqLab, Erlangen D
Liberase	Blenzyme #1-988-417	Roche, Mannheim D

Magermilchpulver	# 70166 Fluka	Sigma, Steinheim D
MEM Amino acids 50x	# 11130	Gibco, Paisley UK
MEM Nonessential amino acids	# 11140	Gibco, Paisley UK
Methanol	# CP43.4	Roth, Karlsruhe D
MgCl ₂	# M2670	Sigma, Steinheim D
N ₂		Apotheke MRI
NaCl	# 71383	Sigma, Steinheim D
NH ₄ Cl	# 78H0703	Sigma, Steinheim D
NP40	Nonidet 40 #11866900	Roche, Mannheim D
OTI	Oval Trypsin Inhibitor #109-878	Roche, Mannheim D
PBS	# 14190250	Gibco, Paisley UK
PBS-Pulver	Dulbecco 9,5g/l	Biochrom AG, Berlin D
Pen/Strep	# 15140	Gibco, Paisley UK
Pertex	# PER 20000	Medite GmbH, Burgdorf D
PFA	Paraformaldehyd 16% #15710	Electron MicroscopySciences, Hatfield PA
Phosphatase Inhibitor	Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 # P2850	Sigma, Steinheim D
Phosphatase Inhibitor	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 #	Sigma, Steinheim D
Polymerase	RedTaq® Ready Mix™ #	Sigma, Steinheim D
Ponceau S	# 094K4360	Sigma, Steinheim D
Protease Inhibitor	Protease Inhibitor Cocktail #P8340	Sigma, Steinheim D
Protein Längenstandard	Precision Plus Protein™ All Blue Standard #161-0373	BioRad, München D
Proteinase K	# 03 115 828001	Roche, Mannheim D
Rabbit Serum	# R9133	Sigma, Steinheim D
RedTaq Ready Mix	R2523-100RXN	Sigma, Steinheim D
RNase	RNaseZAP # 048K1816	Sigma, Steinheim D
Saponin from Quillaja bark	# 034K7023	Sigma, Steinheim D
SDS	SDS Ultra pure # 2326.2	Roth, Karlsruhe D
Sodium pyruvat 100x	# 11360	Gibco, Paisley UK
Streptavidin/ Biotin block	# SP-2001	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
SYTOX Green nucleic acid stain	#S7020	Invitrogen GmbH, Darmstadt D
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin #T9281	Sigma, Steinheim D
Trisodium citrat	# 2006753	Sigma, Steinheim D
Tris-Base	# 5429.2	Roth, Karlsruhe D
Tris-HCl	# 9090.3	Roth, Karlsruhe D
TritonX-100	# 1 332 481	Roche Applied Science, Penzberg D
TSA™-Kit	# 24 T20934	Invitrogen GmbH, Darmstadt D
Trypan-blau	# L6323	Biochrom AG, Berlin D
Trypsin	0,05% Trypsin-EDTA # 25300	Gibco, Paisley UK
Tween-20		Roth, Karlsruhe D

Tab. 3: Chemikalien.

1.2 Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Bezeichnung	Hersteller
ABC Solution	Vectastain ABC Kit (Standard) # PK-6100	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit	#69504	Quiagen, Hilden D
Nuclear Extracts Preparation Kit	# 40010	Active Motif®, Rixensart Be
DAB/Ni Peroxidase Substrate Kit	SK-4100	Biomol, Hamburg D

Tab. 4: Kommerziell erhältliche Kits.

1.3 Verbrauchsmaterial

Material	Typ	Hersteller
Deckgläschen		Merck KGaA, Darmstadt D
Pasteurplastpipetten 3ml	# 2600111	Windaus-Labortechnik GmbH & Co. KG, Clausthal-Zellerfeld D
Einmalkanülen	Sterican 100	Braun, Melsungen D
Film	Amersham Hyperfilm EXL #RPN3103K	GE Healthcare, Buckinghamshire UK
Filterpapier	Whatman® chromatography Paper 3mm #3030-917	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel D
Filterpipetten	Safe Seal Tips professional 1000µl, 100µl, 10µl #	Biozym Scientific, Oldendorf D
Handschuhe	semper care Sempermed®	Semperit Technische Produkte, Wien A
	semper care nitrile Sempermed®	Semperit Technische Produkte, Wien A
Immunhistokassette	klein	Bio optica, Milano It
Immunhistokassette	groß	Bio optica, Milano It
Mikroröhre mit Verschluss	# 72.694.007	Sarstedt, Nümbrecht D
Nitrocellulose-membran	Protran BA 83	Whatman®, Dassel D
Objektträger	Adhesion Slides # 011410-9	Menzel-Gläser, Braunschweig D
Papiertücher	Kleenex®	Kimberley-Clark, Surrey UK
	Kimtech absorbent towels	Kimberley-Clark, Surrey UK
PCR Softstrips 0,2ml	# 711030	Biozym Scientific, Oldendorf D
PCR Cap strip		Biozym Scientific, Oldendorf D
Petrischalen	Falcon ten-twenty-nine™ petri dish verschiedene Größen	Becton Dickinson, NJ USA
Pipetten	verschiedene	Eppendorf, Hamburg D
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg D
Propylenpipetten	2ml, 5ml, 15ml, 25ml, 50ml	Becton Dickinson, NJ USA
Propylenröhrchen 50ml	Falcon Blue Max™ 50ml Propylen Conical Tube	Becton Dickinson, NJ USA
Propylenröhrchen 15ml	Falcon Blue Max™ 15ml Propylen Conical Tube	Becton Dickinson, NJ USA
Reaktionsgefäße	Safe Lock Tubes, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg D
Röhre 120ml mit Verschluss	# 60.597.001	Sarstedt, Nümbrecht D
Schlauchfolie	# 129-2157	VWR International GmbH, Darmstadt D
Spritzen	verschiedene	Braun, Melsungen D

Ständer		A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg D
Transfermembran Pore Size 0,45µm	Immobilon-P Transfer Membrane #IPVH 00010	Millipore Corporation, Billerica MA, USA
Transfermembran Pore Size 0,2µm	Immobilon-P Transfer Membrane #I15EQ 00010	Millipore Corporation, Billerica MA, USA
Well Plate	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate #N801-0560	Applied Biosystems, Singapur SNG
Well Plate	Multiwell™, verschiedene Größen	Becton Dickinson, NJ USA
	Microtest TM96 Zellkulturplatte	Becton Dickinson, D
Zellkulturflaschen	Falcon T75, T175	BD Biosciences, San Jose CA, USA
	Tissue Culture Flask 25cm ² / 75cm ² / 175cm ²	Sarstedt Inc., Newton CA, USA
Zellkulturschalen	Falcon® Culture Dish verschiedene Größen	Becton Dickinson, NJ USA
Zellkulturschalen mit Raster	Falcon® Integrid™ Tissue Culture Dish 20mm Grid	Becton Dickinson, NJ USA
Zellschaber	# 99004	Techno Plastic Products AG, Trasadingen CH

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien.

1.4 Puffer und Lösungen

Puffer		Hersteller
Antigendemaskierungs- lösung	# H-3300	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
Hank's balancierte Salzlösung	#14175-053	Gibco, Paisley UK
Restore™ Plus Western Blot Stripping- puffer	# 46428	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA
TBE Pufferlösung		Apotheke MRI

BrdU Stock-Lösung	
500mg	BrdU
7ml	dH ₂ O
mit NaOH bis zur vollständigen Lösung alkalisier, auf 10ml dH ₂ O aufgefüllt und steril filtriert.	

Strippuffer (pH=2)	
25mM	Glycin
1%	SDS

Lysispuffer für Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen	
50 mM	Tris pH 8,0
100 mM	EDTA
100 mM	NaCl
1%	SDS
0,5 mg/ml	Proteinase K, kurz vor der Lyse hinzugeben

PBS-Puffer, pH 7,4	
137mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
10 mM	KH ₂ PO ₄

Auf 1l mit dH ₂ O auffüllen
--

PBS-T-Puffer

PBS-Puffer	s.o.
0,1%	Tween-20

TBS-Puffer, pH=7,6

20 mM	Tris
137 mM	NaCl
Auf 1l mit dH ₂ O auffüllen	

TBS-T-Puffer

TBS-Puffer	s.o.
0,1%	Tween-20

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA, pH 8,0

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

0,4 M	Tris
0,2 M	Eisessig
0,01 M	EDTA x NA ₂ x 2H ₂ O

IP/ MLB-Lysispuffer

50 mM	Hepes, pH 7,9
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA, pH 8,0
0,5%	NP-40
10%	Glycerin
1 mM	DTT
0,2 mM	PMSF
1%	Protease Inhibitor Cocktail
1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail I
1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail II

Lämmli-Puffer, 5x

300 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10%	(w/v) SDS
50%	Glycerin
0,05%	Bromphenolblau
5%	β-Mercaptoethanol

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris, pH 8,8
Auf 1l mit dH ₂ O auffüllen	

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris, pH 6,8
Auf 1l mit dH ₂ O auffüllen	

Laufpuffer, 10x	
25 mM	Tris-HCl
192 mM	Glycerin
0,1%	SDS

Trenngel	7,5%	10%	12%	15%
dH ₂ O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
Rotiphorese Gel 30	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Sammelgel	
3,0 ml	dH ₂ O
1,3 ml	Sammelgelpuffer
750 µl	Rotiphorese Gel 30
50 µl	10% SDS
25 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Laufpuffer	
25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1%	SDS

Transferpuffer	
25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20%	Methanol

Dilutionspuffer für 1l	
770 ml	Hank's Balanced Salt Solution
3,3 ml	Hepes 1M
20 ml	50x MEM Amino acids
10 ml	100x MEM Nonessential amino acids
10 ml	100x Sodium pyruvat
135 µl	200 mM MgCl ₂
80 µl	100 mM CaCl ₂
10 ml	0,68 M Trisodium citrat, pH 7,6
2,1 g	Glycerol
ad 1000 ml	dH ₂ O

Zelllysispuffer für DNA	
10 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,5
10 mM	EDTA, pH 8,0
0,5%	SDS

Zelllysispuffer für Proteinlysate	
800 µl	Glycerol
200 µl	5x IP/ MLB-Lysispuffer

10 µl	Protease Inhibitor Cocktail
10 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail I
10 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail II

Quenching-Puffer für Immunfluoreszenz

75mM	NH ₄ Cl
20mM	Glycin
	In PBS

Zellkulturmedium

98%	DMEM
10%	FCS inaktiviert
1%	Pen/Strep
1%	Nichtessenzielle Aminosäuren

Einfriermedium für Zellen

70%	DMEM
20%	FCS inaktiviert
10%	DMSO

Nukleäre Extrakte

Puffer A	10 mM	Hepes, pH 7,9
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
	1%	Protease Inhibitor Cocktail
	1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail I
	1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail II

Puffer C	20 mM	Hepes, pH 7,9
	0,4 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1%	Protease Inhibitor Cocktail
	1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail I
	1%	Phosphatase Inhibitor Cocktail II

Tab. 6: Puffer und Lösungen.**1.5 Geräte**

Gerät	Typ	Hersteller
Agarose Bildwandler	Molecular Imager Gel Doc XR System	BioRad, München D
Agarosegelkammer	sub-cell®GT	BioRad, München D
Automatischer Filmentwickler	Amersham Hyperprocessor	GE Healthcare, Buckinghamshire UK
Automatischer Zellzähler	Countess™ automated cell counter	Invitrogen, Paisley UK
Brutschrank	Hera cell 240	Thermo Electron Corporation, Langenselbold D
	Hera function line	Thermo Electron Corporation, Langenselbold D
Eismaschine		Ziegra GmbH, Isernhagen D

Elektrophorese-System	Mini-Protean-3-Gel-elektrophorese-System	BioRad, München D
	Sub-cell@GT	BioRad, München D
	# 20128695	Amersham Biosciences, Piscataway NJ USA
Filmkassette	BAS Cassette 2025	Fujifilm, Kleve D
Gefrierschrank	Heraeus freeze	Thermo Electron Corporation, Langenselbold D
Homogenisator	DiAx 900	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach D
Homogenisator	Silentcrusher M	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach D
Klingen für Mikrotom	Microtome Blades S 35	Feather Safety Razor Co. Ltd., Kita-Ku, Osaka J
Kühlschränke	KSR42	Siemens, Giengen a. d. Brenz D
Magnetrührer	MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach D
	MR80	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach D
Mikroskop	Axio Imager.A1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München D
	Axiover 40 CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München D
	MZ75	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar D
Mikrotom	HM 355	Microm GmbH, Walldorf D
Mikrowelle		Siemens, Traunreut D
Minizentrifuge	Microspin FV-2400	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg D
Neubauer® Zählkammer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen D
Paraffinbank		Leica Microsystems GmbH, Wetzlar D
PCR-spin		A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg D
pH-Meter	Inolab Ph720	WTW, Weilheim D
Scanner		Epson Deutschland GmbH, Meerbusch D
Schwenktisch	L40	Labinco, Breda, NL
Short plates	Mini Protean 3-System #1653308	BioRad, München D
Slidebox	HS 15994E	Roth, Karlsruhe D
Sonicater	Sonopuls	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin D
Spacer plates	Mini Protean 3-System #1653311	BioRad, München D
Spektrophotometer	2001	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld D
Sonicater	Spectrometer ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen D
Stoppuhr		Roth, Karlsruhe D
Stromquelle	E143	Consort, Turnhout Be
	E844	Consort, Turnhout Be
	PowerPac basic	BioRad, München D
Thermocycler	Primus 96 plus	Eurofins MWG Operon, Ebersberg D
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City CA, USA
	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg D
Thermomixer	compact	Eppendorf, Hamburg D
Tischbank	Laborsystem mc6	Waldner Laboreinrichtungen, Wangen D

Tischschüttler	STR8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München D
		Ing.büro CAT M. Zipperer, Staufen D
Transferapparat	Mini Trans-Blot Cellfer	BioRad München D
Vortexer	Reaxtop	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach D
Waage	BP2100S	Sartorius, Göttingen D
Wasserbad	SPEL	Daglet Patz, Wankendorf D
Westernblot System		BioRad, München D
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg D
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg D
Zentrifuge	Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg D
Zellbank	Hera safe	Thermo Electron Corporation, Langensfeld D

Tab. 7: Geräte.

1.6 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München D
AxioVision	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München D
Canvas	Scientific Solutions, Pully-Lausanne CH
CoralDraw	Coral Corporation, Unterschleißheim D
Graph Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA
Microsoft Office	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim D
Quantity One 4.5.3	Bio Rad, München D
WinRead	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld D

Tab. 8: Software.

2. Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Herkunft

Maus	Herkunft
<i>ELa-TGFα-hGH</i>	AG Sandgren [141]
<i>Trp53^{loxP/loxP}</i>	AG Anton Berns [79]
<i>Ptfla-cre^{ex1}</i>	[120]
<i>Rela^{loxP/loxP}</i>	Eigene Generierung
<i>ELa-TGFα Trp53^{Apanc}</i>	Eigene Kreuzung
<i>ELa-TGFα Trp53^{Apanc} Rela^{Apanc}</i>	Eigene Kreuzung

Tab. 9: Mausherkunft.

2.1.2 Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte im ZPF-Tierstall des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München. Es wurden jeweils drei bis vier Mäuse in einzelbelüfteten IVC-Käfigen Typ 1 mit Weichholzfaserstroh bei 20-24°C Raumtemperatur und 35-55% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Versorgung erfolgte mit Leitungswasser und dem Standardfuttermittel der Firma Altromin®. Die Versuchstiere wurden täglich auf klinische Krankheitszeichen hin untersucht [50] und, nach Einschätzung der Tierpfleger, bei schweren Verletzungen, Erreichen eines hyperakuten Allgemeinzustandes oder Verschlechterung des Allgemeinzustandes trotz Behandlung zur Euthanasie vorbereitet. Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des lokalen Tierschutzkomitees durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern bewilligt und genehmigt.

2.1.3 Behandlung mit BrdU

BrdU ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin und dient der Markierung proliferierender Zellen. Es wird durch die DNA-Polymerase in der S-Phase des Zellzyklus in phosphorylierter Form anstelle von dTTP in die neu synthetisierte DNA eingebaut. BrdU dient der Identifikation sich teilender Zellen durch Braunfärbung der Zellkerne nach immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern.

Den Versuchstieren wurde nach Ermittlung des Gewichts 10µl/g Körpergewicht mit Natriumchlorid 1:10 verdünntes BrdU intraperitoneal über eine 35G-Nadel injiziert. Die Tiere wurden anschließend zwei Stunden bis zur Euthanasie und Sektion im Käfig gehalten.

2.1.4 Gewebeentnahme

Das Versuchstier wurde gewogen und in einem luftdichten Glas mit einer Überdosis Isofluran eingeschläfert. Nach Fixieren des Tieres auf einem Brett, wurde eine ca. 0,5cm lange Schwanzspitze zur Nachgenotypisierung abgetrennt und in einem Eppi aufbewahrt. Danach wurde das Tier mit 70% Ethanol besprüht um oberflächliche Keime abzutöten und mit einer langen medianen Laparotomie eröffnet. Es folgte die Inspektion nach Aszites, metastatischen Absiedlungen, vergrößerten Lymphknoten und makroskopischen Auffälligkeiten. Darauf folgend wurden das Pankreas und seine umliegenden Strukturen mit Pinzette und Gewebeschere freipräpariert. Das Pankreas wurde *in situ* auf makroskopische Veränderungen hin begutachtet, mit Milz und Duodenum entfernt, und dann isoliert mit einer Feinwaage

gewogen. Gewebestückchen aus Kopf, Korpus und Schwanz des Pankreas wurden entfernt und in einer Petrischale im Kühlschrank bei 4°C auf Eis bis zur Isolation von Tumorzellen gelagert. Anschließend wurden jeweils drei Gewebestückchen aus unterschiedlichen Pankreasanteilen entnommen und drei Gewebestückchen verschiedener Lokalisation für RNA-Analysen auf ein Eppi mit RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol sowie für Protein-Analysen auf drei Röhrchen verteilt. Alle Eppis wurden sofort in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Das restliche Pankreas wurde mit Duodenum, Milz, einem Teil der Leber und auf Metastasen verdächtige Organstücke auf einer Immunhistokassette sorgfältig platziert und in 4% PFA für einen Tag im Kühlschrank bei 4°C fixiert. Gewicht, Alter, Geschlecht, Genotyp sowie alle Auffälligkeiten bei Resektion wurden dokumentiert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Materialien wurden steril verwendet bzw. Materialien wie Glas und Plastikgefäße autoklaviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in befeuchteten Begasungsbrutschränken bei 37°C und 5% CO₂. Mediumwechsel wurde bei Primärkulturen ca. alle zwei, bei Zelllinien ca. alle drei Tage durch Absaugen des alten Mediums und Zugabe von neuem Kulturmedium mit Raumtemperatur durchgeführt. Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung kontrolliert und bei subkonfluenter Bewachung passagiert.

2.2.2 Isolation von Tumorzellen aus Gewebe

Die Organe wurden schnellstmöglich entnommen und in einer Petrischale auf Eis gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert, in einem Falcon mit 10ml Digestionspuffer resuspendiert und 10min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Zellen aus umliegendem Bindegewebe und ihrem Zellverband zu lösen. Nach 5min Zentrifugation des Resuspendats bei 22°C und 1.200rpm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das verbliebene Pellet wurde ein weiteres Mal in 10ml Digestionspuffer resuspendiert, nochmals 10min bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 10ml Dilutionspuffer plus OTI resuspendiert und durch einen Cellstrainer der Porengröße 100 μ m gefiltert. Größere Gewebeteile wurden vorsichtig mit dem Kolben einer 10ml Spritze durch den Filter gedrückt und das Zellsuspendat nochmals gefiltert. Das Filtrat

wurde daraufhin bei 22°C und 1.200rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml Kulturmedium aufgenommen und in eine beschriftete 25cm² Kulturflasche mit 6ml Kulturmedium überführt. Die Tumorzellen wurden durch leichtes Schwenken auf dem Boden der Kulturflasche verteilt und schließlich im Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte am folgenden Tag, danach zwei bis drei Mal pro Woche bis sich ein Zellrasen gebildet hatte.

2.2.3 Zellkultivierung und Zellpassage

Sobald Zellen zu einem subkonfluenten Monolayer herangewachsen waren, erfolgte das Trypsinieren: Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 10ml sterilem PBS mit Raumtemperatur gewaschen. Abhängig von der Flaschengröße wurde danach 1ml (bei 25cm² -Flasche), 3ml (bei 75cm² -Flasche) oder 5ml (bei 175cm² -Flasche) Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 3-5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die Zellen sowohl vom Boden als auch voneinander abzulösen. Unter dem Mikroskop wurde bei 10-facher Vergrößerung die Ablösung der Zellen kontrolliert und das Trypsin durch Resuspendieren mit 10ml Kulturmedium inaktiviert. Das Resuspendat wurde in einem Falcon bei 22°C und 1.500rpm 10min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 1-5ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine oder mehrere neue beschriftete Kulturflaschen gesplittet. Jede Kulturflasche wurde auf 7ml (bei 25cm² -Flasche), 15ml (bei 75cm² -Flasche) oder 30ml (bei 175cm² -Flasche) mit Kulturmedium aufgefüllt und die Zellen durch vorsichtiges Schwenken auf dem Flaschenboden verteilt. Die Zellen wurden dann weiter im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Passagieren erfolgte je nach Dichte des Zellrasens etwa zwei Mal pro Woche, jedoch höchstens bis zur 25. Passage.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Kultivierte Zellen wurden mit 10ml sterilem 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen mit 2-10ml 4°C kaltem Kulturmedium resuspendiert und in einem Falcon bei 4°C und 1.500rpm 10min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 2ml Einfriermedium resuspendiert und jeweils 1ml in zwei beschriftete Kryogefäße überführt. Diese wurden dann bei -80°C eingefroren und gelagert.

Die gefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Entfernung des DMSO im Einfriermedium wurden die Zellen bei 22°C und 1.500rpm 10min zentrifugiert, anschließend

in Kulturmedium resuspendiert und zur Kultivierung in 175cm²-Flaschen überführt. Nach ca. 24Std. erfolgte ein Mediumwechsel um abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.2.5 Isolation von DNA aus Zelllinien

Die Isolation von DNA erfolgte aus 175cm²-Kulturflaschen subkonfluenten Bewachsung. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 20ml sterilem 4°C kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen trypsinisiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese mit 10ml sterilem 4°C kaltem PBS resuspendiert und bei 4°C und 1.500rpm 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 4°C kaltem PBS nochmals resuspendiert, in ein Eppi überführt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet, nach Verwerfen des Überstandes, in 1ml DNA-Lysepuffer resuspendiert und das Lysat in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.6 Isolation von nukleären Extrakten

Für die Isolation von nukleären Extrakten wurden jeweils zwei bis drei subkonfluent bewachsene 175cm²-Kulturflaschen pro Zelllinie benötigt. Während des kompletten Versuchs wurden die Proben, alle Puffer, Reagenzien und Gefäße auf Eis gelagert.

Die Isolation von nukleären Extrakten erfolgte nach dem Protokoll des Nuclear Extracts Preparation Kit von Actif Motive. Nach Protokoll wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 5ml 4°C kaltem PBS mit Phosphatase Inhibitoren gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in 3ml 4°C PBS mit Phosphatase Inhibitoren aufgenommen. Es folgte das Zentrifugieren bei 4°C und 500rpm für 5min. Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 500µl kaltem hypotonem Puffer resuspendiert und in ein neues Eppi überführt. Nach 15-minütigem inkubieren auf Eis wurde anschließend 25µl Detergenz dazugegeben, 10sec auf höchster Stufe gevortext und bei 4°C und 14.000rpm 30sec zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die zytoplasmatische Fraktion befand, wurde in ein neues Eppi überführt, bei 4°C und 14.000rpm 20min zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Proben konnten dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert werden.

Um nukleäre Extrakte zu erhalten wurde das Pellet in 50µl komplettem Lysepuffer resuspendiert, 10sec auf höchster Stufe gevortext und 30min im Kühlraum bei 4°C und 150rpm auf einem Schüttler eluiert. Nach 10sec Vortexen auf höchster Stufe wurde die

nukleäre Fraktion ein weiteres Mal bei 4°C und 14.000rpm 10min zentrifugiert. Schließlich wurden die Kernproteine im Überstand in ein neues Eppi überführt und mit Hilfe des Sonicaters für jeweils 30sec zusätzlich homogenisiert. Die Proben wurden nach Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.7 Isolation von Proteinen aus Zelllinien

Die Isolation von Proteinen erfolgte aus subkonfluent bewachsenen 175cm²-Flaschen. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 20ml sterilem 4°C kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen trypsiniert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese mit 10ml sterilem 4°C kaltem PBS resuspendiert, in einem Falcon bei 4°C und 1.500rpm 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 4°C kaltem PBS resuspendiert, in ein Eppi überführt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurde das Pellet, nach Verwerfen des Überstands, in Proteinlyse-puffer resuspendiert. Das Lysat wurde in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert.

2.2.8 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf einem Culture-Slide ausgesät und kultiviert. Bei subkonfluenter Bewachung wurden die Zellen 5min mit PBS gewaschen und anschließend für 15min in 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Auswaschen des PFA für 5min mit PBS wurden die Zellen 10min mit Quenching-Puffer 10min, und anschließend zur Permeabilisation in 3% BSA und 0,1% TritonX-100 in PBS 15min inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit 5% Blocklösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde anschließend über Nacht bei 4°C aufgebracht. Die nicht gebundenen Antikörper wurden drei Mal 5min mit PBS ausgewaschen und 5min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit HRP-konjugat Stocklösung (TSA-Kit) 1:1.000 inkubiert. Nach drei Mal 5min Auswaschen mit PBS wurden die Zellen mit TSA-Kit 1:200 5min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mit TBS-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Kerne mit Sytox Green 1:10.000 in TBS für 10min angefärbt. Es folgte das Einbetten in Mountingmedium und Eindecken.

Schema:

Blocklösung 5%	Puffer		Inkubationszeit
Ziegen Serum	1% BSA +0,1% TritonX-100 +1% Saponin in PBS		1 Std. bei RT

1. Antikörper	Typ	Wirt	Verdünnung	Inkubationszeit
p65	polyklonal	Hase	1:100	1 Nacht bei 4°C

2. Antikörper	Puffer	Verdünnung	Inkubationszeit
anti-Hase in Ziege	5% Blocklösung	1:500	1 Std. bei RT

Tab. 10: Materialien Immunfluoreszenz.

2.2.8.1 Antikörper

1. Antikörper	#	Hersteller
p65	Sc-109	Santa Cruz, Heidelberg D

2. Antikörper	#	Hersteller
anti-Hase in Ziege	BA 1000	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA

Tab. 11: Antikörper für Immunfluoreszenz.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Fixierung

Um Autolyse zu verhindern, Gewebe in seinem Zustand möglichst natürlich zu erhalten und seine ursprüngliche Architektur beurteilen zu können, wurde das frische Gewebe in mit PBS gepufferter 4% PFA-Lösung bei 4°C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde die PFA-Lösung durch PBS ersetzt.

2.3.2 Entwässerung von Gewebe

Nach Auswaschen der Fixierlösung in PBS für einen Tag wurden die Präparate zur Entwässerung in das Pathologische Institut des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gebracht. Dort wurde das fixierte Gewebe schrittweise in aufsteigender Alkoholreihe routinemäßig vollständig entwässert.

2.3.3 Anfertigung von Paraffingewebeschnitten

Die Einbettung des Gewebes erfolgte in 65°C flüssigem Paraffin, mit welchem das Gewebe in Blöcke eingegossen wurde. Nach Aushärtung des Paraffins wurden die Blöcke, um diese

besser schneiden zu können, im Kühlschrank bei -20°C für mindestens eine Stunde abgekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden dann 3-4µm dicke Schnitte angefertigt und im Wasserbad bei 45°C gestreckt um sie anschließend glatt auf beschichtete Objektträger aufzuziehen. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.4 H&E-Färbung

Die H&E (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung ist eine Routinefärbung zur Differenzierung einzelner Gewebe- und Zellkomponenten, bei der Hämatoxylin basophile Strukturen wie Zellkerne, DNA und Zytoplasmabestandteile blau-violett färbt, während Eosin azidophile Strukturen wie das Zytoplasma und die extrazelluläre Matrix rosa färbt.

Um das Paraffin zu entfernen wurden die Schnitte in Xylol zwei Mal 5min entwacht und in absteigender Alkoholreihe (jeweils zwei Mal 3min 99,8%, 96%, 70%) bis zum dH₂O hydratisiert, gefolgt von 10min Färbung in dem Hämatoxylinerivat Hämalaun und 10min Spülen bei laufendem Wasser. Anschließend wurde 5min mit Eosin gegengefärbt, die Schnitte jeweils 25sec in 96% Ethanol und Isopropanol gewaschen und schließlich zwei Mal 3min in Xylol eingelegt. Danach konnten die Schnitte mit Pertex fixiert werden.

2.3.5 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen nutzen das Binden von spezifischen Antikörpern an Gewebe- oder Zellantigene, die deren Nachweis und Lokalisation unter dem Mikroskop möglich machen. In dieser Arbeit wurde die Streptavidin-Biotin-Methode als die sensitivste verschiedener Methoden verwendet. Die Streptavidin-Biotin-Methode ist eine indirekte Nachweismethode in drei Schritten, welche die starke Bindungsaffinität von Avidin zu Biotin für die Kopplung von enzymmarkiertem Avidin mit biotinylierten Sekundärantikörpern nutzt. Hierfür wird im ersten Schritt ein Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen angebracht, wobei der biotinylierte Sekundärantikörper im zweiten Schritt als Brückenantikörper fungiert. An diesen Brückenantikörper bindet im dritten Schritt wiederum der enzymmarkierte Avidin-Komplex. Dabei wird das farblose Substrat Wasserstoffperoxid durch Elektronenübertragung auf das Chromogen DAB reduziert. Gleichzeitig fällt DAB zu einem bräunlichen Produkt aus und färbt damit die ursprünglich mit dem Primärantikörper markierten Strukturen an.

Die Schnitte wurden zwei Mal 5min in Xylol eingelegt um das Paraffin zu entfernen und anschließend in absteigender Alkoholreihe (99,8%, 96%, 70%) jeweils zwei Mal 3min bis

zum dH₂O hydratisiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um Antigene zu demaskieren wurden die Schnitte mit Antigendemaskierungslösung in der Mikrowelle 10min bei 600W zum Kochen gebracht und danach 20min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach zwei Mal 5min Waschen mit dem jeweiligen Puffer wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubieren in frisch angesetzter 3% H₂O₂ für 15min blockiert und anschließend nochmals zwei Mal 5min mit Puffer gewaschen. Um das unspezifische Binden von Antikörpern zu blockieren, wurden die Schnitte für eine Stunde in 5% Serum-Blocklösung inkubiert. Darauf folgte das Anbringen des Primärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C über Nacht. Daraufhin wurden nicht gebundene Antikörper zwei Mal 5min mit Puffer ausgewaschen, gefolgt von Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper 1:500 in Blocklösung für eine Stunde. Nach 30min wurde die ABC-Lösung nach Herstellerprotokoll angesetzt und bis zur Anwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Schnitte wurden nochmals zwei Mal 5min mit Puffer gewaschen und mit ABC-Lösung 30min inkubiert, welche den Avidin-Biotinperoxidase-Komplex zur Bindung des Sekundärantikörpers enthielt. Nach 5min Waschen mit dH₂O wurde DAB für ca. 2min nach Herstellerprotokoll aufgebracht und danach wieder mit dH₂O ausgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin für 1-2sec gegengefärbt, 10min unter laufendem Leitungswasser gespült, zwei Mal 30sec in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 70%, 96%, 99,8%) dehydriert, zwei Mal 3min in Xylol eingelegt und schließlich eingedeckt.

Schema:

1. Antikörper	Typ	Wirt	Verdünnung	Inkubationszeit
BrdU	monoklonal	Ratte	1:250	1Std. bei RT
Cleaved Caspase 3	polyklonal	Hase	1:300	1 Nacht bei 4°C
Cyclin D1	monoklonal	Hase	1:300	1 Nacht bei 4°C
α-Amylase	polyklonal	Hase	1:500	2 Nächte bei 4°C
Cytokeratin 19	monoklonal	Ratte	1:250	16 Std. bei 4°C
Vimentin	polyklonal	Ziege	1:100	1 Nacht bei 4°C
E-Cadherin	monoklonal	Maus	1:50	1 Nacht bei 4°C

Färbung	2. Antikörper	Blocklösung 5%	Puffer
BrdU	anti-Ratte in Hase	Hasenserum	PBS
Cleav.Caspase 3	anti-Hase in Ziege	Ziegenserum	TBS-T
Cyclin D1	anti-Hase in Ziege	Ziegenserum	TBS-T
α-Amylase	anti-Hase in Ziege	Ziegenserum	PBS
Cytokeratin 19	anti-Ratte in Hase	Hasenserum	PBS
Vimentin	anti-Ziege in Hase	Hasenserum	TBS
E-Cadherin	anti-Maus in Ziege	Ziegenserum	PBS

Tab. 12: Antikörper Immunhistochemie.

2.3.5.1 Antikörper

1. Antikörper	#	Hersteller
BrdU	MCA2060	Serotec, Düsseldorf D
Cleaved Caspase 3 (Asp175)	9661	Cell Signalling, Boston MA, USA
Cyclin D1 (Clone SP4)	RM-9104-S0)	Lab Vision, Fremont CA, USA
α -Amylase	A8273	Sigma-Aldrich, München D
Cytokeratin 19	TROMA-III	Hybridoma Bank, Iowa City Iowa, USA
Vimentin	Sc-7557)	Santa Cruz, Heidelberg D
E-Cadherin	610181	BD Biosciences, San Jose CA, USA

2. Antikörper	#	Hersteller
anti-Ratte in Hase	BA 4000	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
anti-Hase in Ziege	BA 1000	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
anti-Ziege in Hase	BA 5000	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA
anti-Maus in Ziege	BA 9200	Vector Laboratories, Burlingame CA, USA

Blocklösung 5%	#	Hersteller
Hasenserum	R9133	Sigma-Aldrich, München D
Ziegenserum	G9023	Sigma-Aldrich, München D

Tab. 13: Material Immunhistochemie.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolation von DNA aus Mausschwänzen

Zur Isolation von DNA wurden zu der ca. 0,5cm langen Mausschwanzspitze 250 μ l DirektPCR®-Tail komplettiert mit 50 μ l Proteinase K gegeben und bei 55°C über Nacht in einem Thermomixer bis zur kompletten Lyse des Gewebes inkubiert. Vor dem Genotypisieren wurde das Lysat am nächsten Tag 45min bei 85°C erwärmt und anschließend ca. 10min bei 22°C und 13.200rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für die nachfolgende PCR verwendet.

2.4.2 Isolation von DNA aus Pankreasgewebe

Die Isolation von DNA aus Gewebe erfolgte mit Hilfe des Dneasy® Tissue Kit. Hierzu wurde -80°C gefrorenes Gewebe auf Eis aufgetaut, etwa 25g Gewebe nach Protokoll in kleine Stücke geschnitten und mit 180 μ l Puffer ATL versetzt. Daraufhin wurde das Gewebe mit 25 μ l Proteinase K bis zur vollständigen Lyse bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Nach Vortexen für 15sec wurde Puffer ATL und 96% Ethanol hinzugegeben und das Lysat nach jedem Schritt gevortext. Anschließend wurde das Lysat in Minizentrifugenröhrchen überführt und diese in 2ml Sammelröhrchen bei Raumtemperatur und 6.000rpm 1min zentrifugiert. Der

Überstand wurde samt Sammelröhrchen verworfen und das Lysat in einem neuen Sammelröhrchen mit 500µl Puffer AW1 nochmals bei Raumtemperatur und 6.000rpm 1min zentrifugiert. Der Überstand im Sammelröhrchen wurde wieder verworfen und das Zentrifugenröhrchen in ein neues Sammelröhrchen überführt. Um die DNeasy-Membran zu trocknen und Kontakt zwischen Lysat und Ethanol zu vermeiden wurde dieses bei Raumtemperatur und 20.000rpm 3min zentrifugiert. Schließlich wurde das Zentrifugenröhrchen ein weiteres Mal in ein neues Sammelröhrchen überführt und 200µl Puffer AE direkt auf die DNeasy-Membran pipettiert. Nach Inkubieren bei Raumtemperatur wurde das Eluat zweimalig bei Raumtemperatur und 6.000rpm 1min zentrifugiert. Für PCR-Analysen konnte die isolierte DNA dann routinemäßig verwendet werden.

2.4.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Amplifizierung von selektiven DNA-Abschnitten zur molekulargenetische Analyse. Dabei polymerisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase mit Hilfe zweier Oligonukleotidprimer einen DNA-Einzelstrang zu einem DNA-Doppelstrang. Hier wurde die PCR zur (Nach-)Genotypisierung herangezogen. Dazu wurde folgende Lösung angesetzt:

Ansatz für 25µl	
10,5µl	dH ₂ O
0,5µl	Primer 1
0,5µl	Primer 2
12,5µl	RedTaq Ready Mix
1,0µl	DNA

Tab. 14: Ansatz für PCR.

Alle PCR's wurden in einem Thermocycler nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt:

Reaktionsbedingungen	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	93°C	5min	
Denaturierung	93°C	1min	25-40 Zyklen
Annealing, je nach Primer	ca. 65°C	1min	
Elongation	72°C	2min	
Finale Polymerisation	72°C	10min	

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

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Längenbestimmung von DNA-Proben. Dabei werden diese neben einem Längenstandard aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode, das Agarosegel dient als Molekularsieb. Je kleiner das DNA-Molekül, desto schneller bewegt es sich durch die Gelmatrix, sodass eine Auftrennung nach der DNA-Molekülgröße möglich wird. Durch ein Spektrometer können die DNA-Proben anschließend visualisiert werden, da das zugesetzte Ethidiumbromid, ein Fluoreszenzfarbstoff der zwischen die Basen der DNA interkaliert, durch UV-Bestrahlung spezifischer Wellenlänge angeregt wird und dadurch sichtbar gemacht werden kann.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde Agarosepulver in TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufgekocht. Die Agarosekonzentration von 1% bis 3% wurde dabei abhängig von der Länge der DNA-Fragmente gewählt und beeinflusste gemeinsam mit der Laufzeit und Stromstärke die Trennschärfe. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Lösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,1µl/ml versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Taschen wurden nach vollständigem Aushärten des Gels mit 10µl eines Längenstandardmarkers und jeweils 13µl PCR-Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurde bei 3-6V/cm durchgeführt. Die Visualisierung der Fragmentlängen erfolgte durch UV-Bestrahlung bei 302nm im BioRad-Reader. Das Ergebnis wurde mit einer LCD-Kamera festgehalten, die Größenanalyse folgte anschließend mit Hilfe des Gel Doc XR-Systems. Die Länge der Fragmente entspricht dabei dem Abstand zwischen den Primern summiert mit deren Länge.

2.4.4.1 Primer

Primer	Basensequenz
Cre487 sense:	5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CCA A-3'
p48as1642 antisense:	5'-CCT CGA AGG CGT CGT TGA TGG ACT GCA-3'
p53-loxP-1 sense:	5'-CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G-3'
p53-loxP-2 antisense:	5'-AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC-3'
p65loxP1 sense:	5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3'
p65loxP2 antisense:	5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3'
TGFα hGHI-1 antisense:	5'-GGC TTT TTG ACA ACG CTA TG-3'
TGFα hGHI-2 sense:	5'-TAG GAG GTC ATA GAC GTT GC-3'

Hersteller	
Eurofins MWG Operon	Ebersberg D

Tab. 15: Primer der PCR.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinlysate

Für die Proteinlysate wurden bei -80°C gelagerte Gewebestücke auf Eis aufgetaut und mit dem Skalpell zerkleinert. IP bzw. MLB-Puffer wurde 1:5 mit 10% Glycerol und mit jeweils 1:100 Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail I und II, kurz vor Zugabe zum Gewebe, versetzt. Davon wurden zur Aufspaltung der Zellen und Isolierung der Proteine $600\mu\text{l}$ zu jeder Probe gegeben, mit Hilfe eines Homogenisators ca. 5sec homogenisiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei 4°C und 13.200rpm 10min zentrifugiert, so dass sich das Proteinlysate im Überstand befand. Dieser wurde für die folgende Diagnostik verwendet.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BioRad Protein-Assay nach der modifizierten Methode von Bradford [14]. Dabei führt die Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G-250 mit dem Proteinlysate bei Zugabe zu einer Farbänderung, welche durch Absorptionsmessung bei 595nm gemessen werden kann. Als Referenz dient die Farbänderung bei Standardkonzentrationen. Da die Farbänderung proportional der Proteinkonzentration ist, kann sie durch geeignete Software berechnet werden.

Das Protein Assay Dye Reagent wurde 1:5 verdünnt, davon jeweils $250\mu\text{l}$ mit $5\mu\text{l}$ der 1:10 mit dH_2O verdünnten Proben in einer 96-Well-Platte gemischt und ca. 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert diente dH_2O , als Standard wurde BSA (1mg/ml) mit den Volumina $1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, $4\mu\text{l}$, $6\mu\text{l}$ und $8\mu\text{l}$ verwendet. Die Extinktion der Lösung wurde bei 595nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe von Kalibriergeraden berechnet. Es wurden jeweils drei Wells pro Probe gemessen um die Pipettiergenauigkeit zu kontrollieren und größere Abweichungen zu identifizieren. Die Proteinkonzentration konnte anschließend mit Vergleich einer aus der Konzentration des Standards gewonnenen Referenzkurve ermittelt werden. Daraus wurde bei annähernd gleichen Werten der Mittelwert errechnet. Bei zu großen Schwankungen zwischen den Werten wurde der Versuch wiederholt. Aus den erhaltenen Mittelwerten wurde das Proteinlysate auf eine definierte Zielkonzentration eingestellt. Das benötigte Volumen wurde durch Verdünnen mit dH_2O und Lämmli-puffer hergestellt, durch Erhitzen auf 95°C für 5min aktiviert und anschließend bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen dient die SDS-PAGE, eine aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehende Gelmatrix. Acrylamid bildet bei Anwesenheit von Radikalen in einer Kettenreaktion lange Polymere, welche mit Hilfe von Bisacrylamid vernetzt werden. Das Detergens SDS wird im Überschuss hinzugegeben, um an die Proteine zu binden. Durch Bindung von SDS an Proteine werden diese negativ geladen und wandern im elektrischen Feld, dabei folgt die Auftrennung nach ihrer Proteingröße. Für die optimale Bandschärfe wird die SDS-PAGE diskontinuierlich durchgeführt.

Das engporige Trenngel wurde nach Rezept hergestellt und bläschenfrei zwischen zwei fettfreie, saubere Glasplatten mit Abstandshalter 1,5mm dick gegossen. Die Konzentration des Gels wurde abhängig von der Größe der untersuchten Proteine gewählt, um die optimale Bandenschärfe im untersuchten Molekulargewichtsbereich zu erreichen. Dabei ist der Anteil des Acrylamids am Gesamtvolumen umgekehrt proportional der Proteingröße. Die Initiation der Polymerisation erfolgte durch den Radikalstarter APS, katalysiert wurde die Reaktion durch TEMED. Das Trenngel wurde anschließend für ca. 30min bis zur vollständigen Auspolymerisation mit dH₂O überschichtet um eine gerade Oberfläche zu erhalten und Austrocknung zu verhindern. Danach wurde das dH₂O abgegossen, das freie Volumen mit weitporigem Sammelgel aufgefüllt und ein Geltaschenkamm mit zehn Taschen eingesetzt. Nach weiteren 30min war das Sammelgel auspolymerisiert und der Geltaschenkamm konnte vorsichtig entfernt werden. Die Gelmatrix wurde daraufhin in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Taschen dort erst mit dH₂O, dann mit Laufpuffer ausgespült.

Die Proteinproben wurden durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C mit anschließender Zentrifugation bei 13.200rpm für 10sec aktiviert. Darauffolgend wurden die Geltaschen jeweils mit definierter Proteinmenge von 30µl-60µl beladen; eine Spur wurde mit 10µl Marker belegt. Um in allen Taschen sowohl gleiche Proteinmenge als auch gleiches Volumen zu erhalten, wurden die Taschen mit Lämmli-puffer auf das definierte Volumen aufgefüllt. Die Elektrophoresekammer wurde nun mit Laufpuffer gefüllt und eine konstante Spannung von 70V angelegt um die Proteine ins Sammelgel zu transferieren. Die Auftrennung erfolgte dann, je nach Gelkonzentration, bei 90-145V, bis die Proteine vollständig das Trenngel durchlaufen hatten.

2.5.4 Westernblot-Analyse

Bei der Westernblotanalyse werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen („geblottet“), um sie dann immunhistochemisch sichtbar zu machen. Zur Fixierung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran, bei sehr kleinen Proteinen auch auf Nitrocellulose-Membran, wurde ein vertikales Tank-Blot-System (Mini Trans-Blot) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Gelkassette zerlegt, die Glasplatten vorsichtig mit einem Plastikspatel auseinander gehobelt, das Sammelgel sorgfältig abgetrennt und das proteinbeladene Gel in Transferpuffer gelegt. Vor Verwendung wurde die PVDF-Membran 15sec bis 1min in 100% Methanol aktiviert (dieser Schritt entfiel bei Verwendung von Nitrocellulose-Membran), in dH₂O hydrophilisiert und anschließend mit dem zu blottenden Gel und vier Whatman-Filterpapieren in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde für den Nasstransfer ein Blotsandwich, wie folgt, luftblasenfrei auf der Blotkassette geschichtet:

2 Whatmanpapiere
PVDF- oder Nitrocellulose-Membran
Gel
2 Whatmanpapiere

Zwischen die Lagen wurde jeweils Transferpuffer aufgebracht und schließlich mit einem Plastikspatel leicht über das Sandwich gerollt um die gleichmäßige Pufferverteilung zu gewährleisten und eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde die Blotkassette in die Blotkammer überführt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer wurde bei 350mA auf Eis für 2Std. durchgeführt. Dabei wanderten die Proteine aufgrund negativer Ladung des gebundenen SDS von der Kathode in Richtung Anode auf die Membran.

Bei der Semidry-Methode wurden PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran, Gel und puffergetränkte Whatmanpapiere in gleicher Weise zum Sandwich geschichtet, jedoch war der Aufbau selbst nicht von Puffer umgeben, d.h. halbtrocken (semidry). Die Spannung wurde durch zwei außen angelegte Elektrodenplatten erzeugt.

Um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran nach zwei Mal 5min waschen mit dH₂O für 10min mit Ponceau gefärbt. Nach Auswaschen des Ponceau mit dH₂O für zwei Mal 5min wurde die Membran mit der jeweiligen 5% Milch-Puffer-Blocklösung 1Std. bei Raumtemperatur zur Absättigung freier Bindungsstellen geschwenkt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primäntikörper in frisch angesetztem Puffer über Nacht bei 4°C für Puffer mit Milch, bei Raumtemperatur für Puffer mit BSA. Bei

Verwendung von 5% BSA als Puffer für den Primärantikörper wurde die Milch der Blocklösung zuvor zwei Mal 5min ausgewaschen. Am Folgetag wurde die Membran zehn Mal 5min mit Puffer gewaschen, anschließend 1Std. bei Raumtemperatur mit Peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, welcher in Verbindung mit Luminol eine Chemolumineszenzreaktion katalysiert, und erneut zehn Mal 5min mit Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Amersham ECL™ Western Blotting Reagents nach Herstellerprotokoll auf Amersham Hyperfilm™ ECL. Zur Kontrolle gleicher Proteinbeladung detektierten wir β -Actin, ein ubiquitär vorkommendes Zytoskelettprotein.

2.5.4.1 Wiederverwendung von Membranen

Eine Membran wurde dann ohne Vorbehandlung wieder verwendet, wenn der Sekundärantikörper bei erster Verwendung eine andere Wirtsherkunft aufwies als der Sekundärantikörper der zur nächsten Verwendung beabsichtigt wurde. Beispielsweise war bei erster Antikörperinkubation der Ursprung Hase, dann wurde auf diese Membran nur ein Antikörper mit Maus-Ursprung verwendet. Dabei wurde nach Detektion die Membran mit dem definierten Puffer gewaschen und nach obigem Protokoll verfahren. War die Membran schon ausgetrocknet, wurde diese (nur bei PVDF-Membran) vorher nochmals 15sec bis 1min mit 100% Methanol aktiviert und anschließend 5min in dH₂O gewaschen.

Um im zweiten Durchgang einen Antikörper mit gleicher Herkunft verwenden zu können, wurde die Membran vorher gestrippt, d.h. die Membran wurde drei Mal 10min mit Puffer gewaschen, anschließend mit Strippuffer inkubiert und dieser nach 30min nochmals drei Mal 10min mit Puffer ausgewaschen. Danach konnte der Primärantikörper nach Blocken und Waschen der Membran routinemäßig aufgebracht werden. Jede Membran wurde nicht öfter als zwei Mal gestrippt.

2.5.4.2 Antikörper

1. Antikörper	Größe [kD]	Hersteller	Puffer für 1. AK	Verdünnung	Beladung [μ g]
Cyclin D1 A-12	38	sc-8296, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
Cyclin E M-20	53	sc-48, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ TBS-T	1:500	45
PCNA PC-10	36	sc-56, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
Bcl-XL	30	# 2762, Cell Signalling, Boston MA, USA	5% Milch+ TBS-T	1:500	45
Bcl-2	28	# 2876, Cell signalling, Boston MA, USA	5% BSA+ TBS-T	1:500	45
Bcl-2	26	sc-23960, Santa Cruz,	5% Milch+ PBS-T	1:200	40

10C4		Heidelberg D			
p50	50 / 105	# 3035, Cell Signalling, Boston MA, USA	5% BSA+ TBS-T	1:500	40
p50 C-19	50 / 100	sc-1190, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
p53	53	CM5p, novocastra-Leica, Wetzlar D	5% Milch+ PBS-T	1:500	60
p65	65	# 3034, Cell Signalling, Boston MA, USA	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
p65 C-20	65	sc-372, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
IκBα	37	sc-371, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:1000	30
IκBβ	45	sc-945, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:1000	30
Survivin D-8	16,5	sc-17779, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ PBS-T	1:500	45
β-Actin (Clone AC-15)	46	A5441, Sigma-Aldrich, München D	5% Milch+ TBS-T	1:2000	45
Cleaved Caspase 3	10	IMG-5699, Imgenex, San Diego CA, USA	5% Milch+ TBS-T	1:1000	60
Lamin A/C H-110	62 / 69	sc-20681, Santa Cruz, Heidelberg D	5% BSA+ PBS-T	1:1000	45
CdK4 C-22	30	sc-260, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ TBS-T	1:300	45
CdK4 H-22	30	sc-601, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ TBS-T	1:300	45
c-myc Ab-5 (Clone 67P05)	64-67	Thermo Scientific, Dreieich D	5% Milch+ TBS-T	1:100	45
Mcl-1 S-19	32-40	sc-819, Santa Cruz, Heidelberg D	5% Milch+ TBS-T	1:1000	45

2. Antikörper	Hersteller
Maus	GE Healthcare, Buckinghamshire UK
Hase	GE Healthcare, Buckinghamshire UK

Tab. 16: Antikörper für Westernblot.

2.6 Angaben zur Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die Signifikanz anhand des student's t-Test berechnet, wobei ein Signifikanzniveau von 5% bzw. ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 als statistisch signifikant gewertet wurde.

III. ERGEBNISSE

1. Pankreasspezifische Inaktivierung des NFκB-Signalweges in der Maus

1.1 Generierung einer pankreasspezifisch *Rela*-defizienten Mauslinie unter Anwendung des *Cre-loxP*-Systems

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Rolle von konstitutiv aktiviertem NFκB, speziell des am häufigsten vorkommenden klassischen NFκB-Heterodimers bestehend aus den Untereinheiten p50 und RelA/p65, in der Onkogenese des duktales Pankreaskarzinoms. Hierzu etablierten wir eine Maus mit pankreasspezifischer Inaktivierung des NFκB-Signalwegs und verglichen diese mit einer Mauslinie mit intaktem NFκB-Signalweg. Beide Mauslinien unterschieden sich nur in diesem einen *Rela*-Gen-Knockout und ließen so Rückschlüsse auf spezifisch NFκB vermittelte Effekte in der Tumorentwicklung und dem Tumorprogress im murinen *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc}*-Modell zu.

Um den NFκB-Signalweg spezifisch im Pankreas zu inhibieren, wurde mit Hilfe des *Cre-loxP*-Systems eine konditionale Mutation mit Deletion der Exone 7 bis 10 im *Rela*-Gen generiert. Das *Rela*-Gen kodiert für das RelA/p65-Protein in Mäusen und dessen Exone 7 bis 10 für die sogenannte Rel homology domain (RHD), welche für die DNA-Bindung und Dimerisierung von RelA/p65 zuständig ist. Somit entstand ein funktionell inaktives NFκB-Protein, welches die Fähigkeit zur nukleären Translokation verloren hatte und folglich nicht mehr als Initiator der Transkription von Zielgenen fungieren konnte. In dieser Arbeit wurde das klassische NFκB-Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p50/RelA, untersucht und wird im Weiteren vereinfacht als NFκB bezeichnet.

Das *Ela-TGFα-hGH*-Modell wählten wir aufgrund seiner genetisch und pathomorphologisch ähnlichen Eigenschaften zum humanen Pankreaskarzinom. Aufgrund der häufigen Involvierung einer *Trp53*-Mutation im humanen Pankreaskarzinom (siehe Kapitel 2.2), generierten wir dieses murine Pankreaskarzinommodell mit zusätzlicher pankreasspezifischer Ablation des *Trp53*-Gens.

In einem ersten Schritt generierten wir das Referenzmausmodell. Hierfür kreuzten wir eine *Ela-TGFα-hGH*-Maus, welche uns von der AG Sandgren [141] zur Verfügung gestellt wurde, mit einer *Trp53^{Δpanc}*-Maus (Abb. 6A). Diese wiederum erhielten wir durch Kreuzung einer

Trp53^{loxP/loxP}-Maus, welche uns von der AG Berns [79] zur Verfügung gestellt wurde, mit einer pankreasspezifisch *Ptf1a*-Cre-Rekombinase exprimierenden (*Ptf1a-cre^{ex1}*) Maus. In dieser *Trp53^{loxP/loxP}*-Maus waren die Introns 1 bis 10 mit *loxP*-Sequenzen flankiert, um eine Deletion nahezu aller kodierender Sequenzen nach pankreasspezifischer Cre-Exzision zu gewährleisten und so ein funktionsunfähiges p53-Protein in diesen Zellen zu erzeugen. Die resultierende Mauslinie *Trp53^{loxP/loxP}; Ptf1a-cre^{ex1}* wird auch als *Trp53^{Δpanc}* bezeichnet. Die hervorgehenden Nachkommen weisen damit den *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc}*-Genotyp auf (Abb. 6A).

Um einen pankreasspezifischen *Rela*-Knockout mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems zu erzielen, werden zwei Mauslinien benötigt: Eine *Rela^{loxP/loxP}*- und eine *Ptf1a-cre^{ex1}*-Maus. Die Kreuzung dieser Mäuse führt über Aktivierung des Cre-Rekombinationssystems zur Exzision der *loxP*-markierten DNA-Sequenz des *Rela*-Gens. Zur Generierung der *Rela^{loxP/loxP}*-Maus wurde ein zweizeitiges Vorgehen genutzt, bei welchem parallel ein gefloxtes *Rela*-Gensegment generiert und in embryonalen Stammzellen *in vitro* deletiert wurde: Um die modifizierte *loxP*-Sequenz sowie die Selektionsmarkergene PGK-neo und TK in den *Rela*-Genlocus zu inserieren, wurde primär ein Vektor konstruiert. Zwei der *loxP*-Sequenzen flankierten *neo*, die dritte wurde zwischen den Exonen 10 und 11 des *Rela*-Gens eingebracht (Abb. 6B). Die Maus-*Rela*-Fragmente wurden aus einer 129/Sv Mausgenombibliothek in λDASHIII (Stratagene) isoliert. Das gefloxtes Fragment des *Rela*-Gens enthält die Exone 7 bis 10, welche für einen Teil der RHD kodieren (Abb. 6B). Die durch Elektroporation transfizierten embryonalen Stammzellen wurden mit G418 (0,2 mg/ml) selektiert und die Rekombinanten durch PCR-Analyse identifiziert. Eine der Rekombinanten wurde kultiviert und, um die Selektionsmarkergene zu deletieren und *Rela^{loxP/+}*-ES-Zellen zu generieren, sekundär mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor transfiziert. Die *Rela^{loxP/+}*-ES-Zellen wurden durch Southernblot mit einer Randprobe am 5'-Ende des Zielkonstrukts überprüft. Zwei *Rela^{loxP/+}*-ES-Zellklone wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Die Nachkommen mit dem höchsten Grad an Chimären wurden mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt, um homozygote *Rela^{loxP/loxP}*-Mäuse zu erhalten.

Damit diese Mutation spezifisch und ausschließlich im exokrinen Pankreas erzeugt wurde, konstruierten wir eine *Ptf1a-cre^{ex1}*-Maus. Dabei ersetzen wir Exon 1 durch das für Cre-kodierende Gen [120]. *Ptf1a* kodiert für das helix-loop-helix Protein p48, welches die sequenzspezifische DNA-bindende Untereinheit des trimerischen Pankreastranskriptionsfaktors 1 darstellt [89]. Die gewebespezifische p48-Untereinheit wird ab dem 9-10. Tag der

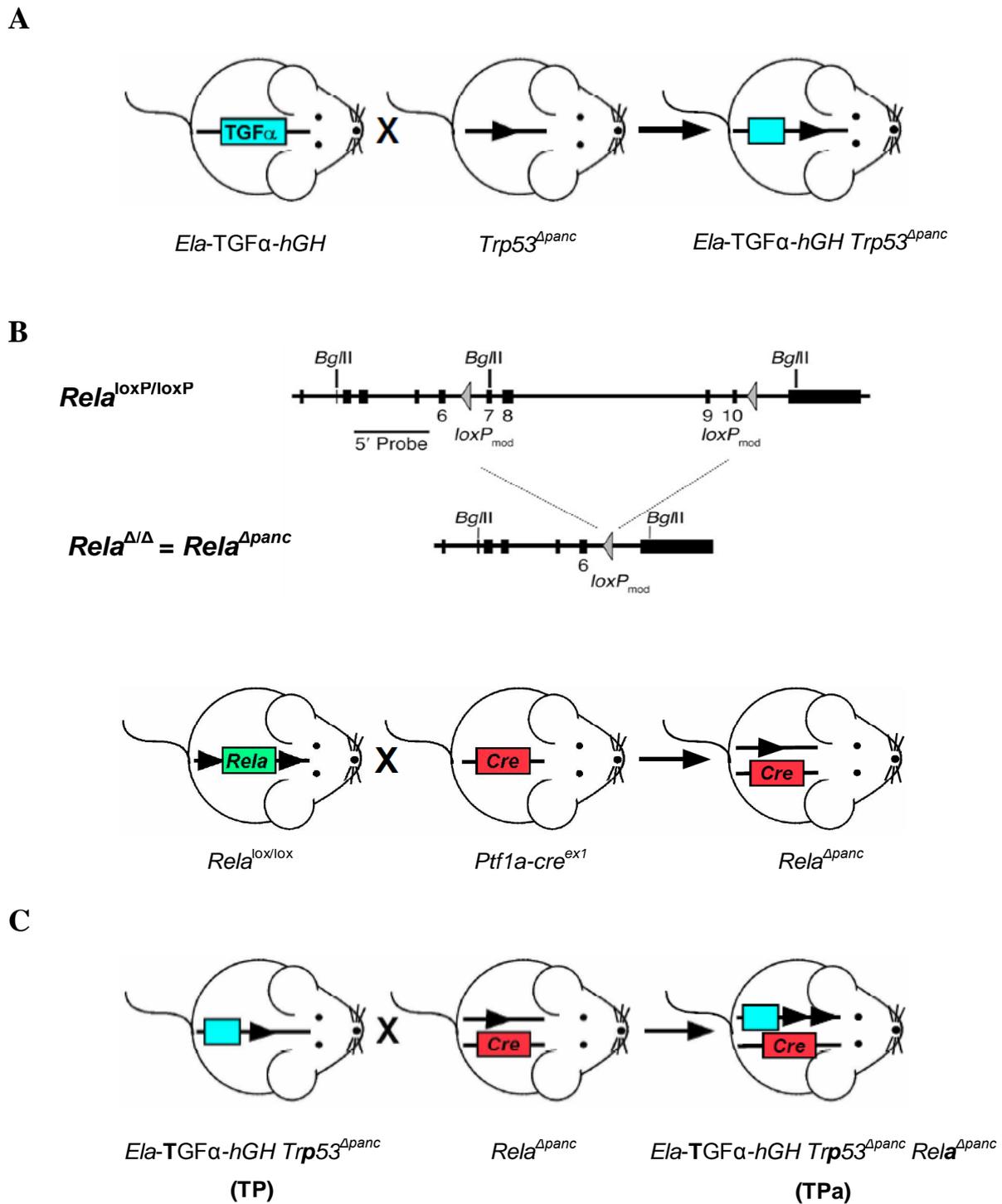


Abb. 6: Generierung einer pankreasspezifischen Inaktivierung von *Rela* mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems im *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc} Rela^{Δpanc}*-Modell.

(A) Generierung einer *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc}*-Maus durch Kreuzung einer *Ela-TGFα-hGH*- mit einer *Trp53^{Δpanc}*-Maus.

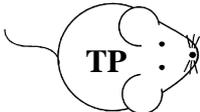
(B) Die Exone 7 und 10 des *Rela*-Gens, kodierend für die RHD, wurden mit identischen gleichgerichteten *loxP*-Sequenzen (▶) flankiert: *Rela^{loxP/loxP}*. Bei Kreuzung mit einer pankreasspezifischen *Ptf1a-cre^{ex1}*-Maus wurde das Gensegment zwischen beiden *loxP*-Sequenzen deletiert. Es entsteht ein loss-of-function *Rela*-Gen im Pankreas: *Rela^{Δ/Δ}*; zurück bleibt eine *loxP*-Sequenz. *loxPmod*, modifizierte *loxP*-Seite.

(C) Generierung einer *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc} Rela^{Δpanc}*-Maus durch Kreuzung einer *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc}*-Maus mit einer *Rela*-defizienten Maus.

Embryonalentwicklung ausschließlich in murinen pankreatischen Progenitorzellen exprimiert und ist essentiell für die exokrine Pankreasentwicklung und Differenzierung [95, 96]. Untersuchungen von *Ptf1a*^{-/-}-Mäusen mit Verlust von p48 führen zu vollständigem Fehlen des exokrinen Pankreas und letalem Ausgang kurz nach Geburt [96]. Um Cre-Aktivität zu überprüfen, wurden diese *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäuse mit Gt (ROSA) 26Sortm1Sor (R26R)-Mäusen gekreuzt, welche ein modifiziertes *lacZ*-Gen unter dem zelltypunabhängigen ROSA26-Promoter exprimierten [155]. Eine Stopp-Kassette proximal von *lacZ* wurde durch Cre exzidiert und dadurch die β -Galaktosidase-Expression aktiviert. Die *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäuse zeigten LacZ-Expression und Cre-Aktivität in fast allen Azinuszellen und wenigen duktalem Zellen.

Da die Cre-Rekombinase nur in Zellen aktiv ist, welche den *Ptf1a*-Promotor exprimieren, resultierte durch Kreuzung der *Rela*^{loxP/loxP}-Mäuse mit *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mäusen die Entwicklung von Mäusen mit ausschließlich pankreasspezifischer Deletion der geflochten Exone 7 bis 10 im *Rela*-Gen (Abb. 6B, unten), woraus konditionale loss-of-function *Rela*-Allele des exokrinen Pankreas erzeugt wurden. Die resultierende Mauslinie *Rela*^{loxP/loxP}; *Ptf1a-cre*^{ex1} wird auch als *Rela* ^{Δ panc} bezeichnet (Abb. 6B). Bei diesen *Rela* ^{Δ panc}-Mäusen resultierte nach Proteinbiosynthese somit ein funktionell inaktives RelA/p65-Protein mit Verlust der nukleären Translokation und Dimerisierung, wodurch die Transkription von Zielgenen nicht mehr möglich war. Somit konnten wir die NF κ B-vermittelte Signaltransduktion unter Anwendung des Cre-Rekombinationssystems pankreasspezifisch im murinen Pankreaskarzinommodell inaktivieren. Anschließend kreuzten wir diese *Rela*-defizienten Mäuse mit *Ela-TGF α -hGH Trp53* ^{Δ panc}-Mäusen, um das zu analysierende *Ela-TGF α -hGH Trp53* ^{Δ panc} *Rela* ^{Δ panc}-Mausmodell zu erhalten (Abb. 6C).

Zur Vereinfachung wird im Weiteren das *Ela-TGF α -hGH; Trp53*^{loxP/loxP}; *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mausmodell als TP und das *Ela-TGF α -hGH; Trp53*^{loxP/loxP}; *Rela*^{loxP/loxP}; *Ptf1a-cre*^{ex1}-Mausmodell als TPa abgekürzt (Tab. 17).

Genotyp	<i>Ela-TGFα-hGH; Trp53</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Ptf1a-cre</i> ^{ex1}	<i>Ela-TGFα-hGH; Trp53</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Rela</i> ^{loxP/loxP} ; <i>Ptf1a-cre</i> ^{ex1}
Abkürzung		

Tab. 17: Genotypen und Abkürzungen der verwendeten Mausmodelle.

Zur Überprüfung der Effizienz der *Ptf1a*-Cre-vermittelten *Rela*-Deletion auf DNA-Ebene und als Voraussetzung vor Beginn aller Versuche wurde sichergestellt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse die definierten Genotypen präsentierten. Jedes in dieser Arbeit verwendete Versuchstier wurde sowohl wenige Wochen nach Geburt als auch nach Sektion anhand einer Schwanzspitze genotypisiert. Analysiert wurden die Gene *TGF α -hGH*, *Trp53*, *Rela* und *Ptf1a-cre*. Dabei verwendeten wir sowohl für *Trp53* als auch für *Rela* Primer, welche eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und gefloxtem Allel ermöglichen.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch jeweils zwei Proben der Mauslinien TP und TPa.

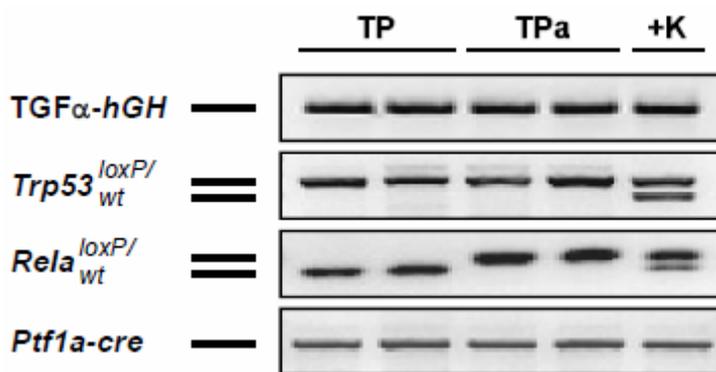


Abb. 7: PCR der genetisch modifizierten Allele der Versuchstiere.

Genotyp: TP (2 links) bzw. TPa (2 Mitte), sowie Kontrolle (rechts). *LoxP*=gefloxtes Allel, *wt*=Wildtyp-Allel

Die Genotypisierung zeigt die homozygote Expression des *TGF α -hGH*-Konstrukts sowie die homozygote Expression von *Ptf1a-cre* in allen Mäusen. Des Weiteren konnten in allen Mäusen homozygot gefloxtete *Trp53*-Allele nachgewiesen werden. Der Nachweis homozygoter *Rela*-Wildtyp-Expression gelang nur im TP-Modell, während das TPa-Modell die erfolgreiche Insertion der *loxP*-Sequenzen mit homozygot gefloxtem *Rela* zeigt. Als Referenz diente DNA einer heterozygoten *Trp53*^{loxP/wt}- und einer heterozygoten *Rela*^{loxP/wt}-Kontrollmaus (Abb.7, rechts).

Da sowohl die Expression gefloxter Zielgene *Trp53*^{loxP/loxP} und *Rela*^{loxP/loxP} als auch *Ptf1a-cre*^{ex1} in den Schwanzspitzen bestätigt wurde, kann von einer erfolgreichen Aktivierung des Cre-*loxP*-Systems im Pankreas ausgegangen werden. Dies geht wiederum mit der Inaktivierung von *Trp53* und *Rela* im exokrinen Pankreas einher.

Damit bestätigt die Genotypisierung die erwarteten Genotypen *Ela-TGF α -hGH*; *Trp53*^{loxP/loxP}; *Ptf1a-cre*^{ex1} und *Ela-TGF α -hGH*; *Trp53*^{loxP/loxP}; *Rela*^{loxP/loxP}; *Ptf1a-cre*^{ex1}, welche als Mausmodelle in dieser Arbeit verglichen wurden und die Basis der folgenden Versuche bildeten.

1.2 Proteinbiochemischer Nachweis fehlender RelA/p65-Expression im TPa-Modell

Nach Überprüfung der erfolgreichen Deletion auf genetischer Ebene, wurde weiterhin aus Pankreasgewebe die zelluläre Expression der Proteine p53 als Produkt des *Trp53*-Gens und RelA/p65 als Produkt des *Rela*-Gens untersucht. Da im TPa-Mausmodell aus dem mutierten *Rela*-Gen ein funktionell inaktives RelA/p65-Protein resultiert, war es wichtig zu überprüfen, ob der NFκB-Signalweg in diesen Mäusen intakt, oder aufgrund von strukturell verändertem NFκB unterbrochen war. Hierzu wurde die Expression der Inhibitorproteine IκBα und IκBβ untersucht, da diese bei funktionsfähigem NFκB-Signalweg über einen Rückkopplungsmechanismus von aktiviertem NFκB selbst transkribiert werden und so eine Überaktivierung des NFκB-Signalweges verhindern. IκBα und IκBβ liegen nur in gebundener Form mit NFκB in der Zelle vor, bei Aktivierung des IKK/ IκB/ NFκB-Signalweges und Phosphorylierung von IκB wird dieses über das Proteasom in der Zelle degradiert.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch jeweils zwei Proben der Mauslinien TP und TPa. Als positiv-Kontrolle für p53 diente eine *Trp53*-Wildtypmaus.

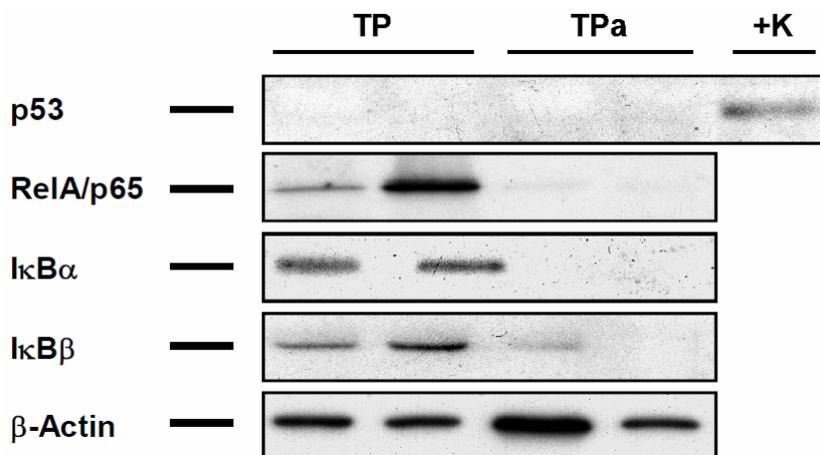


Abb. 8: Westernblot der Proteine p53 sowie RelA/p65 und dessen Inhibitoren IκBα und IκBβ.

Kein Nachweis von p53 in beiden Modellen. Nachweis von RelA/p65 sowie IκBα und IκBβ nur im TP-Modell, nicht im TPa-Modell. β-Actin dient zur Beladungskontrolle.

Der Westernblot zeigte das Fehlen von p53 in beiden Modellen. Während RelA/p65 nur im TP-Modell nachzuweisen war, konnte RelA/p65 im TPa-Modell nicht detektiert werden. Hier wurde das *Rela*-Gen konditional im exokrinen Pankreas ausgeknockt, damit war das Genprodukt RelA/p65 auch auf zellulärer Ebene nicht nachweisbar.

Eine Expression der Inhibitorproteine IκBα und IκBβ konnte nur im TP-Mausmodell detektiert werden, während diese im TPa-Mausmodell nicht nachweisbar waren. Die protein-

biochemische Untersuchung zeigte eine Störung des Signalweges im TPa-Mausmodell auf Höhe von inaktivem NFκB. Aufgrund strukturell verändertem RelA/p65-Protein mit Verlust der Fähigkeit zur Transkription im TPa-Mausmodell, war auch der negative Eigenregulationsmechanismus mit Transkription des eigenen Inhibitors IκB durch NFκB aberrant und damit sowohl IκBα als auch IκBβ in der Zelle herunterreguliert.

Dies bewies den Erfolg der pankreasspezifischen Cre-vermittelte Exzision der Exone 7 bis 10 des *Rela*-Gens im TPa-Modell, die eine Inaktivierung des NFκB-Signalweges auf zellulärer Ebene nach sich zieht.

1.3 Nachweis der fehlenden nukleären Translokation von RelA/p65 im TPa-Modell

Normalerweise transloziert RelA/p65 nach externer Stimulation des IKK/ IκB/ NFκB-Signalweges in den Zellkern und bindet als Transkriptionsfaktor an die DNA, um dort Zielgene zu transkribieren. Um den Verlust der Zellkerntranslokation von RelA/p65 durch konditionalen Knockout des *Rela*-Gens im exokrinen Pankreas nachzuweisen, wurde eine *in vitro* Immunfluoreszenzfärbung von kultivierten TP- und TPa-Zelllinien durchgeführt. Dabei wurde die DNA grün, das Protein RelA/p65 rot angefärbt.

Abbildung 9 zeigt beide Färbungen isoliert voneinander (A, B bzw. E, F) sowie ein fusioniertes Bild (C bzw. G). Dabei war im TP-Modell in der Fusion die nukleäre Aktivierung von RelA/p65 durch Überlagerung der beiden Farben Grün und Rot zu Gelb (Vergrößerung D) sichtbar. RelA/p65 war hier konstitutiv aktiviert und direkt an der DNA nachzuweisen. Im TPa-Modell ist keine Gelbfärbung bei Fusion der Färbungen von DNA und RelA/p65 sichtbar, hier war das Protein nicht nukleär, sondern zytoplasmatisch lokalisiert, sichtbar durch das Nebeneinander der Rotfärbung von RelA/p65 und der grün gefärbten DNA. Wir konnten damit den Verlust der nukleären Translokation von RelA/p65 im TPa-Modell durch Exzision der RHD, und damit die Inaktivierung des NFκB-Signalweges nachweisen.

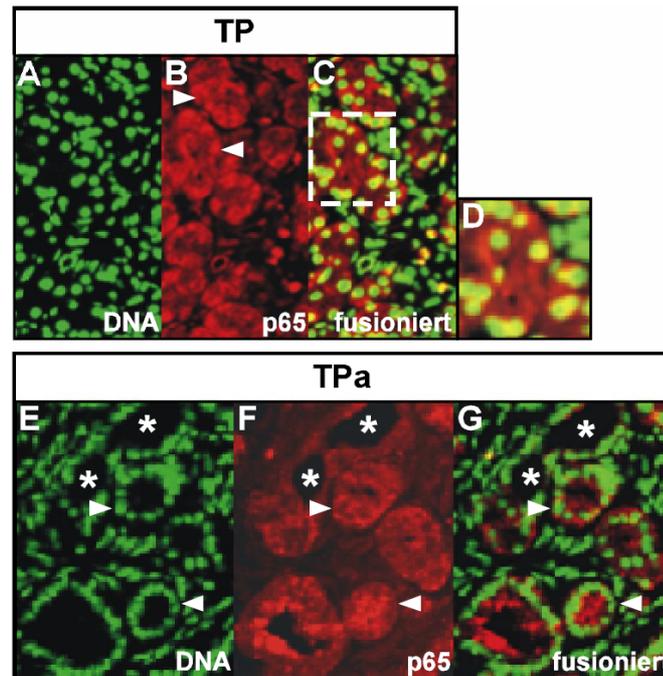


Abb. 9: Immunfluoreszenzfärbung von DNA und RelA/p65 in TP- und TPa-Tumorzelllinien.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte Grünfärbung von DNA (A, E) und Rotfärbung von RelA/p65 (B, F). Bei Fusion der Bilder zeigt sich im TP-Modell eine nukleäre Aktivierung von RelA/p65 (C), sichtbar an der Gelbfärbung durch Überlagerung der DNA- und RelA/p65-Protein-Färbung (Vergrößerung, D); im TPa-Modell ist keine nukleäre Lokalisation von RelA/p65 sichtbar, das Protein befindet sich im Zytoplasma (G).

► zeigen einzelne Azini, * markiert ein Ganglumen.

2. TPa-Mäuse zeigen ein signifikant längeres Überleben

Um zu analysieren, welchen Effekt mutiertes *Rela*, d.h. ein funktionsunfähiges RelA/p65-Protein und damit ein aberranter NF κ B-Signalweg, in Mäusen auf das Langzeitüberleben hat, und um einen möglichen Effekt zu quantifizieren, wurden insgesamt 41 Versuchstiere bis zu einem hyperakuten Stadium beobachtet und nach ihrem Tod, bzw. bei kurzfristig zu erwartendem Tod, sezziert.

Aus 41 Versuchstieren, davon 21 mit Genotyp TP und 20 mit Genotyp TPa, wurde die mittlere durchschnittliche Überlebenszeit in Tagen mit dem Log-rank-test berechnet. Es zeigte sich eine hochsignifikant verlängerte Überlebenszeit von 361 Tagen der TPa-Mäuse im Vergleich zu 300 Tagen der TP-Mäuse mit $p=0,0034$ (Abb. 10).

Nach dem Ergebnis der signifikant unterschiedlichen Überlebenszeit wurden die verstorbenen Versuchstiere bei Sektion auf ihre Todesursache hin untersucht. Hierbei zeigte sich als verfrühte Todesursache im TP-Modell Tumorprogress, unter anderem mit Ikterus und Aszites

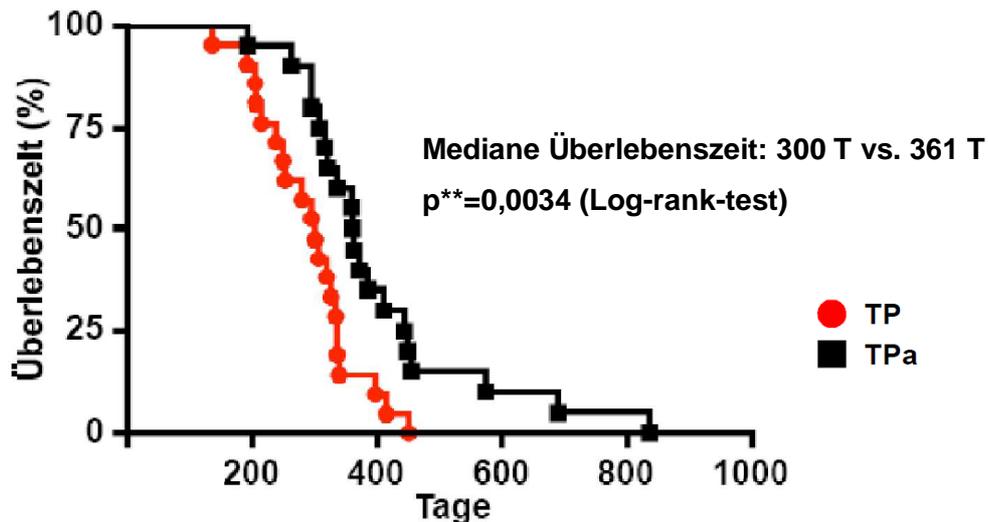


Abb. 10: Vergleich der medianen Überlebenszeit von TP- und TPa-Mäusen.

TPa-Mäuse (n=20) zeigten mit 361 Tagen eine signifikant längere mediane Überlebenszeit ($p=0,0034$) im Vergleich zu TP-Mäusen (n=21) mit einer medianen Überlebenszeit von 300 Tagen.

infolge Cholestase durch Verlegung der Gallengänge bei invasivem bzw. obstruktivem Wachstum des Pankreaskarzinoms, Metastasierung in Leber, Lunge und Peritoneum oder Invasion in Nachbarorgane. Diese Beobachtungen waren im TPa-Modell im Vergleich zum TP-Modell, bei gleicher Tumorzinzidenz, weniger häufig und in geringerem Ausmaß ausgeprägt.

3. Proteinbiochemische und morphologische Analysen zur Zellzyklusregulation und Apoptose *in vivo* vier Wochen alter Mäuse

Da Tumoren unter anderem aufgrund der Fähigkeiten zu ungebremster, dysregulierter Proliferation oder Umgehung der Apoptose zu erhöhtem Tumorwachstum führen, und dieses mit erniedrigtem Überleben korreliert, analysierten wir den Hintergrund für das signifikant erhöhte Überleben von TPa-Mäusen. Hierzu evaluierten wir den Einfluss der Inaktivierung von NFκB auf Proliferation und Apoptose von Pankreaszellen.

3.1 TPa-Mäuse zeigen signifikant geringere Proliferation

Für einen Eindruck über den Proliferationsstatus, den Zellzyklusprogress *in vivo* und morphologische Unterschiede im Alter von vier Wochen in beiden Mausmodellen wurden von allen Mäusen Pankreasgewebeschnitte mit sowohl H&E-Färbungen zur allgemeinen morphologischen Beurteilung und Differenzierung von Gewebekomponenten als auch

spezielle Färbungen wie BrdU und Cyclin D1 zur Analyse funktioneller Proteine in der Zellzyklusprogression und Proliferation des Pankreasgewebe angefertigt und unter dem Mikroskop beurteilt. In Abbildung 11A ist jeweils ein repräsentatives Beispiel für das jeweilige Mausmodell abgebildet.

In der H&E-Färbung ist eine Läppchengliederung des Pankreas mit leichter, für TGF α -Überexpression typischer, fibrotischer Vergrößerung der inter- und intralobulären Bindegewebssepten zu sehen. Pankreata von Mäusen beider Modelle zeigen weitgehend noch normale Gangstrukturen und Azini mit basalen Zellkernen und apikalen Zymogengranula. Gelegentlich sind jedoch schon multifokal frühneoplastische Läsionen mit unstrukturierten, azinären Einheiten und innerhalb dieser Unregelmäßigkeiten in den zellulären Strukturen, welche Transdifferenzierungsprozesse von Azinuszellen zu so genannten duct-like cells und tubulären Komplexen darstellen, mit desmoplastischer Reaktion zu sehen (Abb. 11A, links). Diese sind typische Veränderungen in Ela-TGF α -*hGH*-Mäusen und unterscheiden sich morphologisch zum Zeitpunkt vier Wochen kaum in unseren Modellen. NF κ B scheint damit die Pankreasmorphologie in frühen Stadien nicht zu beeinflussen.

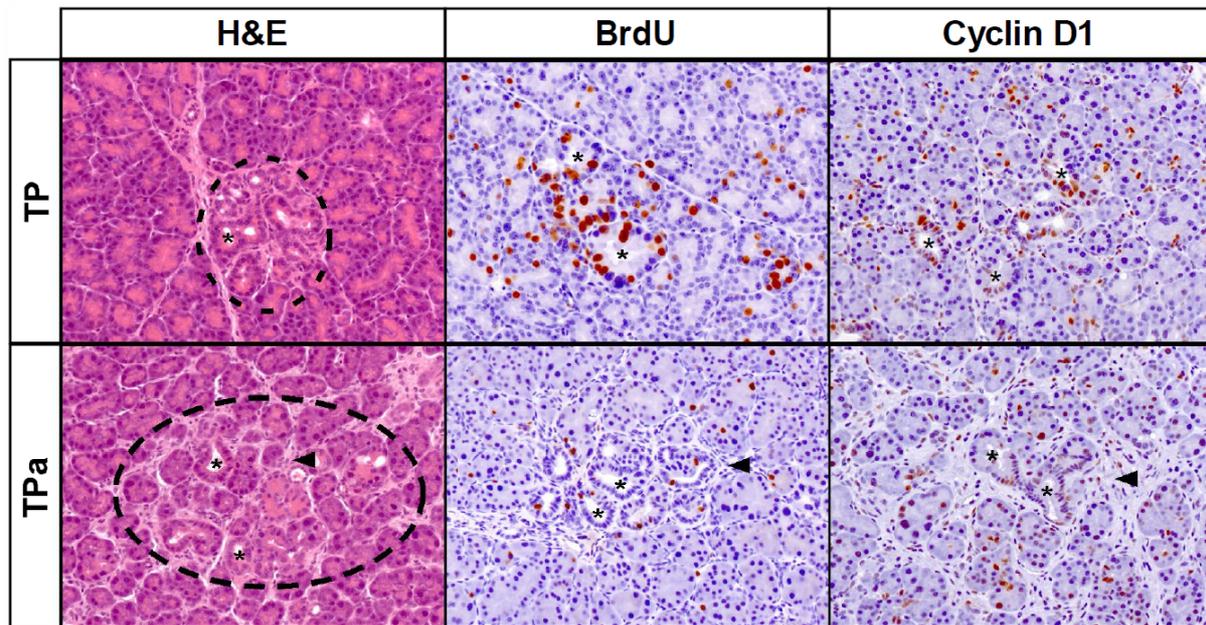
Bei immunhistochemischer Färbung mit BrdU, einem S-Phase-Marker, zeigte sich im TPa-Mausmodell eine geringere Anzahl von Zellen mit BrdU-Inkorporation bzw. eine Reduktion von S-Phase Zellen. Verstärkt konnte die BrdU-Inkorporation in Bereichen der unstrukturierten tubulären Komplexe im TP-Mausmodell nachgewiesen werden (Abb. 11A, mitte).

Auch Cyclin D1 stellt als Zellzyklusregulator des G1/S-Übergangs einen wichtigen Proliferationsmarker dar und weist in der Färbung im TP-Modell eine vermehrte Braunfärbung, bzw. im TPa-Mausmodell reduzierte Färbung auf. Erhöhte Inkorporation ließ sich vor allem in gangähnlichen Strukturen nachweisen, welche Transdifferenzierungsprozesse von Azini darstellen (Abb. 11A, rechts). Zusätzlich war auch eine Braunfärbung von Fibroblasten außerhalb der azinären Einheiten, vermehrt im TP-Mausmodell, als Zeichen der vermehrten desmoplastischen Stromareaktion zu sehen.

Zur Quantifizierung der Proliferation wurden jeweils 30 BrdU-gefärbte Pankreasgewebeschnitte von vier Wochen alten Mäusen, davon sechs Mäuse des TP-Mausmodells und vier Mäuse des TPa-Modells, getrennt für Azini und Gänge mit positivem, d.h. braun gefärbtem, und negativem, ungefärbten Zellkern ausgezählt.

In die Datenanalyse wurden zur Bewertung der Azini-Proliferationsrate schließlich zwei repräsentative Mäuse mit TP-Genotyp herangezogen, dabei ergab sich ein Mittelwert von 32,05 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 13,59; für vier

A



B

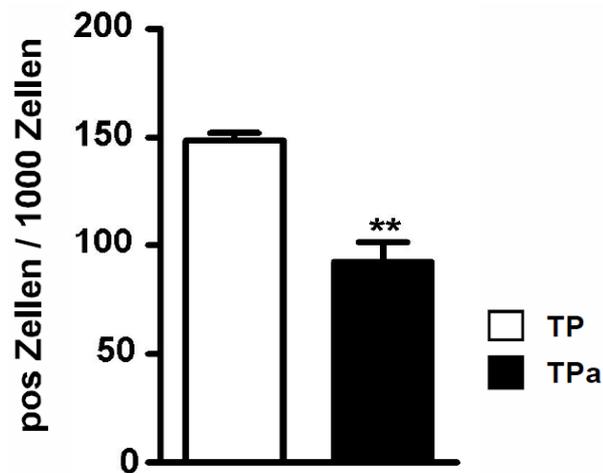


Abb. 11: Morphologische und Proliferationsanalysen in immunhistochemisch gefärbten Pankreasgewebeschnitten beider Mausmodelle.

(A) H&E-, BrdU- und Cyclin D1- Immunhistochemie vier Wochen alter Mäuse (Vergrößerung 20x).

Die H&E-Färbung zeigt frühneoplastische Läsionen (Kreis) mit Transdifferenzierung von Azinuszellen zu tubulären Strukturen (*). Als Proliferationsmarker dienen die BrdU- und Cyclin D1-Färbung, in welchen sich im TPa- im Vergleich zum TP-Modell verminderte Proliferation zeigte.

◄ zeigt die vermehrte desmoplastische Stromareaktion im TPa-Modell.

(B) Gesamtproliferationsraten von Azini und Gängen vier Wochen alter Mäuse.

TPa-Mäuse zeigten mit 92,19 positiven Zellen pro 1.000 Zellen, $SD=23,99$, eine signifikant niedrigere Proliferationsrate von Azini und Gängen im Vergleich zu TP-Mäusen mit 148,61 positiven Zellen pro 1.000 Zellen, $SD=8,53$ (** $p<0,05$).

Mäuse mit TPa-Genotyp ergab sich ein Wert von 17,06 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 3,19. Im Vergleich der beiden Mausmodelle war demnach die Azini-Proliferationsrate im TPa-Mausmodell mit $p=0,014$ signifikant niedriger als die Azini-Proliferationsrate im TP-Mausmodell.

Zur Proliferationsanalyse der Gänge wurden zur Datenerhebung vier Mäuse mit TP-Genotyp und drei Mäuse mit TPa-Genotyp herangezogen. Die Datenanalyse ergab für den TP-Genotyp einen Wert von 116,56 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 20,8 und für Mäuse mit TPa-Genotyp einen Wert von 75,13 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 13,25 und damit eine signifikant niedrigere duktale Proliferationsrate für den TPa-Genotyp ($p=0,044$).

Der Vergleich beider Mausmodelle ergab in der Auswertung zum einen sowohl eine signifikant niedrigere duktale als auch azinäre Proliferationsrate für TPa-Mäuse mit $p=0,044$ bzw. $p=0,014$, zum anderen eine hochsignifikant höhere Proliferationsrate von Gangstrukturen im Vergleich zu Azini (116,56 vs. 32,05 positive Zellen pro 1.000 Zellen, $p=0,007$ im TP-Mausmodell, bzw. 75,13 vs. 3,19 positive Zellen pro 1.000 Zellen, $p=0,0003$ im TPa-Mausmodell).

Abbildung 11B zeigt die Gesamtproliferationsraten von Azini und Gängen der Mausmodelle TP und TPa im Vergleich. Die Auswertung für das TP-Mausmodell ergab eine Proliferationsrate von 148,61 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 8,53 und einer Proliferationsrate im TPa-Mausmodell von 92,19 positiven Zellen pro 1.000 Zellen mit einer Standardabweichung von 23,99. Auch hier zeigt sich die hochsignifikant niedrigere Gesamtproliferationsrate im TPa-Mausmodell ($p=0,003$).

Neben Proliferationsunterschieden, welche sich morphologisch darstellten, untersuchten wir weiterhin, ob sich diese auch auf zellulärer proteinbiochemischer Ebene bestätigen ließen. Hierzu analysierten wir verschiedene Zellzyklusregulatorproteine aus Pankreasgewebe. Ein starkes Signal deutet auf eine hohe Menge an Zellzyklusregulationsprotein und damit vermehrt Mitosen bzw. häufige Zellteilung, d.h. Proliferation hin. Untersucht wurden die Proteine Cyclin D1 und Cyclin E, beide Regulatoren des G1/S-Übergangs sowie CDK 4, katalytische Untereinheit des Protein-Kinase-Komplexes mit D-Cyclinen, welche eine bedeutende Rolle für die Progression der G1-Phase spielt. Sowohl Cyclin D1 als auch Cyclin E und CDK 4 waren in der Westernblotanalyse von TPa-Gewebelysaten (Abb. 12) deutlich herunterreguliert.

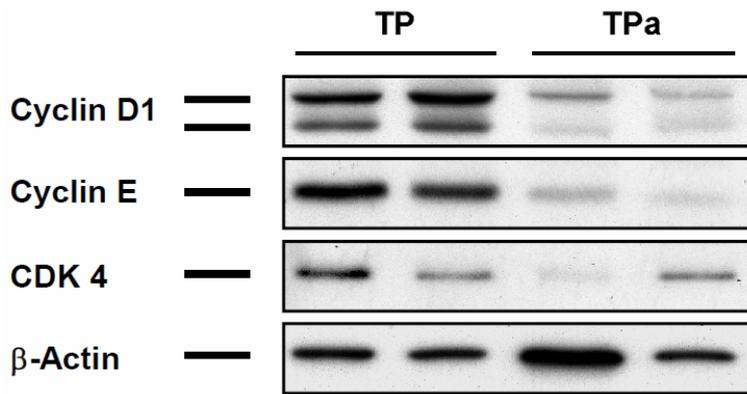


Abb. 12: Westernblot der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, Cyclin E und CDK 4 aus Pankreasgewebe vier Wochen alter Mäuse.

TPa-Mäuse zeigten im Vergleich zu TP-Mäusen sowohl herunterreguliertes Cyclin D1 als auch Cyclin E und CDK 4. β -Actin dient zur Beladungskontrolle.

Dies deutet auf verminderten Zellzyklusprogress und damit verminderte Proliferation bei Inaktivierung von NF κ B im TPa-Mausmodell hin und war konsistent mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung. Als Kontrolle der äquivalenten Beladung diente β -Actin. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse keinen Einfluss von NF κ B auf die Morphologie des Pankreas zum frühen Zeitpunkt von vier Wochen, jedoch kann eine signifikant geringere Proliferation bei Inaktivierung von NF κ B im TPa-Modell festgestellt werden.

3.2 TPa-Mäuse zeigen zum Zeitpunkt vier Wochen keine signifikant erhöhte Apoptoserate

Als nächstes wurde die Fragestellung zur Apoptosehäufigkeit im Vergleich der beiden Mausmodelle bearbeitet. Hierzu wurde Pankreasgewebe von vier Wochen alten Mäusen immunhistochemisch mit Cleaved Caspase-3-Antikörper gefärbt. Dieser erkennt sowohl die Proform als auch die kleine und große Untereinheit von aktivierter Caspase-3. Eine positive Reaktion, d.h. induzierte Apoptose der Zelle, ließ sich durch Braunfärbung des Zytoplasmas nachweisen.

Cleaved Caspase-3 ist ein Mitglied der Cystein-Aspartat-Protease-Familie, welche eine zentrale Rolle im extrinsischen (rezeptorvermittelten) Weg des programmierten Zelltods spielt. Caspasen liegen in gesunden Zellen in Form von inaktiven Vorstufen, sogenannten Procaspasen, im Zytoplasma vor und werden kaskadenartig durch proteolytische Spaltung aktiviert. Dabei gibt es verschiedene Caspasen, welche in Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen unterschieden werden können. Initiatorcaspasen wie Caspase-2, -8, -9 und -10 sind an der Auslösung der Apoptose beteiligt und stehen am Beginn der Signalkaskade, zu den Effektorcaspasen zählen Caspase-3, -6 und -7, diese spalten proteolytisch zelluläre Proteine und führen dadurch zum Zelltod. Die Apoptose kann auf zwei Arten aktiviert werden: Durch

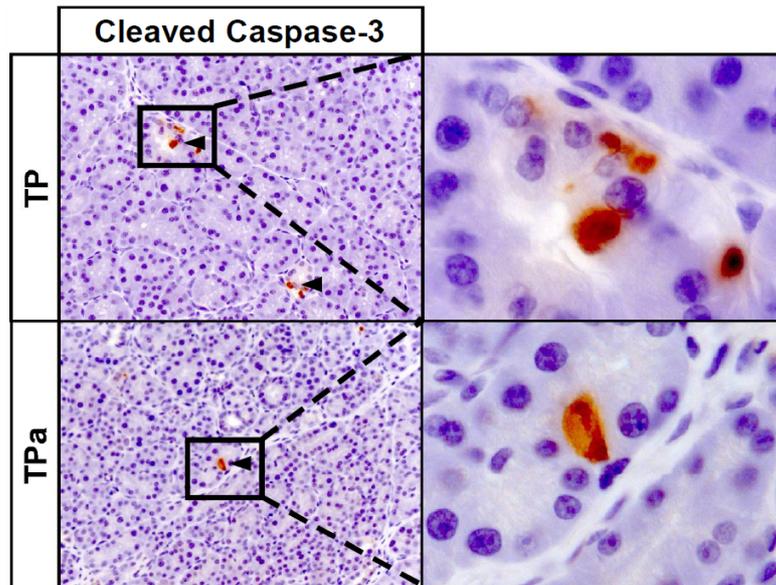
Bindung von Liganden an Todesrezeptoren wie TNFR, Fas oder TRAIL im Rezeptor vermittelten Weg, wird über Trimerisierung des Rezeptors und über Adaptermoleküle Procaspase-8 rekrutiert und autokatalytisch zu Caspase-8 aktiviert. Es folgt eine kaskadenartige proteolytische Aktivierung weiterer Procaspasen zu Caspasen, an deren Beginn Effektorcaspase-3 steht. Diese zerstören schließlich unter anderem das Zytoskelett, Transkriptionsfaktoren, lösen die Kernmembran auf und führen zum regulierten Tod der Zelle. Im intrinsischen, mitochondrialen Weg, führt die proteolytische Aktivierung von Caspase-8 zur Dysbalance zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren der mitochondrialen Membran, welche die Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der Effektorcaspasen bewirken.

Abbildung 13A zeigt exemplarisch die Apoptose von Azinuszellen in beiden Mausmodellen. In beiden Bildern ist zu sehen, dass die Apoptose sowohl im TP- als auch im TPa-Mausmodell ein seltenes Ereignis darstellt. Im TPa-Mausmodell ist Apoptose nicht signifikant häufiger zu sehen. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden jeweils 30 immunhistochemisch mit Cleaved Caspase-3-Antikörpern gefärbte Schnitte auf Apoptose hin ausgezählt (Abb. 13B). Zur Datenanalyse wurden im TP-Mausmodell zwei repräsentative Mäuse und drei Mäuse mit TPa-Genotyp herangezogen. Die Auswertung ergab für Azinuszellen im TP-Mausmodell eine Rate von 3,92 positiven Zellen pro 100 Sichtfelder bei 20-facher Vergrößerung mit einer Standardabweichung von 1,64 und 4,07 positiven Zellen pro 100 Sichtfelder des TPa-Genotyps mit einer Standardabweichung von 1,89. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant ($p=0,93$). Bei Analyse der Apoptoserate für Gänge ergaben sich keine apoptotischen Zellen im TP-Mausmodell, während im TPa-Mausmodell 0,48 positive Zellen pro 100 Sichtfeldern mit einer Standardabweichung von 0,44 nachgewiesen wurden.

Sowohl bei Analyse der duktaalen Apoptoserate ($p=0,23$) als auch bei Vergleich der gemeinsamen Apoptoserate von Azini und Gängen ($p=0,92$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausmodellen nachgewiesen werden.

Die Analysen belegten somit, dass die organspezifische Inaktivierung der NF κ B-abhängigen Signaltransduktion im murinen TPa-Modell die Apoptose in frühen Stadien zum Zeitpunkt von vier Wochen nicht beeinflusst.

A



B

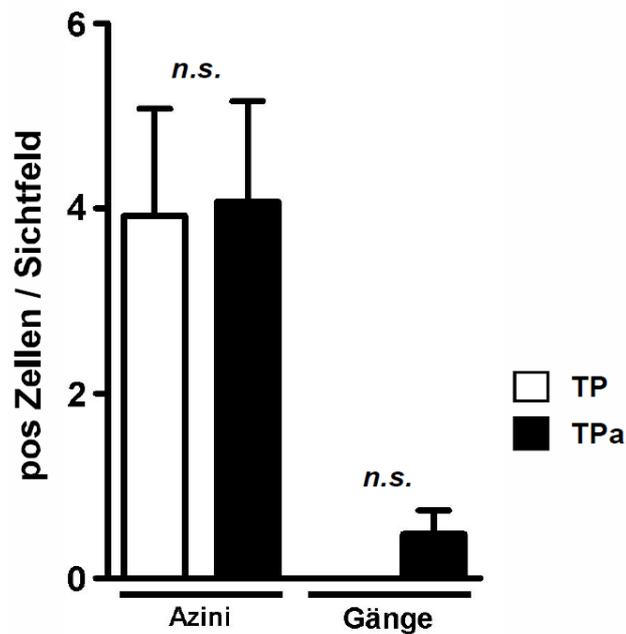


Abb. 13: Analysen zur Apoptose in immunhistochemisch gefärbten Pankreasgewebeschnitten beider Modelle.

(A) Immunhistochemische Cleaved Caspase-3-Färbung vier Wochen alter Mäuse (Vergrößerung 20x).

Apoptose (◄) ist zum Zeitpunkt von vier Wochen ein seltenes Ereignis in beiden Modellen.

(B) Apoptoseraten von Azini und Gängen vier Wochen alter Mäuse.

Im Vergleich von TP-Mäusen mit TPa-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate.

4. Morphologische Charakterisierung von *Rela*-defizienten Mäusen *in vivo*

Um einen möglichen Langzeiteffekt des aberranten NFκB-Signalweges auf allgemeine Morphologie, Proliferationsstatus, Differenzierung und Zelladhäsion zu untersuchen, wurden zusätzlich zu vier Wochen alten Mäusen in beiden Mausmodellen adulte Mäuse, welche aufgrund Tumorprogresses im Mittel nach 300 Tagen im TP- bzw. 361 Tagen im TPa-Mausmodell verstarben, seziiert und immunhistochemisch analysiert.

Durch einen Facharzt für Pathologie wurden H&E gefärbte Paraffingewebeschnitte beider Mausmodelle klassifiziert. Dabei wies Pankreasgewebe des TP-Mausmodells bei drei von insgesamt 11 Mäusen ein duktales Adenokarzinom (DAC= ductal adenocarcinoma), bei fünf ein sarkomatöses, undifferenziertes Karzinom und bei drei Mäusen ein Azinuszellkarzinom auf. Daraus berechnet sich ein Anteil von 27% des duktales Adenokarzinoms im TP-Mausmodell bzw. ein Anteil von 73% anderer, v.a. undifferenzierter Tumoren. Im Unterschied dazu ergab sich im TPa-Mausmodell ein reziprokes Verhältnis: Von 16 untersuchten Mäusen besaßen 12 ein differenziertes, duktales Adenokarzinom, während nur vier Mäuse eine andere Differenzierung aufwiesen, darunter zwei azinäre Karzinome, eine MCN-ähnlicher stromareicher Tumor und ein SCA-ähnlicher Tumor. Aus diesen Werten ließ sich ein Anteil von 75% des duktales Adenokarzinoms im TPa-Mausmodell kalkulieren. Duktal differenzierte Adenokarzinome waren demnach im TPa-Mausmodell signifikant häufiger als im TP-Vergleichsmodell (Abb. 14).

Die allgemeine Morphologie anhand H&E-Färbung zeigte im TP-Mausmodell ein fischschwarmartiges, sarkomatöses Wachstum undifferenzierter, polymorpher Zellen mit nur wenig Stroma (Abb. 15A), die jegliche Struktur verloren hatten, während die Morphologie im TPa-Modell gangähnliche, teils tubuläre, teils kribriiforme Strukturen mit desmoplastischer Reaktion des Pankreasgewebes und hochprismatischen, polarisierten, Schleim bildenden Zellen mit polymorphen Kernen vorwies (Abb. 15B) - typisch für das duktales Adenokarzinom des Pankreas.

Nach Färbung mit BrdU zeigte sich im TP-Mausmodell eine vermehrte Anzahl von S-Phase Zellen mit polymorphem Phänotyp (Abb. 15C) und damit erhöhter Proliferation. Auch polymorphe Riesenzellen waren häufig zu sehen. Im Vergleich dazu war im TPa-Modell eine verminderte Anzahl positiver S-Phase-Zellen nachzuweisen (Abb. 15D), jedoch war die BrdU-Inkorporation verstärkt am Übergang von gut (G1) zu mittelgradig differenziertem (G2) duktales Karzinom sichtbar (*), hinweisend auf vermehrte Proliferation und Invasivität des

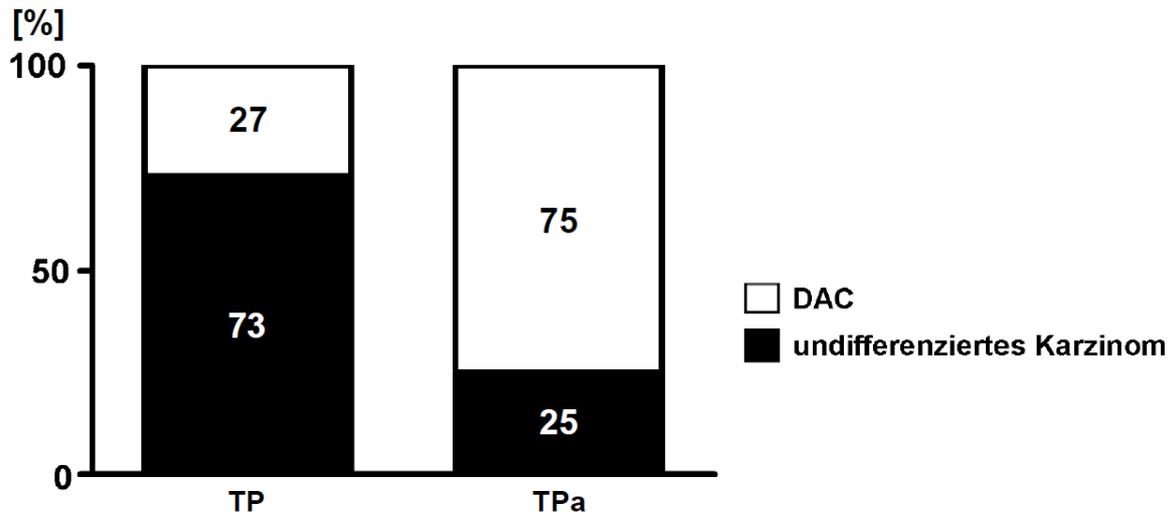


Abb. 14: Morphologischer Vergleich der Pankreaskarzinome beider Mausmodelle.

Im TP-Mausmodell wiesen nur 27% ein duktales Adenokarzinom (DAC) auf, während der Anteil an duktales Adenokarzinomen im TPa-Mausmodell 75% betrug.

Karzinoms vor allem im Randbereich. Links in Abb. 15D zeigen sich spätneoplastische Läsionen.

Zum Nachweis der Karzinomdifferenzierung wurden eine Zytokeratin-19- und eine Vimentinfärbung durchgeführt. Zytokeratine sind als Intermediärproteine für die strukturelle Integrität epithelialer Zellen zuständig und diente hier als duktales Marker, besonders in Bereichen der unstrukturierten pseudotubulären Komplexe. Die Färbung zeigte im undifferenzierten Karzinom keine positiven Zellen, einzig in der Nachbarschaft, welche noch relativ gut differenzierte spätneoplastische Läsionen aufwies, konnte der epitheliale (duktales) Ursprung überraschenderweise nachgewiesen werden (Abb. 15E). Im duktales Karzinom des TPa-Modells ließen sich alle Tumorzellen wie erwartet braun anfärben (Abb. 15F). Die Vergrößerung zeigt die zytoplasmatische Lokalisation von Zytokeratin-19.

Das Zytoskelettprotein Vimentin stellt einen Marker für mesenchymale Zellen wie beispielsweise Fibroblasten dar und lässt sich vor allem in Sarkomen nachweisen. Das undifferenzierte Karzinom im TP-Modell zeigte häufig verstreute positive Zellen, hinweisend auf mesenchymale Differenzierung (Abb. 15G), während das duktales Karzinom keinerlei Anfärbung aufwies. Hier ließ sich nur das Stroma bzw. Fibroblasten anfärben (Abb. 15H).

Epitheliales E-Cadherin ist ein Ca^{2+} -abhängiges Transmembranprotein und gehört zur Gruppe der Adhäsionsproteine. Es ist für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten in Geweben zu-

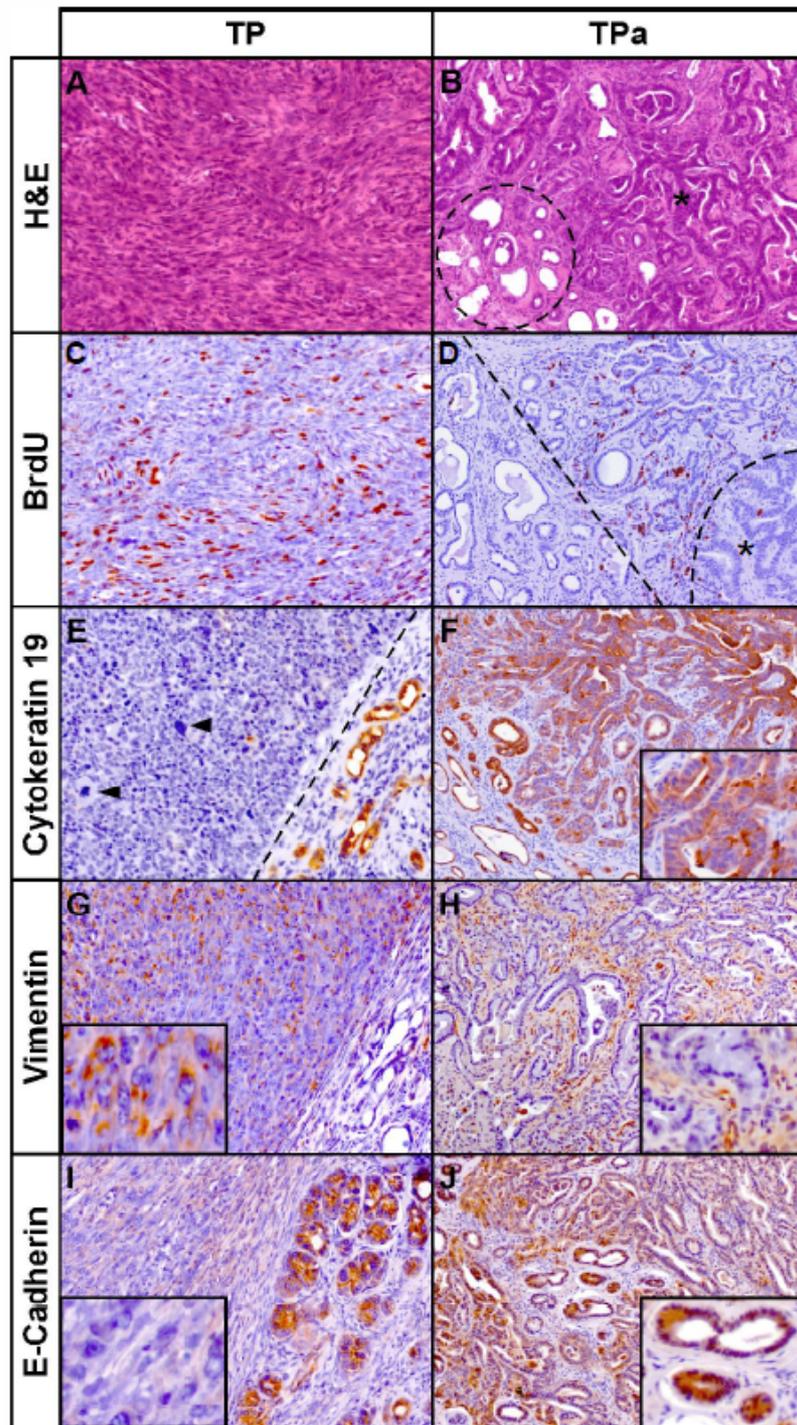


Abb. 15: Immunohistochemische Analysen von Pankreaskarzinomgewebeschnitten des TP- und TPa-Modells.

(A, B) Die H&E-Färbung zeigte im TP-Mausmodell ein sarkomatöses Wachstum polymorpher Zellen mit Entwicklung eines undifferenzierten Karzinoms, während Mäuse mit TPa-Genotyp neben spätneoplastischen Läsionen (Kreis) ein relativ gut differenziertes duktales Karzinom (*) entwickelten. Beide Mausmodelle zeigten außerdem die typische desmoplastische Reaktion mit Bindegewebsvermehrung.

(C, D) Der Proliferationsmarker BrdU stellte erhöhte Proliferation im gesamten Gewebe des TP-Mausmodells dar, während im TPa-Mausmodell die Proliferation erniedrigt war und vor allem im Übergangsbereich (zwischen den Linien) zwischen gut differenziertem (Bildmitte) und mittelgradig differenziertem duktalem Karzinom (rechts unten, *) stattfand (links: spätneoplastische Läsionen).

(E, F) Die Cytokeratin-19-Färbung zeigte im TP-Mausmodell den Verlust des typischen epithelialen Intermediärfilaments, welche im Randbereich in relativ gut differenziertem Tumor noch nachweisbar war (rechts), während das TPa-Modell eine epitheliale, duktale Differenzierung der Tumorzellen zeigte. Nachweis von Cytokeratin-19 im Zytoplasma (Vergrößerung). ◀ Polymorphe Riesenzellen

(G, H) In der Vimentin-Färbung war eine mesenchymale Differenzierung im TP-Modell zu sehen, während sich in TPa-Modell nur das Stroma anfärben ließ (Vergrößerung).

(I, J) Im TP-Modell zeigte die E-Cadherin-Färbung einen Verlust der Zell-Zellkontakte von Tumorzellen im undifferenzierten Karzinom (siehe Vergrößerung), während diese im gut differenzierten Karzinom (I rechts unten) und im TPa-Modell nachzuweisen waren (Vergrößerung).

ständig. Der Verlust von E-Cadherin in Malignomen geht durch Verlust von Zelladhäsion mit erhöhter Motilität der Tumorzellen und damit Metastasierung einher. E-Cadherin war im undifferenzierten Karzinom nicht nachweisbar (Abb. 15I), die Vergrößerung zeigte den positiven Nachweis in spätneoplastischen Läsionen mit (noch) erhaltener Differenzierung. Im duktalem Karzinom konnte das Adhäsionsmolekül regelhaft in den Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 15J).

Zusammenfassend ließ sich im TPa-Modell größtenteils eine duktale Differenzierung der Karzinome mit reduzierter Proliferation belegen. Diese exprimierten typische epitheliale Markerproteine wie Zytokeratin-19 und E-Cadherin, jedoch nicht die mesenchymalen Markerproteine Vimentin. Im Gegensatz hierzu wiesen Pankreaskarzinome des TP-Modells vor allem mesenchymale Differenzierung mit erhöhter Proliferation auf und waren Vimentin-positiv, während typische epitheliale Marker nicht exprimiert wurden, jedoch in spätneoplastischen Läsionen (noch) nachzuweisen waren und eine potenzielle Transdifferenzierung dieser Karzinomzellen vom duktalem zum mesenchymalen Phänotyp vermuten ließen.

5. Proteinbiochemische und morphologische *in vitro*-Charakterisierung von Tumorzellen

Neben Untersuchungen *in vivo* wurden auch Untersuchungen *in vitro* an kultivierten TP- und TPa-Tumorzelllinien durchgeführt, um auch hier den Effekt einer Inaktivierung des NFκB-Signalweges zu analysieren. In Zelllinien können, da sie aus reinen Tumorzellen bestehen und andere Zelltypen wie z.B. Bindegewebszellen fehlen, spezifisch in diesen Zellen ablaufende Signaltransduktionswege untersucht werden. Sie liefern damit besser zu interpretierende Ergebnisse aufgrund geringerer Interferenz von Signaltransduktionswegen verschiedener Zelltypen als Mischgewebe.

5.1 *In vitro* zeigen TPa-Tumorzellen einen epithelialen Phänotyp

Bei Kultivierung beider Zelllinien zeigte sich auch hier ein unterschiedliches Wachstumsmuster: Während TP-Tumorzellen eine heterogene, fischschwarmartig-mesenchymale Morphologie mit teils epithelialen, teils fibroblastoiden Zellen mit Filopodien zeigten, wiesen TPa-Tumorzellen epitheliale Morphologie mit typischem inselartigem Wachstum aus einschichtig angeordneten, polygonalen Zellen, die eng aneinander adhäreren, auf (Abb. 16). Auch die Wachstumsgeschwindigkeit beider Mausmodelle unterschied sich deutlich. In 24 Stunden wuchsen TP-Zellen konfluent über den gesamten Flaschenboden, teils in mehreren Schichten, sodass häufig apoptotische Zellen aufgrund Nährstoffmangel zu sehen waren. Im Gegensatz dazu wuchsen TPa-Zellen in 24 Stunden höchstens subkonfluent und einschichtig (Abb. 16).

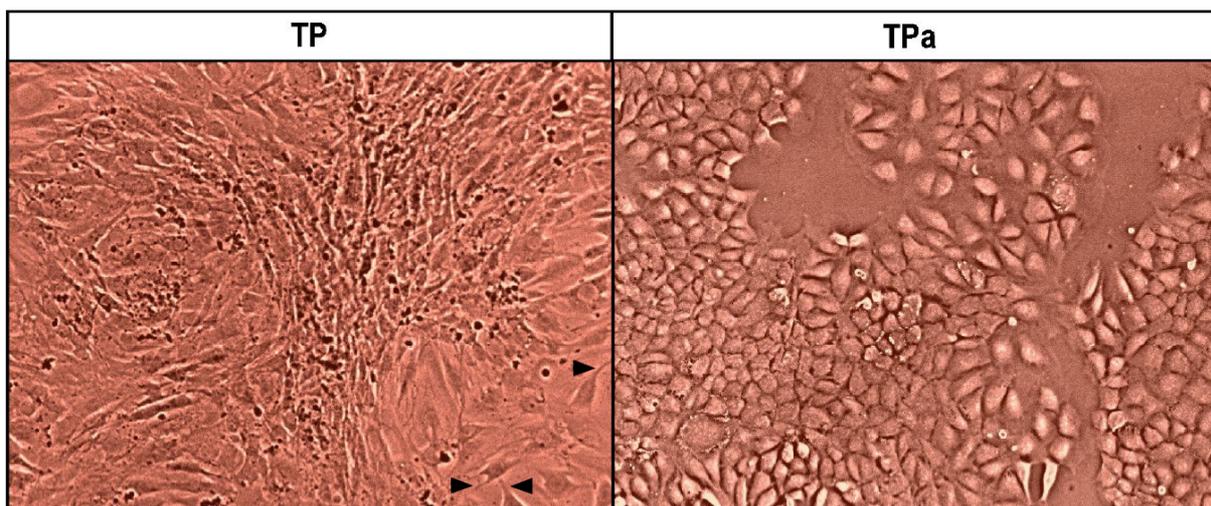


Abb. 16: Vergleich der Morphologie *in vitro* von TP- und TPa-Zelllinien.

Anders als TP-Zelllinien, welche einen mesenchymalen Phänotyp aus fibroblastoiden Zellen mit Filopodien (◄) aufwiesen, zeigten TPa-Zelllinien bei Kultivierung einen epithelialen Phänotyp aus einschichtig polygonalen Zellen, die eng aneinander adhäreren mit inselartigem Wachstum.

5.2 Nachweis fehlender nukleärer Translokation und Expression von RelA/p65 *in vitro* im TPa-Modell

Um auch *in vitro* die Deletion von *Rela* mit resultierendem Verlust der nukleären Translokation und DNA-Bindung mit einhergehender pankreasspezifischer Inaktivierung des NFκB-Signalweges nachzuweisen, führten wir Westernblotanalysen an kultivierten Tumorzelllinien beider Mausmodelle durch. Dabei untersuchten wir proteinbiochemisch die

Lokalisation von RelA/p65 in extrahierten Zellkernlysaten sowie simultan die extranukleäre Expression der Inhibitorproteine I κ B α und I κ B β in Zytoplasmalysaten (Abb. 17).

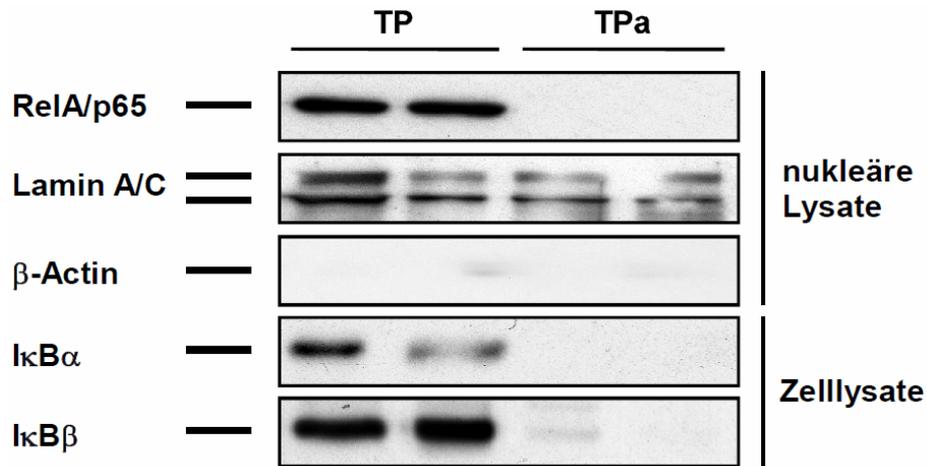


Abb. 17: Westernblot von RelA/p65 in nukleären Lysaten sowie seiner Inhibitoren I κ B α und I κ B β in zytoplasma-tischen Lysaten aus Karzinomzelllinien.

RelA/p65 war in TPa-Zellen, anders als in TP-Zellen, in nukleären Extrakten nicht nachweisbar. Der Nachweis des Kernproteins Lamin A/C und parallel fehlendem Nachweis von β -Actin beweisen den rein nukleären Ursprung der Lysate.

I κ B α und I κ B β waren in TPa-Zellen herunterreguliert. In TP-Zellen konnten I κ B α und I κ B β nachgewiesen werden.

Im TP-Modell war die Translokation von RelA/p65 in den Zellkern intakt, sichtbar durch Detektion von RelA/p65 in Kernlysaten sowie den Inhibitoren I κ B α und I κ B β im Zelllysate. Im Gegensatz waren im konditionalen *Rela*-Knockoutmodell sowohl I κ B α als auch I κ B β im Zelllysate nicht nachweisbar, hinweisend auf einen aberranten NF κ B-Signalweg, gleich vorherigen Analysen in Pankreasgewebe vier Wochen alter Mäuse. Aufgrund pankreas-spezifischer Deletion der RHD im *Rela*-Gen hatte dessen Genprodukt RelA/p65 sowohl die Fähigkeit der Translokation in den Zellkern als auch zur DNA-Bindung verloren und war damit im TPa-Modell nicht nukleär nachweisbar. Das Kernmembranprotein Lamin A/C war in allen Proteinlysaten äquivalent detektierbar, damit konnte der nukleäre Ursprung der Lysate bewiesen werden; als Reinheitskontrolle der Proben diente die Abwesenheit von β -Actin, einem ausschließlich zytoplasmatisch vorkommenden Protein.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Hinblick auf die formulierte Zielsetzung in Kapitel I.5. dieser Arbeit lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen:

1. - Mit Hilfe des Cre-*loxP*-Systems konnten wir eine pankreasspezifische Deletion der Exone 7 bis 10 des *Rela*-Gens, kodierend für die RHD, erzeugen. Diese pankreasspezifische Inaktivierung des *Rela*-Gens führt zum Verlust der nukleären Translokation sowie DNA-Bindung von NFκB und folglich zur Unfähigkeit der Transkription von Zielgenen. Im TPa-Mausmodell führt die pankreasspezifische Inaktivierung des *Rela*-Gens zu signifikant erhöhtem Überleben von 361 Tagen im Vergleich zu 300 Tagen im TP-Modell.
- 2.1 - In frühen Zeitpunkten beeinflusst inaktiviertes NFκB die Pankreasmorphologie vier Wochen alter Mäuse des TPa-Modells nicht, jedoch differiert diese in den Pankreaskarzinomen erheblich: TPa-Mäuse weisen *in vivo* eine epithelial-duktales Differenzierung mit Nachweis epithelialer Marker und Zelladhäsionsproteinen auf, während bei TP-Mäusen *in vivo* eine vermehrte mesenchymale Differenzierung mit Expression mesenchymaler Marker und Verlust epithelialer Marker sowie Verlust von Zelladhäsionsproteinen festgestellt werden kann.
- 2.2 - *In vivo* weisen TPa-Pankreas(karzinom)zellen sowohl zum frühen Zeitpunkt von vier Wochen als auch in späteren Stadien eine signifikant erniedrigte Proliferation auf.
- 2.3 - Die Apoptose *in vivo* zum Zeitpunkt von vier Wochen wird durch die konditionale Inaktivierung von NFκB im TPa-Modell nicht beeinflusst.
- 2.4 - Auch *in vitro* kann die fehlende Translokation von NFκB in den Nukleus nachgewiesen werden. Morphologisch bedingt dies in kultivierten Tumorzellen des TPa-Modells ein epitheliales Wachstum, während das TP-Modell ein eher sarkomatöses Wachstum aufweist.

Die Ergebnisse unserer Analysen lassen darauf schließen, dass eine pankreasspezifische Inaktivierung von NFκB im TP-Modell durch Inhibition der Proliferation sowohl zu verzögerter Tumorprogression als auch Verzögerung von Transdifferenzierungsprozessen zu aggressiveren, undifferenzierten Pankreaskarzinomen und damit zu verlängertem medianen Überleben führt. Folglich stellt der Transkriptionsfaktor NFκB einen essentiellen Regulator der Onkogenese im murinen *in vivo*-Modell des Pankreaskarzinoms dar.

IV. DISKUSSION

1. Das murine TP-Pankreaskarzinommodell rekapituliert die genetischen und morphologischen Veränderungen des humanen Pankreaskarzinoms

Genetisch modifizierte Mausmodelle des duktales Pankreasadenokarzinoms imitieren zelluläre und molekulare Veränderungen durch Reproduktion genetischer Alterationen des Pankreasadenokarzinoms. Sie zeigen das gesamte Spektrum pathologischer Veränderungen von frühneoplastischen Läsionen wie PanIN's bis hin zu späten Stadien des invasiven, metastatischen PDAC mit seinen morphologischen Veränderungen. Transgene Mausmodelle stellen das beste präklinische Modellsystem zur Grundlagenforschung sowie zur pathologischen Charakterisierung und Untersuchung von Therapieansätzen dar. Zur Generierung werden die häufigsten Treiber der pankreatischen Karzinogenese genutzt, darunter das *Kras*-Onkogen, *Trp53*, *Ink4a/ARF* und *Smad4/DPC4*.

Im Gegensatz zu erfolgreichen Mausmodellen vieler humaner Tumoren anderen Ursprungs stellt sich die Anwendung geeigneter Mausmodelle des Pankreaskarzinoms bisher frustrierend dar und es fehlt an gut etablierten Modellen, um experimentell die Früherkennung oder potenzielle neue Therapieverfahren zu evaluieren und schließlich das Patientenleben und Patientenüberleben zu verbessern.

Im Allgemeinen zeigt die Pathologie des Pankreaskarzinoms im Menschen einige Unterschiede im Vergleich zu den Pathologien, welche wir in genetisch modifizierten Mausmodellen beobachten: Humane Pankreaskarzinome zeigen meist eine Richtung der Differenzierung, sind meist mäßig bis schlecht differenziert, solitär, zeigen massive Desmoplasie als charakteristische Eigenschaft des invasiven PDAC und Vorläuferläsionen wie PanIN's entstehen meist in intaktem Pankreasparenchym [63]. Im Gegensatz dazu zeigen die genetisch modifizierte Mausmodelle meist multiple Differenzierungsrichtungen, bilden meist anaplastische Karzinome, sind üblicherweise multifokal lokalisiert, zeigen meist kaum bis keine Desmoplasie und duktales Läsionen entstehen meist auf Basis einer diffusen azinär-duktales Metaplasie [63].

Dem Pankreaskarzinomprogressionsmodell folgend [64], gibt es aktuell zahlreiche unterschiedliche Mausmodelle, welche die genetischen Alterationen rekapitulieren und sich in der Latenz bis zur Tumorprogression, dem medianen Überleben, der Histopathologie und

Makrometastasierung unterscheiden. An dieser Stelle sollen nur die wichtigsten, gemäß dem internationalen Workshop des National Cancer Institute der University of Pennsylvania 2004 vorgestellt und verglichen werden [63].

Die meisten Mausmodelle basieren auf einer Inaktivierung des *Kras*-Onkogens, einem G-Protein und dem häufigsten mutierten Gen des Pankreaskarzinoms [4], welches zu frühen und fortgeschrittenen Formen des Pankreaskarzinoms führt. Allerdings ist die *Kras*-Mutation alleine kaum in der Lage, einen invasiven oder metastatischen Phänotyp zu induzieren [44, 56], deshalb werden hier oft Kombinationen mehrerer Transgene in Mausmodellen generiert. Die konditionale Überexpression von *Kras* mit Generierung des murinen Modells *Lox-Stop-Lox (LSL)-Kras^{G12D}* durch Anwendung des Cre-*loxP*-Systems führt über fortschreitende PanIN-Läsionen zu extensiven duktalem Läsionen mit Ersatz des azinären Parenchyms durch Stroma mit fibroinflammatorischen Reaktionen ähnlich dem humanen Pankreaskarzinom [56]. Allerdings ist die Progression zum invasiven und metastatischen PDAC mit großen, verhärtet-fibrotischen, nodulären Verdichtungen in Leber, Zwerchfell, Pleura und Nebennierenkortex, gleich dem humanen PDAC, innerhalb eines Jahres nur in niedriger Frequenz zu sehen [56]. Die Kombination mit zusätzlicher konditionaler Inaktivierung des *Trp53*-Gens im exokrinen Pankreas in *LSL-Kras^{G12D} LSL-Trp53^{R172H/-}*-Mäusen präsentiert frühe PanIN-Läsionen ähnlich dem *LSL-Kras^{G12D}*-Modell, jedoch entwickeln diese schon im Alter von circa zehn Wochen das volle Spektrum präinvasiver Läsionen mit moderat bis gut differenzierten Pankreaskarzinomen und Metastasierung in Leber, Lunge, Zwerchfell und Nebennieren [57]. Diese Mäuse weisen eine deutlich verkürzte mediane Überlebenszeit von circa fünf Monaten auf und sterben alle vor 12 Monaten [57].

Ein weiteres häufig mutiertes Gen in der Progression des Pankreaskarzinoms betrifft *Ink4a/ARF* [41, 139]. Die Deletion im *Ink4a/ARF*-Locus allein verursacht keine spontanen Pankreasadenokarzinome, jedoch führt die Kombination mit Überaktivierung von *Kras* im *LSL-Kras^{G12D} Ink4A/ARF^{lox/lox}*-Modell mit Deletion der Proteine p16^{Ink4a} und p19^{ARF} zu früher Entwicklung von PanIN-Läsionen und rapidem Progress zu schlecht differenzierten, hoch invasiven und metastatischen Pankreaskarzinomen mit Tod vor dem 11. Lebensstag [2].

Kombiniert man die *Kras^{G12D}*-Mutation mit Deletion von *Smad4*, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert und einen zentralen Effektor von TGF- β darstellt, führt dies im murinen Modell zu einer rapiden Entwicklung von IPMN's, PanIN's und azinär-duktalem Metaplasie ab einem Alter von vier Wochen mit anschließender moderater maligner Progression mit gut bis moderat differenzierter Morphologie [7]. Ab der achten Woche beobachtet man eine abdominelle Masse und die terminale Morbidität erreichen diese Mäuse

zwischen Woche acht und 24 [7]. Erweitert man dieses Mausmodell um die Deletion von *Ink4a/ARF*, wie es in humanen PDAC simultan zum Verlust von *Smad4* auftritt, so führt dies zu signifikant reduziertem Überleben von acht Wochen, assoziiert mit PDAC und geringer Entwicklung von IPMN's sowie Lebermetastasen [7].

Des Weiteren gibt es Modelle, welche vorrangig azinäre Promoter wie den Elastase-Promoter nutzen. Hierzu zählen das *Mist1-Kras^{G12D}*- [164], das *Ela-Kras^{G12D}*- [44] sowie das *Ela-TGF α* -Modell mit und ohne Kombination einer *Trp53*-Deletion [77, 171]. *Mist1-Kras^{G12D}*-Mäuse zeigen ein verkürztes medianes Überleben von 10,8 Monaten aufgrund fortgeschrittenen, meist azinär differenzierten, Pankreaskarzinomen nach azinär-duktalem Metaplasie ab einem Alter von zwei Monaten mit massiver Metastasierung [164].

Dagegen sind *Ela-Kras^{G12D}*-Mäuse durch azinär-duktales Metaplasien und tubuläre Komplexe charakterisiert, welche von fokalen Dysplasien und Fibrose begleitet werden [44]. Neoplasien werden ab einem Alter von 11 Monaten beobachtet, gehen jedoch nicht über das präinvasive Stadium hinaus [44], hindeutend auf eine frühe Involvierung von *Kras* im Pankreaskarzinomprogressionsmodell. Um über das präinvasive Stadium hinaus fortzuschreiten, sind jedoch weitere genetische Alterationen notwendig.

Die Überexpression von TGF α unter Kontrolle des Rattenelastasepromoters im *Ela-TGF α -hGH*-Modell des exokrinen Pankreas führt schon im frühen Alter von zwei Wochen zu progressiven fibrotischen Veränderungen und induziert die Transdifferenzierung von Azinuszellen zu gangähnlichen Zellen, welche tubuläre Komplexe und zystische Strukturen bilden [172]. Diese tubulären Komplexe verlieren ihre typischen azinären Markerproteine und exprimieren duktales Marker wie Zytokeratin-19 [172]. Im Alter von ca. einem Jahr weisen Pankreata dieser Mäuse dysplastische Veränderungen der tubulären Komplexe, welche multifokal maligne transformieren, und einen papillär-zystischen Phänotyp auf [172]. Die tubulären Komplexe repräsentieren somit Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms. Darüber hinaus konnte eine Überexpression von EGFR durch die persistierende Stimulation von TGF α in diesen tubulären Komplexen nachgewiesen werden [42, 172], welches die Rolle dieses Signalweges mit Bildung einer autokrinen Schleife, ähnlich dem humanen PDAC, in der Formation tubulärer Komplexe belegt [93]. Ergebnis der transgenen Überexpression von TGF α in azinären Zellen während der präkanzerösen Periode ist die selektiv in tubulären Komplexen konstitutive Aktivierung der onkogenen Ras/Erk-Kaskade, welche zur Entwicklung prämaligener Läsionen führt [42, 171]. Die Deletion des Tumorsuppressors *Trp53*, einem potenten Antagonisten der Ras-induzierten Onkogenese *in vivo*, beschleunigt die Karzinogenese erheblich und führt zur Entwicklung kanzeröser Läsionen ab 45 Tagen.

Weitere zusätzliche Mutationen wie der LOH des *Ink4a/ARF*-Lokus in TP-Mäusen, auch charakteristische homozygote Deletion im humanen PDAC [4, 17], konnten nachgewiesen werden. Anders als im humanen PDAC, trat die Alteration des *Smad4/DPC4*-Lokus nur selten im TP-Modell auf [42, 171]. Histopathologisch entstehen in TP-Mäusen vor einem Alter von 120 Tagen Pankreaskarzinome mit duktalem Phänotyp über tubuläre Komplexe aus Azinuszellen, wachsen lokal invasiv mit duodenaler Obstruktion und metastasieren in Leber und Lunge.

Anders als viele anderen Mausmodelle, welche vor allem eine azinäre Differenzierung der Pankreaskarzinome zeigen, repräsentiert das TP-Modell des duktales Pankreaskarzinoms ein sequenzielles Tumorprogressionsmodell, welches sowohl die pathomorphologischen Eigenschaften als auch die genetischen Alterationen des humanen Pankreasadenokarzinoms am besten rekapituliert.

2. NFκB fördert die Pankreaskarzinogenese

Während seit langem die essentielle Rolle von NFκB als Transkriptionsfaktor vieler in immunologischen Prozessen involvierten Gene bekannt ist, hat sich das Wissen um die Rolle des Proteins in der Onkogenese erst kürzlich entwickelt. Schon vor Jahrzehnten vermutete Virchow, dass chronische Entzündungen zur Entartung führen können [6]. Dabei ist heute eine Assoziation von Inflammation und Onkogenese mit Involvierung von NFκB bei vielen Erkrankungen bekannt [26, 84-87, 98, 103, 122, 133].

Nach Hanahan und Weinberg 2000 [49] transformieren normale Zellen durch Erwerb der gleichen funktionellen Fähigkeiten durch verschiedenste Strategien zu Tumorzellen. Dazu zählen die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen (Autonomie), Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, Gewebeinvasion und Metastasierung, grenzenloses replikatives Potential, Neoangiogenese und Vermeidung der Apoptose. Da NFκB einen transkriptionellen Regulator von Genen, deren Produkte in fundamentale biologische Zellprozesse wie Proliferation, Apoptose, Inflammation und Angiogenese involviert sind, darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass aberrante Transduktion NFκB-Signalweges mit konstitutiv aktiviertem NFκB die Gefahr einer Dysregulation dieser Prozesse mit potenzieller Entartung solcher Zellen birgt.

Erstes identifiziertes Mitglied der Rel/ NFκB-Familie war das durch das Rev-T Onkovirus produzierte v-Rel. Das konstitutiv aktivierte Onkoprotein v-Rel führt in jungem Geflügel zur Entstehung von schnell wachsenden Lymphomen und Leukämien und ist in der Lage, auch

verschiedene Geflügelzelllinien *in vivo* und *in vitro* sowohl zu transformieren als auch durch seine anti-apoptotischen Fähigkeiten zu immortalisieren [40]. Den ersten Hinweis einer Rolle von NFκB-Mitgliedern in der Tumorgenese ergab der Nachweis von c-Rel, zelluläres Homolog des v-Rel Onkogens, dessen Überexpression in verschiedenen Lymphomen nachgewiesen werden konnte. C-Rel kodiert eine κB-DNA-Sequenz, die Rel homology Domäne, welche alle Proteine der Rel/ NFκB-Familie zur DNA-Bindung besitzen [40, 189], und legte so die Vermutung der Onkogenität auch anderer Rel/ NFκB-Mitglieder nahe.

Tatsächlich wurde konstitutiv aktiviertes RelA/p65 in verschiedenen soliden Tumoren u.a. des Verdauungstraktes [19, 76, 105, 142, 145, 183], hepatozellulären Karzinomen [159], Karzinomen der weiblichen Geschlechtsorgane [11, 119, 121, 127, 156] sowie der Prostata [153, 158] dokumentiert. Auch weitere Studien konnten die konstitutive Aktivierung von NFκB sowohl *in vivo* in humanen Pankreasadenokarzinomgewebe als auch *in vitro* in Pankreasadenokarzinomzelllinien belegen, während dies in nicht transformierten Pankreaszellen nicht nachgewiesen werden konnte [35, 106, 149, 176]. Der positive Nachweis von NFκB in humanen Pankreaskarzinomen korreliert dabei mit einer schlechten Prognose, und vor allem diese Subgruppe von Patienten könnte von NFκB-Inhibitoren profitieren [178].

Umfangreiche Evidenzen demonstrieren, dass NFκB in Kooperation mit anderen Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen eine zentrale Rolle in der Onkogenese verschiedenster Tumoren einnimmt. Verschiedenste Akteure wie Ras, welches in 65% der Pankreasadenokarzinomgewebe und in 89% der Pankreasadenokarzinomzelllinien simultan mit konstitutiv aktivem RelA in mutierter Form des Codons 12 vorlag [176], oder TNF-α [125], PDGF [137], EGFR [47, 106] und Her2neu/Erb2-Rezeptor [132] initiieren Signaltransduktionswege, welche in der transkriptionellen Aktivierung von NFκB konvergieren. NFκB ist deshalb Gegenstand vieler Untersuchungen verschiedenster Tumoren und Signalwege.

Der konventionelle ubiquitäre *Rela*-Genknockout führt zu früher embryonaler Letalität am 15-16. Tag aufgrund massiver Leberzellapoptose [10], daher war es essentiell, NFκB spezifisch und ausschließlich im Pankreas zu inaktivieren, um die Rolle des NFκB-Signalweges valide in der Pankreaskarzinogenese *in vivo* analysieren zu können.

Bisher beschränkten sich Untersuchungen des IKK/ IκB/ NFκB-Signalweges verschiedener Arbeitsgruppen mit gentechnologisch veränderten Mausmodellen auf Inaktivierung der im Signalweg vorgeschalteten Proteine IKK oder IκB. Die konditionale Inaktivierung von NFκB selbst im murinen *in vivo*-Modell der pankreatischen Onkogenese wurde bisher nicht untersucht. Daher analysiert diese Arbeit erstmals die direkte Rolle von abladiertem RelA/p65 selbst im murinen *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc} RelA^{Δpanc}*-Pankreasadenokarzinommodell.

In dieser Arbeit untersuchten wir den Effekt einer gewebespezifischen Inaktivierung von *Rela*, dessen zugehöriges Protein RelA/p65 Untereinheit des am häufigsten vorkommenden NFκB-Heterodimers darstellt, auf Proliferation, Apoptose und Morphologie *in vivo* und *in vitro* in einem murinen Pankreaskarzinommodell. Unter Anwendung des Cre-*loxP*-Rekombinationssystems generierten wir die *Ela-TGFα Trp53^{Δpanc} Rela^{Δpanc}*-Mauslinie, hier als TPa bezeichnet, welche den Verlust der nukleären Translokation, DNA-Bindung und Dimerisierung von NFκB aufweist und damit transkriptionell inaktiv ist. Dieses etablierte Mausmodell ähnelt in seinen Eigenschaften sowohl genetisch als auch pathomorphologisch dem humanen Pankreaskarzinom weitgehend (siehe Kap. 3) und eignet sich deshalb besonders für die gentechnologisch basierte Analyse der spezifischen Rolle von NFκB in der Onkogenese des Pankreaskarzinoms.

Unsere Untersuchungen des Wachstumsfaktor getriebenen Pankreaskarzinommodells wiesen eine nukleäre Aktivierung des NFκB-Signalweges im TP-Modell nach, während dieser bei *Rela*-Knockout im TPa-Modell aberrant war, was durch Deletion der RHD mit Verlust der nukleären Translokation und DNA-Bindung zu erklären ist.

Um einen möglichen Effekt einer Inaktivierung von NFκB und dessen Signalweg auf die Pankreasmikromorphologie zu analysieren, untersuchten wir Pankreasgewebeschnitte sowohl vier Wochen alter als auch adulter Mäuse. Die immunhistochemische Evaluation zeigte in H&E-gefärbten Pankreasgewebeschnitten vier Wochen alter Mäuse des TP- und TPa-Modells in beiden Modellen multifokal frühneoplastische Läsionen mit Transdifferenzierungsprozessen von Azini zu gangähnlichen Strukturen und vermehrter Fibrose. Diese frühen Neoplasien mit Fibrose sind typisch für das Wachstumsfaktor getriebene *Ela-TGFα-hGH*-Modell [172]. Es fielen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß oder der Morphologie der Läsionen auf, die auf früheren Tumorprogress in einem der Modelle hinwiesen, was auf den frühen Zeitpunkt von vier Wochen zurückgeführt werden kann. Dies wird durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kim unterstützt, welche belegen, dass NFκB vor allem in frühen Stadien der malignen Transformation, noch vor Tumorentstehung, nachgewiesen werden kann und gerade dann eine kritische Rolle spielt [90].

Beim Vergleich der Überlebenszeit resultierte jedoch eine signifikant erhöhte Überlebenszeit (361 vs. 300 Tage; $p=0,0034$) im konditionalen *Rela*-Knockout-Modell. Bei Sektion der adulten Mäuse wurde festgestellt, dass, bei gleicher Tumorinzidenz in beiden Modellen, dies auf langsameren Tumorprogress zurück zu führen war. Im TPa-Modell wurde makromorphologisch ein vermindertes Auftreten von Tumorinvasion in Nachbarorgane mit Cholestase und Metastasierung beobachtet, gleich den Ergebnissen früherer Untersuchungen:

Versuche, den IKK/ I κ B/ NF κ B-Signalweg beispielsweise mit Überexpression von mutiertem I κ B α (I κ B α M), welches resistent gegenüber Phosphorylierung und Degradierung ist und damit die Aktivierung von NF κ B hemmt, oder gegensinniger p65-RNA zu inhibieren, zeigten in Xenotransplantationsmodellen von Tumoren wie Melanom, Prostatakarzinom, Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals sowie Ovarialkarzinom eine Regression des Tumorprogresses und Inhibition der Angiogenese und Metastasierung [31, 55, 68-70]. Auch in Xenotransplantationsmodellen des Pankreaskarzinoms mit I κ B α M [34, 35, 181] und anderen zellulären NF κ B-Inhibitoren [60] konnte eine Regression des Tumorwachstums nachgewiesen werden. Fujioka konnte 2003 [35] sogar bei Injektion von humanen Panc-1 Zellen ohne I κ B α M-Expression in 100% der Nacktmäuse entstandene Tumorformation nachweisen, während Injektion derselben Zellen mit I κ B α M-Expression keine Tumorformation aufwies.

Mikromorphologisch konnten wir in H&E-gefärbten Pankreasgewebeschnitten des TPa-Modells adulter Mäuse signifikant häufiger ein duktales Karzinom mit erhaltener Differenzierung beobachten, während Pankreata von TP-Mäusen ihre Differenzierung verloren hatten und sarkomatöses Wachstum polymorpher Zellen zeigten, hinweisend auf verlangsamten Tumorprogress durch Inaktivierung von NF κ B.

Sowohl unsere als auch die Ergebnisse anderer, lassen zusammenfassend den Schluss zu, dass NF κ B eine zentrale Rolle in der pankreatischen Onkogenese spielt. Dies wird weiterhin durch den Nachweis einer Blockade bzw. Verzögerung des Tumorprogresses mit Hilfe einer Inaktivierung von NF κ B untermauert.

Hierbei stellte sich die Frage, ob dieser verzögerte Tumorprogress im TPa-Modell durch Dysregulation biologischer Prozesse mit Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung verminderter Proliferation und erhöhter Apoptose oder gar beidem verursacht wurde, welches wir ins unseren weiterführenden Experimenten analysierten.

2.1 NF κ B fördert Proliferation *in vivo* und *in vitro* im TP-Modell des Pankreaskarzinoms

Unkontrollierte Proliferation stellt eine notwendige Fähigkeit von Tumorzellen dar und kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden: deregulierte Signalwege durch Aktivierung von Onkogenen, Inhibition von Tumorsuppressorgenen, welche in die Zellzyklusregulation involviert sind, oder abnormale Wachstumssignale außerhalb der Zelle. Untersuchungen verschiedener Zellen *in vitro* und Geweben *in vivo* haben die Kontrolle der Zellproliferation durch NF κ B als potentiell Onkogen über den IKK/ I κ B/ NF κ B-Signalweg und den Effekt der Inhibition konstitutiv aktiviertem NF κ B in zahlreichen Tumoren

nachgewiesen. Dabei konnte Cyclin D1, ein in zahlreichen Tumoren überexprimierter Zellzyklusregulator [91, 92], welcher auch bei Überexpression mit einer schlechten Prognose im humanen PDAC assoziiert ist [36, 94], als eines der Zielgene von NFκB identifiziert werden: Zum Beispiel zeigte Cao 2001 [20] *in vivo* im IKKα^{AA/AA}-Modell einen Aktivierungsdefekt von NFκB und daraus resultierender signifikanter Reduktion der Cyclin D1-Expression einhergehend mit fehlender Proliferation des Brustdrüsenepithels in schwangeren Mäusen. Diese Reduktion der Cyclin D1-Expression konnte durch ein Cyclin D1-Transgen wieder normalisiert werden, wobei die NFκB-Aktivität weiterhin erniedrigt war [20]. Gleiches konnte in Mäusen mit spezifischem IκBα-Superrepressor beobachtet werden [20]. Brantley wies 2001 [15] gesteigerte Proliferation von Brustdrüsenepithel IκBα-defizienter Mäuse nach Transplantation nach; Holcomb zeigte 2008 [60] eine verminderte Cyclin D1-Expression in Gewebe eines Xenotransplantationsmodells des Pankreaskarzinoms nach Behandlung mit NFκB-Inhibitoren, welches auf eine direkte Aktivierung von Cyclin D1 durch NFκB hinweist.

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen von sowohl vier Wochen alten als auch adulten Mäusen des TPa-Modells zeigten in der BrdU- und Cyclin D1-Färbung, beides Proliferationsmarker, insgesamt eine deutlich verminderte Anzahl von S-Phase-Zellen und Cyclin D1-Expression im konditionalen *Rela*-Knockout-Modell. Proliferation wurde vermehrt im Bereich der gangähnlichen Strukturen beobachtet, welche in vier Wochen alten Mäusen Transformationsvorgänge von Azinuszellen zu duct-like cells darstellen. In adultem Gewebe findet sich verstärkte Proliferation an Übergängen von besserer zu schlechterer Differenzierung duktaler Karzinome, hinweisend auf zunehmend unkontrolliertes und autonomes Zellwachstum mit Verlust der Differenzierung, sowie am Karzinomrand, welches mit erhöhter Invasivität des Tumors vereinbar ist. In Konsens mit unseren Ergebnissen, wies Al-Aynati 2004 [3] immunhistochemisch eine Überexpression von Cyclin D1 in 27%, Cyclin E in 71% und von CDK4 in 76% der humanen PDAC-Gewebe nach.

Die quantitative Auswertung ergab eine signifikant verminderte Proliferation mit 92,19 vs. 148,61 positiven Zellen pro 1.000 Zellen im TPa-Modell vier Wochen alter Mäuse; der Unterschied zeigte sich vor allem in den frühneoplastischen gangähnlichen Zellen. Daraufhin untersuchten wir proteinbiochemisch die G1-Phase Zellzyklusregulatorproteine Cyclin D1, Cyclin E und CDK4 in Pankreasgewebelysaten vier Wochen alter Mäuse: Die Ergebnisse bestätigten die Herunterregulation von sowohl Cyclin D1 als auch Cyclin E und CDK4 im TPa-Modell.

Sowohl unsere als auch weitere Evidenzen weisen damit eine Regulation der Cyclin D1-Expression durch NFκB im Pankreaskarzinom *in vivo* nach. Die Cyclin E- und CDK4-Expression wird höchstwahrscheinlich ebenfalls durch NFκB reguliert, weist jedoch in der Literatur widersprüchliche Resultate auf und erfordert deshalb weitere Untersuchungen zur Bestätigung.

Konstitutiv aktiviert, wie es Pankreaskarzinome zeigen, trägt NFκB zu hochregulierter Transkription von frühen Zellzyklusregulatoren, und damit zur beschleunigten Progression entarteter Zellen des G1/S-Phasen-Übergangs maßgeblich bei. Konsistent zu Untersuchungen Anderer die belegen, dass konstitutive NFκB-Aktivität schon früh, noch vor Tumorformation, nachgewiesen werden kann [90], konnten auch wir in Pankreata vier Wochen alter Mäuse mit Inaktivierung von NFκB schon signifikante Unterschiede im Proliferationsindex von frühneoplastischen Läsionen *in vivo*, noch vor Karzinomentstehung, nachweisen.

In vitro konnte Kaltschmidt 1999 [83] eine Verminderung des Zellwachstums von HeLa-Zellen und retardierter G1/S-Transition bei Überexpression eines transdominant negativem IκBα-Proteins, mit resultierender defizienter Fähigkeit der nukleären Translokation von NFκB zeigen; Guttridge, Joyce und Hinz wiesen 1999 [46, 58, 81] die direkte Aktivierung der Transkription von Cyclin D1 durch NFκB über eine proximale Bindungssequenz im Cyclin D1-Gen in verschiedenen Zelllinien nach. Für die Transkriptionsaktivierung von Cyclin D1 wird NFκB vor allem in der frühen G1-Phase benötigt. Inhibition von NFκB führt zu vermindertem G1/S-Übergang mit verspäteter Phosphorylierung des Retinoblastomproteins, welches durch ektope Expression von Cyclin D1 überwunden werden kann [46, 58]. Auch wir beobachteten ein langsames Wachstum von TPa-Zelllinien mit verlängerter Dauer zur subkonfluenten Bewachung, sowie auch eine Herunterregulation von Zellzyklusregulatorproteinen aus Zelllinien (Daten nicht gezeigt) bei simultanem Nachweis fehlender nukleärer Translokation von NFκB. Dies belegt eine Regulation der Proliferation durch NFκB *in vitro*. Die Inaktivierung des NFκB-Signalweges führt dabei zu verminderter Expression des Zielgens Cyclin D1 und folglich zu verminderter Progression der G1- zur S-Phase in kultivierten Tumorzellen.

Eine Regulation von CDK4 durch NFκB, wie sie *in vivo* nachgewiesen wurde, konnten Guttridge 1999 [46] in Myo- und Fibroblasten und Radulovich 2010 [134] in humanen PDAC-Zelllinien nicht nachweisen, während Untersuchungen von Kaltschmidt 1999 [83] in HeLa-Zellen stark erhöhte CDK4 Level bei unveränderten Cyclin D1- und Cyclin E-Leveln nach Aktivierung zeigten.

Sowohl unsere als auch Untersuchungen anderer zeigen zusammenfassend, dass Zielgene von NFκB eine Schlüsselrolle in der Übertragung mitogener Signale und damit der Proliferation von Zellen spielen. Diese erfordern NFκB für die direkte Stimulation im frühen Zellzyklus in der G1-Phase sowie am Übergang zur S-Phase. Eine Regulation von Cyclin D1, als Zielgen mit Bindungssequenz für NFκB, *in vivo* ist gesichert, während für die direkte Aktivierung weiterer Zellzyklusregulatoren wie Cyclin E und CDK4 durch NFκB noch Inkonsistenzen in Ergebnissen herrschen. Unsere Ergebnisse zeigen eine Herunterregulation von Cyclin E und CDK4 bei Inaktivierung von NFκB im murinen Pankreaskarzinommodell, hinweisend auf eine direkte Regulation durch NFκB. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, um diese als direktes Ziel von NFκB zu verifizieren.

Es bestehen jedoch weitere Hinweise auf eine Verbindung zwischen NFκB und der Zellzykluskontrolle durch die Regulation von RelA durch CDK's über Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300: RelA interagiert mit einer C-terminalen Domäne mit CBP und p300 über deren N-terminale Domäne; CyclinE-CDK2 kann dann an eine C-terminale Region von CBP oder p300 binden und mit den RelA/p300-Komplex interagieren [38, 129, 187].

Durch konditionale Inaktivierung von NFκB im murinen Pankreaskarzinom mit Verlust der Fähigkeit zur nukleären Translokation und DNA-Bindung aufgrund Deletion seiner RHD, werden Zielgene wie Zellzyklusregulatorproteine in Tumorzellen nicht ausreichend transkribiert. Dies führt dazu, dass die Transition in die S-Phase nicht vollzogen werden kann, der Zellzyklus in der G1-Phase arretiert und die Proliferation supprimiert wird. Die konstitutive Aktivierung von NFκB in Pankreaszellen geht damit mit Überstimulation des Zellzyklus und Transition in die S-Phase einher und verschafft damit diesen Zellen einen Überlebensvorteil, was letztendlich zur malignen Entartung maßgeblich beiträgt. Untersuchungen zum G2/M-Checkpoint zeigen keine Alteration, dieser scheint von NFκB oder dessen Zielgenen unbeeinflusst zu sein [167].

2.2 NFκB beeinflusst die Apoptose in späteren Stadien der Pankreaskarzinomentwicklung

Eine weitere maßgebliche Eigenschaft von Tumorzellen stellt die Fähigkeit dar, der Apoptose zu entgehen. Als nächstes stellten wir uns die Frage, ob NFκB neben einem proliferationsfördernden auch einen hemmenden Effekt auf die Apoptose von transformierenden Pankreaszellen im TP-Modell des Pankreaskarzinoms aufweist. Folglich würde dies zu fehlender Eliminierung dieser neoplastischen Zellen, verbunden mit potenzieller Entartung, führen.

Erste Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion von NF κ B lieferten Versuche von *Rela*-defizienten Mäusen, welche aufgrund extensiver Leberzellapoptose am 15.-16. embryonalen Tag verstarben [9]; einen ähnlichen Phänotyp präsentierten *IKK2*-defiziente Mäusen durch fehlende NF κ B-Aktivierung über den IKK/ I κ B α / NF κ B-Signalweg [102]. In den letzten Jahren häuften sich in experimentellen Studien Ergebnisse einer anti-apoptotischen Funktion von NF κ B bzw. erhöhter Suszeptibilität von Zellen gegenüber TNF- α bei Inaktivierung von NF κ B, welches sich auch bei Behandlung von Zellen mit Chemotherapeutika und Strahlen zeigte [37, 107, 166, 173, 174]. Die anti-apoptotische Funktion von NF κ B ist dabei auf die Induktion seiner Zielgene zurückzuführen, welche sowohl über den Todesrezeptor vermittelten als auch über den mitochondrialen Signalweg getriggert werden können: Dazu zählen u.a. cIAP's wie XIAP, Survivin, cIAP1 und cIAP2, Mitglieder der Bcl-2-Familie, FLIP, TRAF 1 und TRAF2 [48, 87].

Eine Überexpression von cIAP2, Survivin und XIAP wurde im humanen PDAC demonstriert [32, 143]. CIAP binden direkt und inhibieren Effektorcaspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 und verhindern die Aktivierung von Procaspase-6 und Procaspase-9 [29]. Zum Beispiel konnte die Induktion von cIAP2 nach Stimulation mit TNF- α oder PMA plus Ionomycin durch die Phosphorylierung von I κ B α und Aktivierung von NF κ B gezeigt werden, welche durch Einsatz einer degradationsresistenten I κ B α -Mutante komplett blockiert wurde [22]. Des Weiteren konnte Hong 2000 [61] funktionelle κ B-Gensequenzen in der Promotorregion von cIAP2 nachweisen. Auch die Inhibition der Initiierung der Caspasenkaskade durch Hemmung der Aktivierung von Caspase-8 durch Interaktion von cIAP1 und cIAP2 mit TRAF1 und TRAF2 wurde belegt [174]. Dabei bietet die alleinige Expression von cIAP1, cIAP2, TRAF1 oder TRAF2 in *Rela*-defizienten embryonalen Fibroblasten nur kaum oder keine vor TNF- α -induzierte Apoptose schützende Funktion [174]. Zusätzlich führt die Aktivierung von NF κ B durch TRAF2 zur Transkription des Caspase-8 Inhibitors FLIP [113, 114]. NF κ B kontrolliert damit den anti-apoptotischen Mechanismus vor proteolytischer Aktivierung von Caspase-3 und vor Aktivierung des intrinsischen Signalweges.

Weitere NF κ B-regulierte Gene sind Gene der Bcl-2-Familie, darunter Bfl-1/A1, ein Bcl-2-Homolog, welches zur Resistenz verschiedener Apoptose-Induktoren ähnlich Bcl-2 führt [188] und Bcl-x_L, dessen Überexprimierung im murinen TGF α -transgenen Modell in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden konnte [43].

In unseren Untersuchungen konnten wir einen anti-apoptotischen Effekt von NF κ B im TP-Modell nicht bestätigen. Sowohl unsere immunhistochemischen Untersuchungen mit Cleaved-Caspase-3-Antikörpern von Pankreata vier Wochen alter Mäuse als auch die

quantitative Analyse konnten keinen signifikanten Unterschied belegen. Weder im Gesamtvergleich beider Mausmodelle noch beim Vergleich der einzelnen Zelltypen, Azinus- und duktale Zellen, separat voneinander, zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Insgesamt beobachteten wir selten Cleaved-Caspase-3-positive Zellen in beiden Modellen. Apoptose scheint ein seltenes Ereignis sowohl im TP- als auch im TPa-Modell vier Wochen alter Mäuse zu sein. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass einerseits nur wenige Zellen zum Zeitpunkt von vier Wochen transformiert waren, sodass im TPa-Modell keine physiologische Elimination dieser Zellen stattfand, andererseits Zellen frühneoplastischen Läsionen vier Wochen alter Mäuse teilweise noch ausreichend den physiologischen Zellregulationsmechanismen unterworfen sind und deshalb Apoptose nicht signifikant häufiger im TPa-Modell stattfindet bzw. ein anti-apoptotischer Effekt im TP-Modell nachweisbar war. Eine weitere Begründung könnte die fehlende protektive Funktion des Tumorsuppressors p53 in beiden Modellen sein, welches frühzeitig zur Apoptose entartender Zellen führt. Es fällt jedoch auf, dass Apoptose in beiden Mausmodellen häufiger in Azinus- als in dukталen Zellen stattfindet. Dies ist durch den konditionalen Genknockout, welcher vor allem azinäre Zellen betrifft, zu erklären. Diese transdifferenzieren im TGF α -transgenen Modell zu gangähnlichen Strukturen und bilden tubuläre Komplexe, welche sich gelegentlich zum Pankreaskarzinom entwickeln [42]. Hier finden wahrscheinlich neben dem aberranten p53-Signalweg andere pro-apoptotische Zellregulationsmechanismen dieser prämaligen Läsionen noch reguliert statt und führen in diesen wenigen Azinuszellen zu subsequenter Elimination. Vermutlich ist der Zeitpunkt von vier Wochen noch zu früh, um einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Mausmodellen zu untersuchen und zu belegen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit Untersuchungen von TGF α -transgenen Mäusen, bei welchen erst zum Zeitpunkt von 180 Tagen eine anti-apoptotische Funktion durch NF κ B in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden konnte [43]. Im weiteren Verlauf könnte die schnellere Karzinogenese mit Zellzyklusdysregulation und konstitutiver Aktivierung von NF κ B im TP-Modell zur Apoptoseresistenz führen, dies müsste jedoch zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen drei Monate alter Mäusepankreatata konnten wir nur unbefriedigend durchführen, da zu diesem Zeitpunkt die Pankreatata schon massiv fibrotisch verändert und nicht beurteilbar waren.

Während NF κ B vor allem eine anti-apoptotische Funktion zugesprochen wird, gibt es einzelne Belege einer pro-apoptotischen Funktion in frühen Stadien der Onkogenese [18, 128, 130]. Diese sind jedoch abhängig vom jeweiligen Stimulus sowie des gegebenen Zellkontexts und müssen noch weiter validiert werden.

Viele Evidenzen weisen eine anti-apoptotische Funktion von NFκB über die Expression von anti-apoptotischen Zielgenen nach. Diese hemmen Checkpunkte verschiedener Signalwege, die den programmierten Zelltod initiieren, und begünstigen das Überleben entarteter Zellen. Diese Apoptoseresistenz stellt bei der chemotherapeutischen Behandlung des Pankreaskarzinoms ein Problem dar und kann durch Inhibitoren von NFκB deutlich verbessert werden [5, 60, 173, 182].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NFκB als wichtiger transkriptioneller Regulator von pro- und anti-apoptotischen Genen fungiert und das Zellüberleben über verschiedene Mechanismen kontrolliert. Die Aktivierung von NFκB führt zu vermehrter Proliferation und schützt transformierende Zellen in späteren Stadien vor Apoptose. Damit fördert NFκB die Tumorgenese über einen Selektionsvorteil der Pankreaskarzinomzellen und stört die homöostatische Balance zwischen Zellwachstum und Zelltod zu Gunsten von Zellen, die Proliferation und anti-apoptotische Überlebensmechanismen nutzen.

3. NFκB fördert die Metastasierung und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) im Pankreaskarzinom

Frühe Gewebeinvasion und Metastasierung sind ebenfalls typische Eigenschaften von Tumorzellen und sind neben den aggressiven Wachstumseigenschaften ein Grund für die schlechte Prognose des duktales Pankreaskarzinoms [148]. Für diese Prozesse scheint die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von besonderer Wichtigkeit zu sein. Die EMT ist ein reversibler biologischer Prozess, der es epithelialen, immobilen Zellen mit Anhaftung sowohl aneinander als auch an die Basalmembran erlaubt, durch verschiedenste biochemische Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp mit erhöhter Migrationsfähigkeit, Invasivität und Apoptoseresistenz anzunehmen [82]. Damit stellt die EMT einen Prozess dar, der zur Initiierung des invasiven und metastatischen Verhaltens von epithelialen Zellen führt und spielt damit eine zentrale Rolle in der Tumorprogression [82].

In unseren Untersuchungen konnten wir eine signifikant verminderte Überlebenszeit des TP-Modells bei gleicher Tumorinzidenz des TPa-Modells zeigen. Bei Sektion der TP- und TPa-Mäuse beobachteten wir vermehrt das Auftreten von Tumorinvasion in Nachbarorgane mit Cholestase und Metastasierung in Leber, Lunge und Peritoneum im TP-Modell, während diese im TPa-Modell kaum nachzuweisen waren. Diese Beobachtungen sind konsistent mit Untersuchungen Anderer, die eine Inhibition der Angiogenese und Metastasierung durch Inaktivierung von NFκB in verschiedenen Geweben belegen [68-71]. Ähnlich unseren

Ergebnissen, wiesen auch Untersuchungen an Xenotransplantationsmodellen mit AsPc-1-Zellen eine signifikant verminderte Lebermetastasenbildung auf, wenn in diesen NFκB über ein degradationsresistentes IκBα inhibiert wurde [34]. Auch die Inhibition von NFκB in einem Xenotransplantationsmodell mit L3.3-humanen Pankreaskarzinomzellen belegte eine Reduktion der Lebermetastasenbildung dieser Mäuse einhergehend mit dem Nachweis einer Suppression der VEGF- und IL-8-Produktion [181]. Dabei korrelierte die erniedrigte Expression der proangiogenetischen Schlüssel-moleküle direkt mit der verminderten Neovaskularisation der Tumoren [75, 181]. Weitere Versuche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten die Verminderung einer Expression von VEGF und IL-8 bei Inhibition von NFκB bestätigen [35, 100]. Die Fähigkeit zur Induktion der proangiogenetischen Zytokine VEGF, welches in humanen Pankreaskarzinomen überexprimiert ist [75], und IL-8, impliziert die Rolle von NFκB in der Angiogenese und Metastasierung von Tumoren.

Des Weiteren fielen in der pathologischen Analyse von H&E-Schnitten adulter Tiere auch Unterschiede in der Tumordifferenzierung auf: während das TPa-Modell in 75% duktales Differenzierung zeigte, wies das TP-Modell mit 73% signifikant häufiger entdifferenzierte, vor allem mesenchymale, Karzinome auf, welches uns zur Hypothese veranlasste, dass NFκB im TP-Modell über einen Prozess der Entdifferenzierung, wahrscheinlich EMT, zur Umwandlung eines epithelialen Phänotyps zu einem spindelzellartigem Phänotyp mit schnellerer Tumorprogression aufgrund Invasivität und Metastasierung führt. Frühere Arbeiten wiesen den Ras/MAPK- und TGF-β-Rezeptor-Signalweg als Trigger einer EMT nach [72, 82], kürzlich konnte auch NFκB als essentieller Auslöser für die Initiierung und Aufrechterhaltung der EMT in einem Brustkrebsmodell identifiziert werden: In diesen Ha-Ras-transformierten Brustepithelzellen verhinderte die Inhibition von NFκB die EMT bei TGF-β-Stimulation [71].

Um unsere Hypothese der EMT zu überprüfen, färbten wir Gewebeschnitte mit dem duktalem Marker Zytokeratin-19 zur Identifikation des epithelialen Ursprungs der Karzinomzellen, um eine potenzielle Transdifferenzierung nachzuweisen. Weiterhin färbten wir die Gewebeschnitte mit dem für adhäsive, epitheliale Zellen charakteristischen Marker E-Cadherin, sowie dem mesenchymalen Marker Vimentin, beides Zielgene von NFκB und zentrale Markerproteine der EMT [160]. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten im TPa-Modell den epithelialen Ursprung mit positiver Zytokeratin-19 und E-Cadherin-Färbung ohne Nachweis von Vimentin. Im Gegensatz hierzu konnte im TP-Modell nur die mesenchymale Eigenschaft mit positiver Vimentin-Färbung nachgewiesen werden. Allerdings war in spätneoplastischen Läsionen des TP-Modells noch Zytokeratin-19 und E-Cadherin

nachzuweisen. Hier scheint eine Transdifferenzierung von epithelialen, duktalem Zellen hin zu spindelzellartigen, mesenchymalen Zellen mit Verlust der E-Cadherin- bzw. Zytokeratin-19-Expression und Induktion der Vimentin-Expression in späten Stadien des Tumorwachstums im TP-Modell stattgefunden zu haben, wie es für die EMT charakteristisch ist [160]. Die konditionale Inaktivierung von NFκB im TPa-Modell bewahrte die Zellen höchstwahrscheinlich vor EMT, wie es auch in zahlreichen weiteren Untersuchungen gezeigt werden konnte, in denen die Hemmung von NFκB nachweislich zur Suppression von Vimentin und Induktion von E-Cadherin führte [23, 71, 82]. Um NFκB als direkten Auslöser der EMT im TP-Modell nachzuweisen, sollten weitere Analysen folgen, beispielsweise könnten Zielgene von NFκB wie ZEB1, ZEB2, Snail-1, Snail-2/SLUG und E12/E47, welche gleichzeitig als direkte Repressoren der E-Cadherin-Expression bekannt sind [115, 160, 161] und EMT nachweislich fördern [23] um die Verbindung zwischen NFκB und Verlust von E-Cadherin herzustellen.

In vitro kann diese EMT direkt beobachtet werden: während wir in Zellkultur epitheliales, polygonal einschichtiges, relativ langsames Zellwachstum in Inseln mit engen Zell-Zell-Kontakten im TPa-Modell sahen, wiesen Zellen des TP-Modells eher sarkomatöses Wachstum aus fibroblastoiden Zellen mit Filopodien auf, welche deutlich schneller wuchsen. Maier konnte 2010 [111] die direkte Induktion einer EMT durch NFκB *in vitro*, unabhängig vom TGF-β-Signalweg, mit Umkehr, d.h. mesenchymal-epithelialer Transition (MET) bei Blockade von NFκB, nachweisen. Dabei korrelierte auch die Suppression von E-Cadherin und Hochregulation von Vimentin mit der EMT bei Hyperaktivierung von NFκB und konnte durch Blockade von NFκB mit Hochregulation von E-Cadherin und Verlust von Vimentin rückgängig gemacht werden [111]. Des Weiteren wurde EMT von funktionalen Änderungen wie deutlicher Erhöhung der Zellmigration und *in vitro*-Invasivität, welche relevant für die Metastasierung sind, begleitet [111]. Dabei spielte die Induktion der Metalloproteinasen (MMP)-7, -9 und -13 nachweislich durch NFκB bei Erhöhung der Zellmigration eine zentrale Rolle und konnte durch Hemmung von NFκB blockiert werden [111]. MMP-7 und MMP-9 sind erst kürzlich mit der Progression des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht worden [12]. Auch die Induktion weiterer Faktoren, welche für die Invasivität von Karzinomen verantwortlich gemacht werden und in humanen Pankreaskarzinomen überexprimiert sind, z.B. uPA, eine kritische Protease im Invasions- und Metastasierungspotenzial von Karzinomen, ist als direktes Zielgen von NFκB identifiziert worden [175].

Neben einer etablierten pro-proliferativen und anti-apoptotischen Funktion von NFκB weisen zahlreiche Evidenzen eine weitere Funktion von NFκB in der Invasivität und Metastasierung

des Pankreaskarzinoms nach, welche wir auch in unserem TP-Modell beobachten konnten. Dabei induziert NFκB über seine Zielgene direkt und indirekt eine EMT mit Verlust des Markerproteins E-Cadherin und dessen Funktion in der Adhäsion von Zellen, welches zu erhöhten Migrationseigenschaften von epithelialen Zellen führt. Parallel hierzu induziert NFκB weitere Faktoren wie MMP'S, uPA, VEGF und IL-8, die erhöhte Invasion und Neoangiogenese des Pankreaskarzinoms fördern. Gemeinsam mit dem erhöhten Migrationspotenzial der Zellen werden Karzinomzellen dazu befähigt, sich vom Tumorzellverband zu lösen und über den Blutstrom systemisch in distale Organe wie Leber und Lunge zu disseminieren, um dort metastatische Absiedlungen zu bilden. Wir konnten sowohl diese erhöhte Invasivität als auch die erhöhten Metastasierungseigenschaften *in vivo* im TP-Modell beobachten, welche durch die konditionale Inaktivierung von NFκB blockiert wurde. Weiterhin wiesen wir sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die morphologischen Veränderungen der EMT im TP-Modell nach und konnten die EMT durch konditionale Inaktivierung von NFκB blockieren. Folglich belegten wir die EMT als einen zentralen, NFκB-induzierten Prozess, welcher zu rasantem Tumorprogress über Invasions- und Metastasierungseigenschaften im TP-Modell des duktaalen Pankreaskarzinoms führt.

Zunehmende weitere Evidenzen weisen auf die Assoziation von EMT und der Überaktivierung von NFκB mit Tumorprogression und schlechter Prognose hin: Beispielsweise zeigten Untersuchungen die Korrelation von EMT-Auslösern mit dem Tumorrezidiv und Patientenüberleben in Brust, kolorektalen und Ovarialkarzinomen, was darauf hinweist, dass EMT zu schlechtem Patientenoutcome führt [161]. Auch eine inverse Korrelation zwischen Patientenüberleben und E-Cadherin-Expression, und damit erhöhter Ansprechbarkeit auf EMT, konnte gezeigt werden [82]. Weitere Analysen wiesen eine Anreicherung von Genen, welche eine Rolle in der EMT spielen und in die Aktivierung von NFκB involviert sind, in high-risk Tumoren des Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals nach [24].

Schlussfolgernd reguliert NFκB im TP-Modell Angiogenese und Metastasierungspotenzial des Pankreaskarzinoms über den sequenziellen Prozess der EMT und stellt damit einen kritischen Faktor in der Tumorprogression dar, der dysregulierten Zellen einen Wachstumsvorteil bietet. Unsere und andere Analysen haben damit hohe therapeutische Signifikanz für Patienten mit Pankreaskarzinom, da die meisten dieser Patienten an Metastasen in Lunge, Leber, Peritoneum und Lymphknoten sterben. Als therapeutisches Zielmolekül ist NFκB von großer Bedeutung, da durch Inhibition in frühen Stadien das angiogenetische Potential sowie die Metastasenbildung vermindert werden könnten bzw. bei

nicht R0-resektierten Tumoren und Verbleib von Tumorzellen solche Medikamente möglicherweise ein Rezidiv vermeiden könnten.

4. Ausblick - NFκB als Target in der Therapie des PDAC?

Konstitutiv aktiviertes NFκB konnte in humanen Pankreasadenokarzinomen nachgewiesen werden [35, 106, 149, 176]. Wir konnten NFκB als essentiellen Regulator für die Förderung und Aufrechterhaltung des duktales Pankreaskarzinoms in unserem Mausmodell herausstellen: Zum einen ist NFκB initial über die Induktion seiner Zielgene essentiell für das Überleben und die Zellzyklusprogression bzw. Proliferation von transformierten Zellen, zum anderen ist NFκB in fortgeschrittenen Stadien mit der Fähigkeit von Tumoren assoziiert, in das umgebende Gewebe zu invadieren und zu metastasieren. All diese Funktionen kennzeichnen NFκB folglich als potenzielles therapeutisches Zielmolekül, welches die aktuell enttäuschenden Ergebnisse der Pankreaskarzinomtherapie verbessern könnte. Zudem zeigen Karzinome mit konstitutiv aktiviertem NFκB erhöhte Chemo- und Radioresistenz [5] oder erwerben diese nach Therapie, meist vermittelt durch die anti-apoptotische Funktion von NFκB [173], welches den Hauptgrund für Therapieversagen darstellt.

Über die Identifikation von Patienten, deren Tumorzellen konstitutiv aktiviertes NFκB exprimieren, könnte die Hemmung von NFκB im Sinne einer personalisierten Krebstherapie möglicherweise die frustrane Antitumorthherapie verbessern. Dies könnte sowohl in Kombinations- als auch adjuvanten Therapien des PDAC nützlich sein. Folglich könnten Inhibitoren des NFκB-Signalweges gemeinsam mit Standardtherapieverfahren einen hohen Benefit in der Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen und die Sensibilität chemoresistenter Tumoren verstärken oder die Chemotherapeutikadosis in chemosensiblen Tumoren erniedrigen, um ein Therapieansprechen zu erreichen bzw. die Anzahl resistenter Zellen zu reduzieren und damit ein Rezidiv zu vermeiden.

Die Beleuchtung des NFκB-Signalweges als spezifischen und vielversprechenden Ansatzpunkt zu einer verbesserten Therapie des hochaggressiven Pankreasadenokarzinoms sollte daher das Ziel weiterführender klinischer Untersuchungen sein. Eine der größten Herausforderungen ist die Entwicklung eines NFκB-Inhibitors mit der Fähigkeit auf spezifische Signalwege zu zielen und das Risiko unerwünschter Nebeneffekte zu vermeiden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Pankreaskarzinom stellt eine hochmaligne Tumorerkrankung mit den niedrigsten Überlebensraten aller Krebserkrankungen dar. Bedingt durch späte klinische Manifestation und Diagnose, frühe Metastasierung und mangelnde Therapieoptionen liegen die Überlebensraten bei nur ca. 7%. Die Hoffnung liegt daher in der dringenden Entwicklung neuer und innovativer Therapieansätze, v.a. im Bereich der „targeted therapy“.

Der Transkriptionsfaktor NFκB, dessen Involvierung in fundamentale biologische Prozesse wie Immunregulation, Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Metastasierung belegt ist, wurde konstitutiv aktiviert auch in zahlreichen humanen Malignomen nachgewiesen. Konstitutiv aktiviert, führt NFκB zur Dysregulation dieser Prozesse und erhöht damit das Risiko einer Entartung von Zellen. Auch in humanen Pankreaskarzinomzellen und -zelllinien konnte eine abnorme Aktivierung dokumentiert werden. Jedoch sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen durch Alterationen des IKK/ IκB/ NFκB-Signalweges nur unzureichend aufgeklärt. Daher gilt es, den Fokus der Forschung weiterhin auf diesen Bereich zu richten.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Rolle von NFκB, speziell dem häufigsten NFκB-Heterodimer aus den Untereinheiten p50 und RelA/p65, in der Onkogenese des Pankreaskarzinoms anhand eines murinen Modells zu analysieren.

Hierzu generierten wir das *Ela-TGFα-hGH Trp53^{Apanc} RelA^{Apanc}*-Mausmodell (TPa), welches die genetischen und pathomorphologischen Eigenschaften des humanen Pankreaskarzinoms am besten rekapituliert. Die Exone 7 bis 10 des *Rela*-Gens kodieren für die RHD und sind für die Translokation und Dimerisierung von NFκB zuständig. Durch eine konditionale pankreas-spezifische Deletion dieser Exone erzielten wir den Verlust der nukleären Translokation, die Unfähigkeit der Transkription von Zielgenen und damit die Inaktivierung des NFκB-Signalweges.

Die Inaktivierung des NFκB-Signalweges führte zu verzögertem Tumorprogress *in vivo*. Damit assoziiert war auch ein signifikant längeres Überleben von TPa-Mäusen. Schon zum frühen Zeitpunkt von vier Wochen konnte dabei eine geringere Proliferation von Pankreas(karzinom)zellen beobachtet werden. Auf die Apoptose und die Morphologie hatte NFκB in frühen Stadien der Karzinogenese keinen Einfluss. Jedoch wiesen Malignome des TPa-Modells bei Tumorprogression signifikant häufiger duktal differenzierte Karzinome auf.

Im Gegensatz hierzu zeigten TP-Mäuse größtenteils undifferenzierte Karzinome mit Verlust epithelialer Marker sowie gesteigerter Invasion und Metastasierung. Die differente Morphologie blieb auch *in vitro* erhalten: In kultivierten Pankreaskarzinomzellen unserer Modelle wies das TPa-Modell im Gegensatz zum TP-Modell mit fischschwarmartig wachsenden, teils fibroblastoiden Zellen mit Filopodien eine epitheliale Morphologie mit typischem inselartigem Wachstum auf. Folglich stellt der Transkriptionsfaktor NFκB einen essentiellen Regulator der Onkogenese im murinen *in vivo*-Modell des Pankreaskarzinoms dar.

Aufgrund seiner dem humanen Pankreaskarzinom weitgehend ähnlichen pathomorphologischen wie auch genetischen Ähnlichkeit, scheint es wahrscheinlich, dass konstitutiv aktiviertes NFκB auch in humanen Pankreaskarzinomen maßgeblich die Onkogenese sowie Tumorprogression und Metastasierung fördert.

Damit stellt NFκB einen vielversprechenden Ansatzpunkt zu einer verbesserten Therapie des hochaggressiven Pankreaskarzinoms dar und sollte daher das Ziel weiterführender klinischer Forschung sein.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adler, G., T. Seufferlein, S.C. Bischoff, H.J. Brambs, S. Feuerbach, G. Grabenbauer, S. Hahn, V. Heinemann, W. Hohenberger, J.M. Langrehr, M.P. Lutz, O. Micke, H. Neuhaus, P. Neuhaus, H. Oettle, P.M. Schlag, R. Schmid, W. Schmiegel, K. Schlottmann, J. Werner, B. Wiedenmann, and I. Kopp, *S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2007; Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz (13.–14.10.2006)*. *Z Gastroenterol.* 45(6) (2007): p. 487-523.
2. Aguirre, A.J., N. Bardeesy, M. Sinha, L. Lopez, D.A. Tuveson, J. Horner, M.S. Redston, and R.A. DePinho, *Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Genes Dev.* 17(24) (2003): p. 3112-26.
3. Al-Aynati, M.M., N. Radulovich, J. Ho, and M.S. Tsao, *Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis*. *Clin Cancer Res.* 10(19) (2004): p. 6598-605.
4. Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho, *Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes*. *Cell.* 53(4) (1988): p. 549-54.
5. Arlt, A., J. Vorndamm, M. Breitenbroich, U.R. Folsch, H. Kalthoff, W.E. Schmidt, and H. Schafer, *Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin*. *Oncogene.* 20(7) (2001): p. 859-68.
6. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet.* 357(9255) (2001): p. 539-45.
7. Bardeesy, N., K.H. Cheng, J.H. Berger, G.C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A.F. Hezel, J. Horner, G.Y. Lauwers, D. Hanahan, and R.A. DePinho, *Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer*. *Genes Dev.* 20(22) (2006): p. 3130-46.
8. Baxter, N.N., B.A. Whitson, and T.M. Tuttle, *Trends in the treatment and outcome of pancreatic cancer in the United States*. *Ann Surg Oncol.* 14(4) (2007): p. 1320-6.
9. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. *Science.* 274(5288) (1996): p. 782-4.
10. Beg, A.A., W.C. Sha, R.T. Bronson, S. Ghosh, and D. Baltimore, *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. *Nature.* 376(6536) (1995): p. 167-70.

11. Biswas, D.K., Q. Shi, S. Baily, I. Strickland, S. Ghosh, A.B. Pardee, and J.D. Iglehart, *NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(27) (2004): p. 10137-42.
12. Bloomston, M., E.E. Zervos, and A.S. Rosemurgy, 2nd, *Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials*. Ann Surg Oncol. 9(7) (2002): p. 668-74.
13. Brachmann, R., P.B. Lindquist, M. Nagashima, W. Kohr, T. Lipari, M. Napier, and R. Derynck, *Transmembrane TGF-alpha precursors activate EGF/TGF-alpha receptors*. Cell. 56(4) (1989): p. 691-700.
14. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72 (1976): p. 248-54.
15. Brantley, D.M., C.L. Chen, R.S. Muraoka, P.B. Bushdid, J.L. Bradberry, F. Kittrell, D. Medina, L.M. Matrisian, L.D. Kerr, and F.E. Yull, *Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium*. Mol Biol Cell. 12(5) (2001): p. 1445-55.
16. Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, and U. Siebenlist, *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. Science. 267(5203) (1995): p. 1485-8.
17. Caldas, C., S.A. Hahn, L.T. da Costa, M.S. Redston, M. Schutte, A.B. Seymour, C.L. Weinstein, R.H. Hruban, C.J. Yeo, and S.E. Kern, *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. Nat Genet. 8(1) (1994): p. 27-32.
18. Campbell, K.J. and N.D. Perkins, *Reprogramming RelA*. Cell Cycle. 3(7) (2004): p. 869-72.
19. Cao, H.J., Y. Fang, X. Zhang, W.J. Chen, W.P. Zhou, H. Wang, L.B. Wang, and J.M. Wu, *Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue*. World J Gastroenterol. 11(6) (2005): p. 903-7.
20. Cao, Y., G. Bonizzi, T.N. Seagroves, F.R. Greten, R. Johnson, E.V. Schmidt, and M. Karin, *IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development*. Cell. 107(6) (2001): p. 763-75.
21. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell. 84(6) (1996): p. 853-62.
22. Chu, Z.L., T.A. McKinsey, L. Liu, J.J. Gentry, M.H. Malim, and D.W. Ballard, *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(19) (1997): p. 10057-62.

23. Chua, H.L., P. Bhat-Nakshatri, S.E. Clare, A. Morimiya, S. Badve, and H. Nakshatri, *NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2*. *Oncogene*. 26(5) (2007): p. 711-24.
24. Chung, C.H., J.S. Parker, K. Ely, J. Carter, Y. Yi, B.A. Murphy, K.K. Ang, A.K. El-Naggar, A.M. Zanation, A.J. Cmelak, S. Levy, R.J. Slebos, and W.G. Yarbrough, *Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*. 66(16) (2006): p. 8210-8.
25. Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J.L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J.B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, and M. Ducreux, *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. *N Engl J Med*. 364(19) (2011): p. 1817-25.
26. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*. 420(6917) (2002): p. 860-7.
27. Cunningham, D., I. Chau, D.D. Stocken, J.W. Valle, D. Smith, W. Steward, P.G. Harper, J. Dunn, C. Tudur-Smith, J. West, S. Falk, A. Crellin, F. Adab, J. Thompson, P. Leonard, J. Ostrowski, M. Eatock, W. Scheithauer, R. Herrmann, and J.P. Neoptolemos, *Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer*. *J Clin Oncol*. 27(33) (2009): p. 5513-8.
28. Day, J.D., J.A. Digiuseppe, C. Yeo, M. Lai-Goldman, S.M. Anderson, S.N. Goodman, S.E. Kern, and R.H. Hruban, *Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms*. *Hum Pathol*. 27(2) (1996): p. 119-24.
29. Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, and J.C. Reed, *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. *Embo J*. 17(8) (1998): p. 2215-23.
30. DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin, *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. *Nature*. 388(6642) (1997): p. 548-54.
31. Duffey, D.C., Z. Chen, G. Dong, F.G. Ondrey, J.S. Wolf, K. Brown, U. Siebenlist, and C. Van Waes, *Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo*. *Cancer Res*. 59(14) (1999): p. 3468-74.
32. Esposito, I., J. Kleeff, I. Abiatari, X. Shi, N. Giese, F. Bergmann, W. Roth, H. Friess, and P. Schirmacher, *Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an*

- early event in the progression of pancreatic cancer.* J Clin Pathol. 60(8) (2007): p. 885-95.
33. Finco, T.S. and A.S. Baldwin, *Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis.* Immunity. 3(3) (1995): p. 263-72.
34. Fujioka, S., G.M. Sclabas, C. Schmidt, W.A. Frederick, Q.G. Dong, J.L. Abbruzzese, D.B. Evans, C. Baker, and P.J. Chiao, *Function of Nuclear Factor kappaB in Pancreatic Cancer Metastasis.* Clin Cancer Res. 9 (2003): p. 346-354.
35. Fujioka, S., G.M. Sclabas, C. Schmidt, J. Niu, W.A. Frederick, Q.G. Dong, J.L. Abbruzzese, D.B. Evans, C. Baker, and P.J. Chiao, *Inhibition of constitutive NF-kappa B activity by I kappa B alpha M suppresses tumorigenesis.* Oncogene. 22(9) (2003): p. 1365-70.
36. Gansauge, S., F. Gansauge, M. Ramadani, H. Stobbe, B. Rau, N. Harada, and H.G. Beger, *Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis.* Cancer Res. 57(9) (1997): p. 1634-7.
37. Geisler, F., H. Algul, S. Paxian, and R.M. Schmid, *Genetic inactivation of RelA/p65 sensitizes adult mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis in vivo and in vitro.* Gastroenterology. 132(7) (2007): p. 2489-503.
38. Gerritsen, M.E., A.J. Williams, A.S. Neish, S. Moore, Y. Shi, and T. Collins, *CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65.* Proc Natl Acad Sci U S A. 94(7) (1997): p. 2927-32.
39. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.* Cell. 109 Suppl (2002): p. S81-96.
40. Gilmore, T.D., *Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel.* Oncogene. 18(49) (1999): p. 6925-37.
41. Goldstein, A.M., M.C. Fraser, J.P. Struewing, C.J. Hussussian, K. Ranade, D.P. Zametkin, L.S. Fontaine, S.M. Organic, N.C. Dracopoli, W.H. Clark, Jr., and et al., *Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations.* N Engl J Med. 333(15) (1995): p. 970-4.
42. Greten, F.R., M. Wagner, C.K. Weber, U. Zechner, G. Adler, and R.M. Schmid, *TGF alpha transgenic mice. A model of pancreatic cancer development.* Pancreatology. 1(4) (2001): p. 363-8.
43. Greten, F.R., C.K. Weber, T.F. Greten, G. Schneider, M. Wagner, G. Adler, and R.M. Schmid, *Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis.* Gastroenterology. 123(6) (2002): p. 2052-63.
44. Grippo, P.J., P.S. Nowlin, M.J. Demeure, D.S. Longnecker, and E.P. Sandgren, *Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice.* Cancer Res. 63(9) (2003): p. 2016-9.

45. Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and K. and Rajewsky, *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell typespecific gene targeting*. Science. 265 (1994): p. 103–106.
46. Guttridge, D.C., C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell, and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*. Mol Cell Biol. 19(8) (1999): p. 5785-99.
47. Habib, A.A., S. Chatterjee, S.K. Park, R.R. Ratan, S. Lefebvre, and T. Vartanian, *The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome*. J Biol Chem. 276(12) (2001): p. 8865-74.
48. Hamacher, R., R.M. Schmid, D. Saur, and G. Schneider, *Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mol Cancer. 7 (2008): p. 64.
49. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell. 100(1) (2000): p. 57-70.
50. Hawkins, P., *Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations*. Lab Anim. 36(4) (2002): p. 378-95.
51. Heinemann, V., R. Labianca, A. Hinke, and C. Louvet, *Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study*. Ann Oncol. 18(10) (2007): p. 1652-9.
52. Herrmann, R., G. Bodoky, T. Ruhstaller, B. Glimelius, E. Bajetta, J. Schuller, P. Saletti, J. Bauer, A. Figuer, B. Pestalozzi, C.H. Kohne, W. Mingrone, S.M. Stemmer, K. Tamas, G.V. Kornek, D. Koeberle, S. Cina, J. Bernhard, D. Dietrich, and W. Scheithauer, *Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group*. J Clin Oncol. 25(16) (2007): p. 2212-7.
53. Hezel, A.F., A.C. Kimmelman, B.Z. Stanger, N. Bardeesy, and R.A. Depinho, *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev. 20(10) (2006): p. 1218-49.
54. Hidalgo, M., *Pancreatic cancer*. N Engl J Med. 362(17) (2010): p. 1605-17.
55. Higgins, K.A., J.R. Perez, T.A. Coleman, K. Dorshkind, W.A. McComas, U.M. Sarmiento, C.A. Rosen, and R. Narayanan, *Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(21) (1993): p. 9901-5.

56. Hingorani, S.R., E.F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M.A. Jacobetz, S. Ross, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, B.A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L.A. Liotta, H.C. Crawford, M.E. Putt, T. Jacks, C.V. Wright, R.H. Hruban, A.M. Lowy, and D.A. Tuveson, *Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse*. *Cancer Cell*. 4(6) (2003): p. 437-50.
57. Hingorani, S.R., L. Wang, A.S. Multani, C. Combs, T.B. Deramaudt, R.H. Hruban, A.K. Rustgi, S. Chang, and D.A. Tuveson, *Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice*. *Cancer Cell*. 7(5) (2005): p. 469-83.
58. Hinz, M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, and M. Strauss, *NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition*. *Mol Cell Biol*. 19(4) (1999): p. 2690-8.
59. Hoess, R.H., Wierzbicki, A., and Abremski, K., *The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination*. *Nucleic Acids Res*. 14 (1986): p. 2287–2300.
60. Holcomb, B., M. Yip-Schneider, and C.M. Schmidt, *The role of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer and the clinical applications of targeted therapy*. *Pancreas*. 36(3) (2008): p. 225-35.
61. Hong, S.Y., W.H. Yoon, J.H. Park, S.G. Kang, J.H. Ahn, and T.H. Lee, *Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene*. *J Biol Chem*. 275(24) (2000): p. 18022-8.
62. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, and e.a. (eds), *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD*. (2010)
63. Hruban, R.H., N.V. Adsay, J. Albores-Saavedra, M.R. Anver, A.V. Biankin, G.P. Boivin, E.E. Furth, T. Furukawa, A. Klein, D.S. Klimstra, G. Kloppel, G.Y. Lauwers, D.S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G.J. Offerhaus, L. Perez-Gallego, M. Redston, and D.A. Tuveson, *Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations*. *Cancer Res*. 66(1) (2006): p. 95-106.
64. Hruban, R.H., M. Goggins, J. Parsons, and S.E. Kern, *Progression model for pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*. 6(8) (2000): p. 2969-72.
65. Hruban, R.H., A. Maitra, and M. Goggins, *Update on pancreatic intraepithelial neoplasia*. *Int J Clin Exp Pathol*. 1(4) (2008): p. 306-16.
66. Hruban, R.H., A. Maitra, S.E. Kern, and M. Goggins, *Precursors to pancreatic cancer*. *Gastroenterol Clin North Am*. 36(4) (2007): p. 831-49, vi.
67. Hruban, R.H., R.E. Wilentz, and S.E. Kern, *Genetic progression in the pancreatic ducts*. *Am J Pathol*. 156(6) (2000): p. 1821-5.

68. Huang, S., A. DeGuzman, C.D. Bucana, and I.J. Fidler, *Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice*. Clin Cancer Res. 6(6) (2000): p. 2573-81.
69. Huang, S., C.A. Pettaway, H. Uehara, C.D. Bucana, and I.J. Fidler, *Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis*. Oncogene. 20(31) (2001): p. 4188-97.
70. Huang, S., J.B. Robinson, A. Deguzman, C.D. Bucana, and I.J. Fidler, *Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8*. Cancer Res. 60(19) (2000): p. 5334-9.
71. Huber, M.A., N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, and T. Wirth, *NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. J Clin Invest. 114(4) (2004): p. 569-81.
72. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol. 17(5) (2005): p. 548-58.
73. Huxley, R., A. Ansary-Moghaddam, A. Berrington de Gonzalez, F. Barzi, and M. Woodward, *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. Br J Cancer. 92(11) (2005): p. 2076-83.
74. Iodice, S., S. Gandini, P. Maisonneuve, and A.B. Lowenfels, *Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis*. Langenbecks Arch Surg. 393(4) (2008): p. 535-45.
75. Itakura, J., T. Ishiwata, H. Friess, H. Fujii, Y. Matsumoto, M.W. Buchler, and M. Korc, *Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression*. Clin Cancer Res. 3(8) (1997): p. 1309-16.
76. Izzo, J.G., U. Malhotra, T.T. Wu, R. Luthra, A.M. Correa, S.G. Swisher, W. Hofstetter, K.S. Chao, M.C. Hung, and J.A. Ajani, *Clinical biology of esophageal adenocarcinoma after surgery is influenced by nuclear factor-kappaB expression*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 16(6) (2007): p. 1200-5.
77. Jacks, T., L. Remington, B.O. Williams, E.M. Schmitt, S. Halachmi, R.T. Bronson, and R.A. Weinberg, *Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice*. Curr Biol. 4(1) (1994): p. 1-7.
78. Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward, *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin. 60(5) (2010): p. 277-300.
79. Jonkers, J., R. Meuwissen, H. van der Gulden, H. Peterse, M. van der Valk, and A. Berns, *Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer*. Nat Genet. 29(4) (2001): p. 418-25.

80. Joyce, D., C. Albanese, J. Steer, M. Fu, B. Bouzahzah, and R.G. Pestell, *NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection*. Cytokine Growth Factor Rev. 12(1) (2001): p. 73-90.
81. Joyce, D., B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J.U. Klein, R.J. Lee, J.E. Segall, J.K. Westwick, C.J. Der, and R.G. Pestell, *Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway*. J Biol Chem. 274(36) (1999): p. 25245-9.
82. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest. 119(6) (2009): p. 1420-8.
83. Kaltschmidt, B., C. Kaltschmidt, S.P. Hehner, W. Droge, and M.L. Schmitz, *Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators*. Oncogene. 18(21) (1999): p. 3213-25.
84. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature. 441 (2006): p. 431–436.
85. Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten, and Z.W. Li, *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. Nat Rev Cancer. 2(4) (2002): p. 301-10.
86. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol. 5(10) (2005): p. 749-59.
87. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol. 3(3) (2002): p. 221-7.
88. Karin, M., Yamamoto, Y., and Wang, Q.M. Nat. Rev. 3:17–26., *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development*. Drug Discov.. 3 (2004): p. 17–26.
89. Kawaguchi, Y., B. Cooper, M. Gannon, M. Ray, R.J. MacDonald, and C.V. Wright, *The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors*. Nat Genet. 32(1) (2002): p. 128-34.
90. Kim, D.W., M.A. Sovak, G. Zanieski, G. Nonet, R. Romieu-Mourez, A.W. Lau, L.J. Hafer, P. Yaswen, M. Stampfer, A.E. Rogers, J. Russo, and G.E. Sonenshein, *Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells*. Carcinogenesis. 21(5) (2000): p. 871-9.
91. Kim, J.K. and J.A. Diehl, *Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer*. J Cell Physiol. 220(2) (2009): p. 292-6.
92. Knudsen, K.E., J.A. Diehl, C.A. Haiman, and E.S. Knudsen, *Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk*. Oncogene. 25(11) (2006): p. 1620-8.
93. Korc, M., B. Chandrasekar, Y. Yamanaka, H. Friess, M. Buchier, and H.G. Beger, *Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer*

- is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha.* J Clin Invest. 90(4) (1992): p. 1352-60.
94. Kornmann, M., T. Ishiwata, J. Itakura, P. Tangvoranuntakul, H.G. Beger, and M. Korc, *Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival.* Oncology. 55(4) (1998): p. 363-9.
95. Krapp, A., M. Knofler, S. Frutiger, G.J. Hughes, O. Hagenbuchle, and P.K. Wellauer, *The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein.* Embo J. 15(16) (1996): p. 4317-29.
96. Krapp, A., M. Knofler, B. Ledermann, K. Burki, C. Berney, N. Zoerkler, O. Hagenbuchle, and P.K. Wellauer, *The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas.* Genes Dev. 12(23) (1998): p. 3752-63.
97. Kunsch, C., S.M. Ruben, and C.A. Rosen, *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation.* Mol Cell Biol. 12(10) (1992): p. 4412-21.
98. Kuper, H., H.O. Adami, and D. Trichopoulos, *Infections as a major preventable cause of human cancer.* J Intern Med. 248(3) (2000): p. 171-83.
99. Larsson, S.C., J. Permert, N. Hakansson, I. Naslund, L. Bergkvist, and A. Wolk, *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) (2005): p. 1310-5.
100. Le, X., Q. Shi, B. Wang, Q. Xiong, C. Qian, Z. Peng, X.C. Li, H. Tang, J.L. Abbruzzese, and K. Xie, *Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma.* J Interferon Cytokine Res. 20(11) (2000): p. 935-46.
101. Li, D., K. Xie, R. Wolff, and J.L. Abbruzzese, *Pancreatic cancer.* Lancet. 363(9414) (2004): p. 1049-57.
102. Li, Q., D. Van Antwerp, F. Mercurio, K.F. Lee, and I.M. Verma, *Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene.* Science. 284(5412) (1999): p. 321-5.
103. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin.* Trends Immunol. 26(6) (2005): p. 318-25.
104. Lillemoe, K.D., C.J. Yeo, and J.L. Cameron, *Pancreatic cancer: state-of-the-art care.* CA Cancer J Clin. 50(4) (2000): p. 241-68.
105. Lind, D.S., S.N. Hochwald, J. Malaty, S. Rekkas, P. Hebig, G. Mishra, L.L. Moldawer, E.M. Copeland, 3rd, and S. Mackay, *Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer.* Surgery. 130(2) (2001): p. 363-9.

106. Liptay, S., C.K. Weber, L. Ludwig, M. Wagner, G. Adler, and R.M. Schmid, *Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer*. *Int J Cancer*. 105(6) (2003): p. 735-46.
107. Liu, Z.G., H. Hsu, D.V. Goeddel, and M. Karin, *Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death*. *Cell*. 87(3) (1996): p. 565-76.
108. Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A.B. Lowenfels, and J. Luttges, *Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis*. *Neoplasia*. 7(1) (2005): p. 17-23.
109. Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R.W. Ammann, P.G. Lankisch, J.R. Andersen, E.P. DiMagna, A. Andren-Sandberg, and L. Domellof, *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group*. *N Engl J Med*. 328(20) (1993): p. 1433-7.
110. Lowenfels, A.B., P. Maisonneuve, E.P. DiMagna, Y. Elitsur, L.K. Gates, Jr., J. Perrault, and D.C. Whitcomb, *Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group*. *J Natl Cancer Inst*. 89(6) (1997): p. 442-6.
111. Maier, H.J., U. Schmidt-Strassburger, M.A. Huber, E.M. Wiedemann, H. Beug, and T. Wirth, *NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells*. *Cancer Lett*. 295(2) (2010): p. 214-28.
112. Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao, *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. *Science*. 278(5339) (1997): p. 860-6.
113. Micheau, O., S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, and J. Tschopp, *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. *Mol Cell Biol*. 21(16) (2001): p. 5299-305.
114. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. *Cell*. 114(2) (2003): p. 181-90.
115. Min, C., S.F. Eddy, D.H. Sherr, and G.E. Sonenshein, *NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer*. *J Cell Biochem*. 104(3) (2008): p. 733-44.
116. Moore, M.J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J.R. Hecht, S. Gallinger, H.J. Au, P. Murawa, D. Walde, R.A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, and W. Parulekar, *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) (2007): p. 1960-6.

117. Moskaluk, C.A., R.H. Hruban, and S.E. Kern, *p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma*. *Cancer Res.* 57(11) (1997): p. 2140-3.
118. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. *Genesis.* 26(2) (2000): p. 99-109.
119. Nair, A., M. Venkatraman, T.T. Maliekal, B. Nair, and D. Karunagaran, *NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix*. *Oncogene.* 22(1) (2003): p. 50-8.
120. Nakhai, H., S. Sel, J. Favor, L. Mendoza-Torres, F. Paulsen, G.I. Duncker, and R.M. Schmid, *Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina*. *Development.* 134(6) (2007): p. 1151-60.
121. Nakshatri, H., P. Bhat-Nakshatri, D.A. Martin, R.J. Goulet, Jr., and G.W. Sledge, Jr., *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. *Mol Cell Biol.* 17(7) (1997): p. 3629-39.
122. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. *Curr Opin Genet Dev.* 18(1) (2008): p. 19-26.
123. Neoptolemos, J.P., D.D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J.A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D.J. Kerr, and M.W. Buchler, *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. *N Engl J Med.* 350(12) (2004): p. 1200-10.
124. Ornitz, D.M., R.D. Palmiter, R.E. Hammer, R.L. Brinster, G.H. Swift, and R.J. MacDonald, *Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice*. *Nature.* 313(6003) (1985): p. 600-2.
125. Ozes, O.N., L.D. Mayo, J.A. Gustin, S.R. Pfeffer, L.M. Pfeffer, and D.B. Donner, *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. *Nature.* 401(6748) (1999): p. 82-5.
126. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene.* 18(49) (1999): p. 6853-66.
127. Pallares, J., J.L. Martinez-Guitarte, X. Dolcet, D. Llobet, M. Rue, J. Palacios, J. Prat, and X. Matias-Guiu, *Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma*. *J Pathol.* 204(5) (2004): p. 569-77.
128. Perkins, N.D., *NF-kappaB: tumor promoter or suppressor?* *Trends Cell Biol.* 14(2) (2004): p. 64-9.
129. Perkins, N.D., L.K. Felzien, J.C. Betts, K. Leung, D.H. Beach, and G.J. Nabel, *Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator*. *Science.* 275(5299) (1997): p. 523-7.

130. Perkins, N.D. and T.D. Gilmore, *Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB*. Cell Death Differ. 13(5) (2006): p. 759-72.
131. Petersen, G.M., M. de Andrade, M. Goggins, R.H. Hruban, M. Bondy, J.F. Korczak, S. Gallinger, H.T. Lynch, S. Syngal, K.G. Rabe, D. Seminara, and A.P. Klein, *Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15(4) (2006): p. 704-10.
132. Pianetti, S., M. Arsura, R. Romieu-Mourez, R.J. Coffey, and G.E. Sonenshein, *Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN*. Oncogene. 20(11) (2001): p. 1287-99.
133. Pikarsky, E., R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah, *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature. 431(7007) (2004): p. 461-6.
134. Radulovich, N., N.A. Pham, D. Strumpf, L. Leung, W. Xie, I. Jurisica, and M.S. Tsao, *Differential roles of cyclin D1 and D3 in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mol Cancer. 9 (2010): p. 24.
135. Renehan, A.G., M. Tyson, M. Egger, R.F. Heller, and M. Zwahlen, *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet. 371(9612) (2008): p. 569-78.
136. [RKI], R.K.-I., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenz in Deutschland zwischen 1990 und 2010*. RKI, Berlin. (2010): p. 45-52.
137. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature. 401(6748) (1999): p. 86-90.
138. Rothwarf, D.M. and M. Karin, *The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus*. Sci STKE. 1999(5) (1999): p. RE1.
139. Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, S.A. Hahn, S. Panzer, M. Zahurak, S.N. Goodman, T.A. Sohn, R.H. Hruban, C.J. Yeo, and S.E. Kern, *Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma*. Cancer Res. 57(9) (1997): p. 1731-4.
140. Saif, M.W., L. Karapanagiotou, and K. Syrigos, *Genetic alterations in pancreatic cancer*. World J Gastroenterol. 13(33) (2007): p. 4423-30.
141. Sandgren, E.P., N.C. Luetke, R.D. Palmiter, R.L. Brinster, and D.C. Lee, *Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast*. Cell. 61(6) (1990): p. 1121-1135.
142. Sasaki, N., T. Morisaki, K. Hashizume, T. Yao, M. Tsuneyoshi, H. Noshiro, K. Nakamura, T. Yamanaka, A. Uchiyama, M. Tanaka, and M. Katano, *Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue*. Clin Cancer Res. 7(12) (2001): p. 4136-42.

143. Satoh, K., K. Kaneko, M. Hirota, A. Masamune, A. Satoh, and T. Shimosegawa, *Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors*. *Cancer*. 92(2) (2001): p. 271-8.
144. Sauer, B., *Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system*. *Methods*. 14(4) (1998): p. 381-92.
145. Scartozzi, M., I. Bearzi, C. Pierantoni, A. Mandolesi, F. Loupakis, A. Zaniboni, V. Catalano, A. Quadri, F. Zorzi, R. Berardi, T. Biscotti, R. Labianca, A. Falcone, and S. Cascinu, *Nuclear factor- κ B tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy*. *J Clin Oncol*. 25(25) (2007): p. 3930-5.
146. Schmitz, M.L. and P.A. Baeuerle, *The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- κ B*. *Embo J*. 10(12) (1991): p. 3805-17.
147. Schneider, G. and R.M. Schmid, *Genetic alterations in pancreatic carcinoma*. *Mol Cancer*. 2 (2003): p. 15.
148. Schneider, G., J.T. Siveke, F. Eckel, and R.M. Schmid, *Pancreatic cancer: basic and clinical aspects*. *Gastroenterology*. 128(6) (2005): p. 1606-25.
149. Sclabas, G.M., S. Fujioka, C. Schmidt, D.B. Evans, and P.J. Chiao, *NF- κ B in pancreatic cancer*. *Int J Gastrointest Cancer*. 33(1) (2003): p. 15-26.
150. Seufferlein, T., J. Van Lint, S. Liptay, G. Adler, and R.M. Schmid, *Transforming growth factor alpha activates Ha-Ras in human pancreatic cancer cells with Ki-ras mutations*. *Gastroenterology*. 116(6) (1999): p. 1441-52.
151. Shaib, Y., J. Davila, C. Naumann, and H. El-Serag, *The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study*. *Am J Gastroenterol*. 102(7) (2007): p. 1377-82.
152. Sherr, C.J. and J.D. Weber, *The ARF/p53 pathway*. *Curr Opin Genet Dev*. 10(1) (2000): p. 94-9.
153. Shukla, S., G.T. MacLennan, P. Fu, J. Patel, S.R. Marengo, M.I. Resnick, and S. Gupta, *Nuclear factor- κ B/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression*. *Neoplasia*. 6(4) (2004): p. 390-400.
154. Smith, J.J., R. Derynck, and M. Korc, *Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(21) (1987): p. 7567-70.
155. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. *Nat Genet*. 21(1) (1999): p. 70-1.

156. Sovak, M.A., R.E. Bellas, D.W. Kim, G.J. Zanieski, A.E. Rogers, A.M. M. Traish, and G.E. Sonenshein, *Aberrant Nuclear Factor- κ B/Rel Expression and the Pathogenesis of Breast Cancer*. *J Clin Invest*. 100(12) (1997): p. 2952-2960.
157. Stocken, D.D., M.W. Buchler, C. Dervenis, C. Bassi, H. Jeekel, J.H. Klinkenbijl, K.E. Bakkevold, T. Takada, H. Amano, and J.P. Neoptolemos, *Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer*. *Br J Cancer*. 92(8) (2005): p. 1372-81.
158. Sweeney, C., L. Li, R. Shanmugam, P. Bhat-Nakshatri, V. Jayaprakasan, L.A. Baldrige, T. Gardner, M. Smith, H. Nakshatri, and L. Cheng, *Nuclear factor- κ B is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate*. *Clin Cancer Res*. 10(16) (2004): p. 5501-7.
159. Tai, D.I., S.L. Tsai, Y.H. Chang, S.N. Huang, T.C. Chen, K.S. Chang, and Y.F. Liaw, *Constitutive activation of nuclear factor κ B in hepatocellular carcinoma*. *Cancer*. 89(11) (2000): p. 2274-81.
160. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. *Curr Opin Cell Biol*. 15(6) (2003): p. 740-6.
161. Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto, *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*. 139(5) (2009): p. 871-90.
162. Traenckner, E.B., H.L. Pahl, T. Henkel, K.N. Schmidt, S. Wilk, and P.A. Baeuerle, *Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli*. *Embo J*. 14(12) (1995): p. 2876-83.
163. Triano, L.R., B.W. Chang, and M.W. Saif, *New developments in the treatment of locally advanced pancreatic cancer. Highlights from the 45th ASCO annual meeting. Orlando, FL, USA. May 29-June 2, 2009*. *Jop*. 10(4) (2009): p. 366-72.
164. Tuveson, D.A., L. Zhu, A. Gopinathan, N.A. Willis, L. Kachatrian, R. Grochow, C.L. Pin, N.Y. Mitin, E.J. Taparowsky, P.A. Gimotty, R.H. Hruban, T. Jacks, and S.F. Konieczny, *Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*. 66(1) (2006): p. 242-7.
165. Urban, M.B., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *NF- κ B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit*. *Embo J*. 10(7) (1991): p. 1817-25.
166. Van Antwerp, D.J., S.J. Martin, T. Kafri, D.R. Green, and I.M. Verma, *Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B*. *Science*. 274(5288) (1996): p. 787-9.
167. van Hogerlinden, M., G. Auer, and R. Toftgard, *Inhibition of Rel/Nuclear Factor- κ B signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development*. *Oncogene*. 21(32) (2002): p. 4969-77.

168. Verma, I.M., J.K. Stevenson, E.M. Schwarz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto, *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev. 9(22) (1995): p. 2723-35.
169. Verslype, C., E. Van Cutsem, M. Dicato, S. Cascinu, D. Cunningham, E. Diaz-Rubio, B. Glimelius, D. Haller, K. Haustermans, V. Heinemann, P. Hoff, P.G. Johnston, D. Kerr, R. Labianca, C. Louvet, B. Minsky, M. Moore, B. Nordlinger, S. Pedrazzoli, A. Roth, M. Rothenberg, P. Rougier, H.J. Schmoll, J. Tabernero, M. Tempero, C. van de Velde, J.L. Van Laethem, and J. Zalcberg, *The management of pancreatic cancer. Current expert opinion and recommendations derived from the 8th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2006*. Ann Oncol. 18 Suppl 7 (2007): p. vii1-vii10.
170. Vogelstein, B., *Cancer. A deadly inheritance*. Nature. 348(6303) (1990): p. 681-2.
171. Wagner, M., F.R. Greten, C.K. Weber, S. Koschnick, T. Mattfeldt, W. Deppert, H. Kern, G. Adler, and R.M. Schmid, *A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease*. Genes Dev. 15(3) (2001): p. 286-93.
172. Wagner, M., H. Luhrs, G. Kloppel, G. Adler, and R.M. Schmid, *Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice*. Gastroenterology. 115(5) (1998): p. 1254-62.
173. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science. 274(5288) (1996): p. 784-7.
174. Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science. 281(5383) (1998): p. 1680-3.
175. Wang, W., J.L. Abbruzzese, D.B. Evans, and P.J. Chiao, *Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA*. Oncogene. 18(32) (1999): p. 4554-63.
176. Wang, W., J.L. Abbruzzese, D.B. Evans, L. Larry, K.R. Cleary, and P.J. Chiao, *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res. 5(1) (1999): p. 119-27.
177. Webster, G.A. and N.D. Perkins, *Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53*. Mol Cell Biol. 19(5) (1999): p. 3485-95.
178. Weichert, W., M. Boehm, V. Gekeler, M. Bahra, J. Langrehr, P. Neuhaus, C. Denkert, G. Imre, C. Weller, H.P. Hofmann, S. Niesporek, J. Jacob, M. Dietel, C. Scheiderei, and G. Kristiansen, *High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor-kappaB-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis*. Br J Cancer. 97(4) (2007): p. 523-30.

179. Wilentz, R.E., J. Geradts, R. Maynard, G.J. Offerhaus, M. Kang, M. Goggins, C.J. Yeo, S.E. Kern, and R.H. Hruban, *Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression*. *Cancer Res.* 58(20) (1998): p. 4740-4.
180. Wilentz, R.E., G.H. Su, J.L. Dai, A.B. Sparks, P. Argani, T.A. Sohn, C.J. Yeo, S.E. Kern, and R.H. Hruban, *Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation*. *Am J Pathol.* 156(1) (2000): p. 37-43.
181. Xiong, H.Q., J.L. Abbruzzese, E. Lin, L. Wang, L. Zheng, and K. Xie, *NF-kappaB activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells*. *Int J Cancer.* 108(2) (2004): p. 181-8.
182. Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor, *Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer*. *J Clin Invest.* 107(2) (2001): p. 135-42.
183. Yamanaka, N., N. Sasaki, A. Tasaki, H. Nakashima, M. Kubo, T. Morisaki, H. Noshiro, T. Yao, M. Tsuneyoshi, M. Tanaka, and M. Katano, *Nuclear factor-kappaB p65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma*. *Anticancer Res.* 24(2C) (2004): p. 1071-5.
184. Yamano, M., H. Fujii, T. Takagaki, N. Kadowaki, H. Watanabe, and T. Shirai, *Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma*. *Am J Pathol.* 156(6) (2000): p. 2123-33.
185. Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A.M. Manning, J.S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah, *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase*. *Nature.* 396(6711) (1998): p. 590-4.
186. Zandi, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, and M. Karin, *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. *Cell.* 91(2) (1997): p. 243-52.
187. Zhong, H., R.E. Voll, and S. Ghosh, *Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300*. *Mol Cell.* 1(5) (1998): p. 661-71.
188. Zong, W.X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas, *The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis*. *Genes Dev.* 13(4) (1999): p. 382-7.
189. Zong, W.X., M. Farrell, J. Bash, and C. Gelinas, *v-Rel prevents apoptosis in transformed lymphoid cells and blocks TNFalpha-induced cell death*. *Oncogene.* 15(8) (1997): p. 971-80.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<u>Abb. 1:</u>	Vorläuferläsionen und genetische Ereignisse bei der Progression zum duktalem Pankreaskarzinom.....	4
<u>Abb. 2:</u>	Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms.....	6
<u>Abb. 3:</u>	Generierung einer transgenen Maus durch Einfügen eines Fremdgens in das Mausgenom.....	8
<u>Abb. 4:</u>	Konditionaler Knockout mit Hilfe des <i>Cre-loxP</i> -Systems.....	10
<u>Abb. 5:</u>	Signaltransduktion im klassischen IKK/ IκB/ NFκB-Signalweg.....	12
<u>Abb. 6:</u>	Generierung einer pankreasspezifischen Inaktivierung von <i>Rela</i> mit Hilfe des <i>Cre-loxP</i> -Systems im <i>Ela-TGFα-hGH Trp53^{Δpanc} Relα^{Δpanc}</i> -Modell.....	44
<u>Abb. 7:</u>	PCR der genetisch modifizierten Allele der Versuchstiere.....	46
<u>Abb. 8:</u>	Westernblot der Proteine p53 sowie RelA/p65 und dessen Inhibitoren IκBα und IκBβ.....	47
<u>Abb. 9:</u>	Immunfluoreszenzfärbung von DNA und RelA/p65 in TP- und TPa-Tumorzelllinien.....	49
<u>Abb. 10:</u>	Vergleich der medianen Überlebenszeit von TP- und TPa-Mäusen.....	50
<u>Abb. 11:</u>	Morphologische und Proliferationsanalysen in immunhistochemisch gefärbten Pankreasgewebeschnitten beider Mausmodelle.....	52
<u>Abb. 12:</u>	Westernblot einiger Zellzyklusregulatoren Cyclin D1, Cyclin E und CDK 4 aus Pankreasgewebe vier Wochen alter Mäuse.....	54
<u>Abb. 13:</u>	Analysen zur Apoptose in immunhistochemisch gefärbten Pankreasgewebeschnitten beider Mausmodelle.....	56
<u>Abb. 14:</u>	Morphologischer Vergleich der Pankreaskarzinome beider Mausmodelle....	58
<u>Abb. 15:</u>	Immunhistochemische Analysen von Pankreaskarzinomgewebeschnitten des TP- und TPa-Modells.....	59
<u>Abb. 16:</u>	Vergleich der Morphologie in vitro von TP- und TPa-Zelllinien	61
<u>Abb. 17:</u>	Westernblot nukleärer und zytoplasmatischer Lysate aus Karzinomzelllinien.....	62

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tab. 1:</u>	Eigenschaften und Vergleich von Vorläuferläsionen des duktales Pankreas- karzinoms, modifiziert nach Hruban et al., 2007 [66].....	4
<u>Tab. 2:</u>	Genotypen und Abkürzungen der verwendeten Mausmodelle.....	15
<u>Tab. 3:</u>	Chemikalien.....	17
<u>Tab. 4:</u>	Kommerziell erhältliche Kits.....	19
<u>Tab. 5:</u>	Verbrauchsmaterialien.....	19
<u>Tab. 6:</u>	Puffer und Lösungen.....	20
<u>Tab. 7:</u>	Geräte.....	23
<u>Tab. 8:</u>	Software.....	25
<u>Tab. 9:</u>	Mausherkunft.....	25
<u>Tab. 10:</u>	Materialien Immunfluoreszenz.....	31
<u>Tab. 11:</u>	Antikörper für Immunfluoreszenz.....	31
<u>Tab. 12:</u>	Antikörper Immunhistochemie.....	33
<u>Tab. 13:</u>	Material Immunhistochemie.....	34
<u>Tab. 14:</u>	Ansatz für PCR.....	35
<u>Tab. 15:</u>	Primer der PCR.....	36
<u>Tab. 16:</u>	Antikörper für Westernblot.....	40
<u>Tab 17.:</u>	Genotypen und Abkürzungen der verwendeten Mausmodelle.....	45

IX. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. R. M. Schmid für die Ermöglichung dieser Dissertation sowie die Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. H. Algül für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, als vollwertiges Teammitglied in der AG Algül am Klinikum rechts der Isar mitgearbeitet haben zu dürfen. Des Weiteren möchte ich ihm für die fachliche Betreuung und kontinuierliche Unterstützung im Dissertationsprozess danken. Durch sein Engagement und seinen ansteckenden Enthusiasmus schaffte er es stets, mich selbst in schwierigen Zeiten zu motivieren und immer wieder neue Herausforderungen zu überwinden.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Marina Lesina bedanken, welche mir zu jeder Zeit mit ihrem Fachwissen und technischen Fertigkeiten mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in die Methoden des wissenschaftlichen Arbeitens eingelernt hat. Vielen Dank für die wertvolle Unterstützung, welche mir bei der Bearbeitung des Themas sehr geholfen hat. Des Weiteren danke ich Karen Dlubatz, welche mir auch hilfsbereit als Ansprechpartnerin bei Problemen und Fragen immer tatkräftig zur Seite stand.

Auch bei meinen Doktorandenkolleginnen Katharina Ludes, Olga Goray und Thuy-Trang Phan möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und geselligen gemeinsamen Stunden bedanken.

Für ihre Hilfsbereitschaft im täglichen Forschungsalltag und die gute Zusammenarbeit möchte ich zudem meinen Teammitgliedern Patrick Neuhöfer und Matthias Treiber sowie den Mitarbeitern der AG Siveke, hier vor allem Silke Ruberg, Mathilde Neuhofer und Irina Heid sowie Dr. med. Henrik Einwächter, danken.

Für die fachgerechte Haltung und Versorgung der Versuchstiere danke ich den Mitarbeitern des ZPF Tierstalls, allen voran Rosi Bergmeyr.

Schließlich danke ich meiner Familie von ganzem Herzen, welche mir zu jeder Zeit während dem Studium und der Promotion nicht nur finanziell, sondern vor allem emotional, motivierend und ermutigend zur Seite standen und auf die ich mich immer verlassen kann.

Vielen Dank für den Ansporn und die aufbauenden Worte in allen Höhen und Tiefen, ohne die ich diese Doktorarbeit nicht geschafft hätte.

-VIELEN DANK-