



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

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

Die tumorsuppressive Wirkung von NF- κ B/RelA auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms im Zusammenhang mit dem CXCR2-Signalweg und der zellulären Seneszenz

Caroline Anna Gehring

Vollständiger Ausdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors in 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 23.12.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Einleitung.....	9
1.1.	Das Pankreaskarzinom	9
1.1.1.	Epidemiologie und Prognose	9
1.1.2.	Ätiologie	10
1.1.3.	Klinik und Diagnostik des Pankreaskarzinoms	10
1.1.4.	Therapie des Pankreaskarzinoms	12
1.2.	Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms	12
1.3.	NF- κ B	16
1.4.	Seneszenz.....	17
1.4.1.	Onkogen-induzierte Seneszenz.....	18
1.4.2.	Eigenschaften von Onkogen-induzierten seneszenten Zellen.....	22
1.5.	Mausmodelle	23
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	26
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Materialien	27
2.1.1.	Versuchstiere	27
2.1.2.	Chemikalien.....	27
2.1.3.	Kits.....	32
2.1.4.	Oligonukleotide.....	32
2.1.5.	Quantitative Real-Time-PCR Primer	33
2.1.6.	Puffer/Lösungen.....	33
2.1.7.	Gebrauchswaren.....	35
2.1.8.	Geräte und Hilfsmittel.....	36

2.2.	Methoden	39
2.2.1.	Zellisolierung	39
2.2.1.1.	Isolation von Azini	39
2.2.1.2.	Isolation von Zellen	39
2.2.2.	Histologie.....	40
2.2.2.1.	Histotechnik	40
2.2.2.1.1.	Gefrierschnitte.....	40
2.2.2.1.2.	Paraffinschnitte.....	41
2.2.2.2.	Chemische Färbemethoden	41
2.2.2.2.1.	Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	41
2.2.2.2.2.	Immunhistochemische Färbemethoden.....	42
2.2.2.2.3.	Avidin-Biotin-Methode	42
2.2.2.2.4.	β -Galaktosidase-Färbung von Zellen	43
2.2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.2.3.1.	Präparation von Desoxyribonukleinsäuren aus Mausegewebe.....	44
2.2.2.3.2.	PCR-Amplifikation	45
2.2.2.3.3.	Elektrophorese.....	46
2.2.2.3.4.	RNA-Isolation aus Pankreasgewebe.....	47
2.2.2.3.5.	Synthese von cDNA.....	47
2.2.2.3.6.	Quantitative Real-Time-PCR.....	48
2.2.2.3.6.1.	Durchführung der Real-Time-PCR.....	48
2.2.2.3.6.2.	Die absolute und relative Quantifizierung der qPCR	48
2.2.2.3.7.	Mikroarray-Analyse der Genexpression.....	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Mauslinien.....	51

3.2.	Die kontroverse Bedeutung von NF- κ B/RelA für die mediane Überlebenszeit.....	52
3.3.	RelA-Mangel führt zur Umgehung von zellulärer Seneszenz	53
3.4.	Expression der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps in CK- und CKA Mäusen.....	55
3.5.	Azini als Syntheseort der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps	56
3.6.	Die Expression duktaler CXCR2-Rezeptoren wird durch den NF- κ B Signalweg vermittelt	59
3.7.	Der CXCR2-Rezeptor ist von zentraler Bedeutung für die zelluläre Seneszenz.....	60
3.8.	CXCR2 stellt einen Prognosefaktor für das mediane Überleben von Pankreaskarzinompatienten dar	63
4.	Diskussion.....	65
5.	Zusammenfassung	74
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	76
	Literaturverzeichnis.....	78
	Danksagung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

A

ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

B

Bcl3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovines Serumalbumin

C

CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHK	Checkpoint Kinase
CK	LSL-Kras ^{G12D} ;Ptf1a-cre ^{ex1}
CKA	LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}
CKP	LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}
CKPA	LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}
CP	Crossing Point
CT	Computertomographie
CXCL2	Chemokine ligand 2

CXCR2	CXC-Chemokin-Rezeptor 2
D	
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDR	DNA Damage Response
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	
E2F	E2 promotor binding factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
G	
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
H	
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HKG	Housekeeping Gen
HP1	Heterochromatinprotein 1

I

IKK	IkappaB-Kinase
IL	Interleukin
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

K

KA	LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F}
KC	Keratinocyte chemoattractant (murines Äquivalent von IL-8)

L

LSL	Lox-Stop-Lox
-----	--------------

M

Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar

N

NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nm	Nanometer

P

p16 ^{Ink4A}	CDK- Inhibitor 2A
p21	CDK-Inhibitor 1

PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pRb	Retinoplastom-Protein
Q	
q-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
R	
Raf	Rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
S	
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin Foci
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
S-Phase	Synthese-Phase
Std.	Stunden
T	
TGF- β	Transforming growth factor β
Tm	Schmelzpunkt
TNF	Tumornekrosefaktor

Trp53	Transformation related protein 53
U	
USA	United States of America
V	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	
WHO	World Health Organization
μ	
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Sonstige	
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Prognose

Das Robert- Koch- Institut hat in einer Hochrechnung ermittelt, dass in Deutschland im Jahr 2008 annähernd 15.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind (Kaatsch 2012). Nach dieser Statistik soll die Zahl der Neuerkrankungen alleine in Deutschland für 2012 auf 15.400 ansteigen. Somit gehört das Pankreaskarzinom zu den 10 häufigsten Tumorarten in Deutschland und nach dem Kolon- und Magenkarzinom stellt es den dritthäufigsten Tumor des Gastrointestinaltraktes der westlichen Industrienationen dar (Pausch and Rösch 2009).

Das Pankreaskarzinom wird in den meisten Fällen aufgrund der oft fehlenden Frühsymptomatik erst in späten, sehr fortgeschrittenen und dadurch meist prognostisch ungünstigen Stadien diagnostiziert. Das aggressive Tumorwachstum und die frühzeitige Metastasierung tragen zudem dazu bei, dass das Pankreaskarzinom eine der schlechtesten Prognosen aller Tumorerkrankungen aufweist. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland in den Jahren 2007-2008 betrug für Männer 8% und für Frauen 7% (Kaatsch 2012). In den USA zählte es mit ca. 37.660 Todesfällen im Jahr 2011 zu den vier häufigsten Todesursachen in Folge von Krebserkrankungen (Siegel, Ward et al. 2011). Das Pankreaskarzinom war somit ursächlich für 7% der weiblichen und 6 % der männlichen Krebstoten (Siegel, Ward et al. 2011). Inzidenz und Sterberaten der Erkrankung unterliegen jedoch geographischen und zeitlichen Unterschieden. Diese Zusammenhänge wurden durch eine Auswertung von Daten der WHO von 35 europäischen und 19 nicht- europäischen Ländern der Jahre 1980-2007 untermauert. Danach ist die Mortalitätsrate dieser Erkrankung in Ländern mit hohem Grundeinkommen am höchsten. Im Jahr 2007 verzeichneten die baltischen Staaten die höchsten und Lateinamerika und Hong Kong in diesem Zusammenhang die niedrigsten Mortalitätsraten (Raimondi, Maisonneuve et al. 2009). Männer erkrankten im Vergleich zu Frauen häufiger. Das durchschnittliche Erkrankungsalter in Deutschland liegt für Männer bei 70 und für Frauen bei 76 Jahren. Im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen ist das Erkrankungsalter relativ hoch.

1.1.2. Ätiologie

Zigarettenkonsum, genetische Disposition und chronische Pankreatitis zählen zu den gesicherten Risikofaktoren eines Pankreaskarzinoms. Wie schon erwähnt ist statistisch auch eine deutliche Altersabhängigkeit nachweisbar. Zigarettenrauchen ist für 20-25% der Pankreaskarzinome verantwortlich und somit der bedeutsamste Risikofaktor (Raimondi, Maisonneuve et al. 2009). In einer veröffentlichten Metaanalyse von 2008 mit statistischen Daten aus 82 Berichten aus den Jahren 1950 bis 2007 wurde errechnet, dass Raucher sogar ein um ca. 75% erhöhtes Risiko haben, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Iodice, Gandini et al. 2008). Das Erkrankungsrisiko sinkt nach Rauchentwöhnung wieder ab, ist in den ersten 10 Jahren nach der Entwöhnung jedoch weiter erhöht (Iodice, Gandini et al. 2008). Des Weiteren geht die Wissenschaft davon aus, dass 5-10% der Karzinome auf Keimbahnmutationen zurückzuführen sind (Raimondi, Maisonneuve et al. 2009). Weitere Studien untersuchen zudem den Zusammenhang von Lifestyle Faktoren wie Alkoholkonsum und Ernährung in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Pankreaskarzinoms. So wurde in einer Metaanalyse von 2009 das relative Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken in Abhängigkeit zum Alkoholkonsum analysiert. Es wurden 21 Fall-Kontroll- und 11 Kohorten-Studien mit einbezogen, welche bis März 2009 veröffentlicht wurden. Ein erhöhtes Risiko konnte hier ausschließlich bei einem beträchtlich hohen Alkoholkonsum nachgewiesen werden. Da es als gesichert gilt, dass in den meisten Bevölkerungen Menschen mit starkem Alkoholkonsum nur einen vergleichsweise geringen Anteil stellen, ist Alkohol - wenn überhaupt- nur für einen kleinen Teil der Pankreaskarzinome ursächlich (Tramacere, Scotti et al. 2010). Starkes Übergewicht hingegen korreliert deutlich positiver mit der Erkrankung an einem Pankreaskarzinom (Arslan, Helzlsouer et al. 2010).

1.1.3. Klinik und Diagnostik des Pankreaskarzinoms

Wie eingangs bereits beschrieben, ist das Pankreaskarzinom in den Anfangsstadien aufgrund der fehlenden Frühsymptome und/oder der fehlenden Beschwerden schwer zu diagnostizieren und wird meist erst in fortgeschrittenen Stadien festgestellt. Begleiterscheinungen der Krankheit wie Übelkeit, Verdauungsstörungen,

Gewichtsverlust, Oberbauchschmerzen und Appetitverlust sind zudem sehr unspezifisch und führen somit selten frühzeitig zur korrekten Diagnose. Zu den in frühen Erkrankungsstadien am häufigsten auftretenden Symptomen gehören Rückenschmerzen. Letztere werden jedoch anfangs diagnostisch zu oft falsch interpretiert und führen den Patienten dann zunächst irrtümlicherweise in die orthopädische Praxis. In den Spätstadien des Pankreaskarzinoms kommt es meist zum Auftreten eines schmerzlosen Ikterus, welcher nur in 25% der Fälle auch ein Frühsymptom darstellen kann. Ein weiteres, jedoch eher selteneres Symptom kann die Entstehung eines Diabetes mellitus, beziehungsweise das Auftreten einer gestörten Glukosetoleranz darstellen (Herold G. 2012). Bei der Diagnosefindung steht neben einer ausführlichen Anamnese und einer klinischen Untersuchung häufig die Oberbauchsonographie an erster Stelle. Diese ist zumeist ubiquitär verfügbar und kann auch einen ersten Anhalt für Fernmetastasen geben. Neben der Oberbauchsonographie stellt auch die Endosonographie ein gängiges Verfahren bei der Diagnostik des Pankreaskarzinoms dar. Diese besitzt bei der Durchführung durch einen geübten Untersucher im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden die höchste Sensitivität. Zum weiteren Tumorstaging kommen häufig ergänzende bildgebende Verfahren, insbesondere die Computertomographie des Thorax und Abdomens zur Anwendung.

Bei fehlender Fernmetastasierung wird stets eine R0-Resektion des Tumors angestrebt, welche zugleich die einzige kurative Therapie darstellt. Präoperativ wird in der Regel keine Probebiopsie entnommen, da es hierbei zu einer Stichkanalmetastasierung kommen kann. Im Falle eines fortgeschrittenen, inoperablen Tumorstadiums wird hingegen fast immer eine endosonographische-, ultraschall- oder CT-gesteuerte Feinnadelpunktion oder Biopsieentnahme bei ERCP zur Diagnosesicherung durchgeführt. In seltenen Fällen kommt auch eine diagnostische Laparoskopie im Rahmen der Diagnostik des Pankreaskarzinoms zur Anwendung (Holstege A. 2013). Die Bestimmung der Tumormarker hingegen spielt bei der anfänglichen Diagnostik eine eher untergeordnete Rolle. Die Tumormarker CA19-9 und CEA gewinnen meist erst bei der postoperativen Verlaufskontrolle auf Rezidivfreiheit an Bedeutung (Herold G. 2012).

1.1.4. Therapie des Pankreaskarzinoms

Beim Pankreaskopfkarzinom stellt die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple beziehungsweise die weniger radikale pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Aufgrund der Lagebeziehung des Pankreas zu großen Gefäßen, den fehlenden anatomischen Grenzen und dem aggressiven Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms ist eine operative Therapie nur in 10-20% aller Fälle möglich. Bei Korpus- beziehungsweise Pankreasschwanztumoren kommt die Pankreaslinksresektion, häufig unter Mitnahme der Milz, zur Anwendung.

Bei einem palliativen Therapieansatz kann zur Verbesserung der Lebensqualität eine Chemotherapie mit Zytostatika wie Gemcitabin oder 5-Fluoruracil durchgeführt werden. Häufig kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Magenausgangsstenose bzw. durch Verlegung der extrahepatischen Gallengänge zum Auftreten eines Ikterus. Hierbei kann eine endoskopische Stenteinlage die Beschwerdesymptomatik der Patienten lindern (Kalff J. 2008).

1.2. Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms

Nach dem heutigen Kenntnisstand der Wissenschaft geht man bei der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms, analog der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms, von einem Tumorprogressionsmodell aus. Bei diesem Modell entfallen wichtige Regulations- und Kontrollmechanismen auf genetischer Ebene, welche zur malignen Entartung von pankreatischen Zellen führen. Aktivierende Mutationen von Protoonkogenen und inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressorgenen spielen dabei eine wesentliche Rolle.

Pankreatische intraepitheliale Neoplasien, auch PanIN-Läsionen genannt, stellen die Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms dar (Kennedy, Adams et al. 2011). Bei diesen handelt es sich um mikroskopisch kleine Läsionen in den kleinen (<5mm) Pankreasgängen (Maitra and Hruban 2008). Bereits 1998 wurden von Brat und seinen Mitarbeitern drei Fälle beschrieben, bei denen aus PanIN-Läsionen Jahre später ein invasives Karzinom entstanden ist (Brat, Lillemoe et al. 1998).

Diese PanINs werden je nach Morphologie und somit Dysplasiegrad in unterschiedliche Klassen eingeteilt. PanIN-1A-Läsionen sind flach, PanIN-1B papillös ohne Atypien, PanIN-2 papillös mit Atypien und PanIN-3 erfüllen die Kriterien eines Karzinoms in situ (Hruban, Adsay et al. 2001). Molekulare Analysen haben gezeigt, dass es zahlreiche Übereinstimmung der genetischen Mutationen der PanINs als auch der invasiven Adenokarzinome gibt. Im Zusammenhang mit frühen PanIN-1-Läsionen sind häufig Punktmutationen im K-Ras-Onkogen zu finden (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog). Bei dieser Mutation handelt es sich um die häufigste Mutation des Pankreaskarzinoms. Sie ist in über 90% der invasiven Karzinome nachweisbar. Jedoch reicht eine alleinige Mutation im K-Ras-Onkogen zur Progression in ein invasives Karzinom nicht aus. So entwickeln $Kras^{G12D}$ -Mäuse, welche ausschließlich eine Mutation im K-Ras-Onkogen tragen PanIN-Läsionen, jedoch kein invasives Karzinom (Almoguera, Shibata et al. 1988, Hruban, van Mansfeld et al. 1993, Grippo, Nowlin et al. 2003, Hingorani, Petricoin et al. 2003, Hruban, Maitra et al. 2008, Maitra and Hruban 2008, Kennedy, Adams et al. 2011).

Analog dazu zählt auch die Überexpression des Her2/neu-Gens zu den frühen genetischen Veränderungen des Tumorprogressionsmodells. In der Folge zeigt sich eine Überexpression des Her2/neu Wachstumsfaktors, der wiederum zu einer gesteigerten Zellproliferation führt. Zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 kommt es meist erst im fortgeschrittenen Stadium des Tumorprogressionsmodells (Hruban, Goggins et al. 2000).

Dabei stellt das p16-Gen das häufigste inaktivierte Tumorsuppressorgen des Pankreaskarzinoms dar (Maitra and Hruban 2008). Zu einem Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene Trp53, BRCA2 kommt es meist erst nach dem Übergang von PanIN-2 in PanIN-3 (Hruban, Goggins et al. 2000).

Im Folgenden soll auf die bedeutendsten genetischen Veränderungen, die zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms führen, näher eingegangen werden.

K-Ras-Genmutationen stellen die häufigsten Mutationen des Pankreaskarzinoms dar (Grippo, Nowlin et al. 2003). K-Ras gehört der Familie der Ras-Protoonkogene an und ist Teil zahlreicher Signaltransduktionswege. Die Gene der Ras-Familie kodieren allesamt ein monomeres G-Protein, welches eine Größe von 21 kDa aufweist und in seinem aktiven Zustand an GTP gebunden ist. Hierdurch wird der

Raf/MEK/ERK Signalweg aktiviert und eine Progression des Zellzyklus ausgelöst. Durch seine GTPase-Aktivität, kann das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert werden, wodurch das G-Protein wieder in seinen inaktiven Zustand übergeht. Bei Vorliegen einer K-Ras-Genmutation kommt es zu einer Blockierung dieser GTPase-Aktivität. Folglich kann das G-Protein nicht mehr inhibiert werden. Ergebnis daraus ist eine ständig anhaltende Signaltransduktion und eine damit einhergehende fortwährende Zellproliferation. Bei diesen K-Ras-Genmutationen handelt es sich meist um einen Aminosäureaustausch auf Codon 12. Jedoch können auch Mutationen im Codon 13, 59 und 61 vorliegen (Hruban, Goggins et al. 2000, Macaluso, Russo et al. 2002, Grippo, Nowlin et al. 2003, Maitra and Hruban 2008).

Das CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)-Gen (p16^{INK4a}) ist ein häufig mutiertes Tumorsuppressorgen, welches bei der Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms ebenfalls eine zentrale Rolle spielt. P16 gehört zu den CDK-Inhibitoren der INK4-Familie auf Chromosom 9p21. Das Genprodukt des CDKN2A-Gens führt durch Inhibition des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase zu einem Stopp des Zellzyklus. Dies geschieht indem p16^{INK4A} an die Cyclinkinasen 4/6 (CDK 4/6) bindet, wodurch diese keinen Komplex mit Cyclin-D1 mehr eingehen können. Durch die fehlende Komplexformation kann das Retinoblastom-Protein nicht mehr phosphoryliert werden. In seinem hypophosphorylierten Zustand bindet das Retinoblastom-Protein wiederum an E2F, was schließlich zum Zellzyklusarrest in G1 führt (Serrano, Lin et al. 1997, Ben-Porath and Weinberg 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Romagosa, Simonetti et al. 2011).

Bei 50% bis 75% der Pankreaskarzinome ist eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens Trp53 (Tumor Protein 53) auf dem Chromosom 17p zu finden. Es ist sowohl an der Regulation des Zellzyklusarrests als auch der Apoptose und der zellulären Seneszenz beteiligt (Maitra and Hruban 2008, Farnebo, Bykov et al. 2010).

Mdm2 gilt als einer der Hauptregulatoren von p53. Durch Mdm2 kommt es zur Ubiquitinierung von p53, wodurch es anschließend abgebaut wird. P53 liegt in nicht geschädigten Zellen demzufolge nur in kleinen Konzentrationen vor. Aufgrund von zellulärem Stress, wie z.B. der Schädigung der DNA, Onkogenaktivierung oder Hypoxie kommt es nicht mehr zur Ubiquitinierung. Stattdessen stellt sich eine

Stabilisierung von p53 ein, wodurch es in der Zelle akkumuliert (Acosta and Gil 2009).

Dies wiederum hat die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen sowie ein Zellzyklusarrest zur Folge. Hierbei stellt p53 einen Transkriptionsfaktor dar und induziert die Genexpression von p21. Analog zu dem oben beschriebenen Zellzyklusarrest durch Bindung von p16^{INK4A} an die Cyclinkinasen4/6 kommt es auch bei p21 durch Inhibition des Cyclin E/CDK2-Komplex zu einem Zyklusarrest. Bei einer sehr schwerwiegenden Schädigung der Zelle verursacht p53 über andere Signalwege die Apoptose der defekten Zelle. Dies erklärt unter anderem, warum Trp53 nach derzeitigen Erkenntnissen eines der bedeutendsten Tumorsuppressorgene darstellt (Ben-Porath and Weinberg 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Larsson 2011, Rovillain, Mansfield et al. 2011).

Die unten dargestellte Graphik zeigt die Entstehung des Pankreaskarzinoms anhand des Tumorprogressionsmodells.

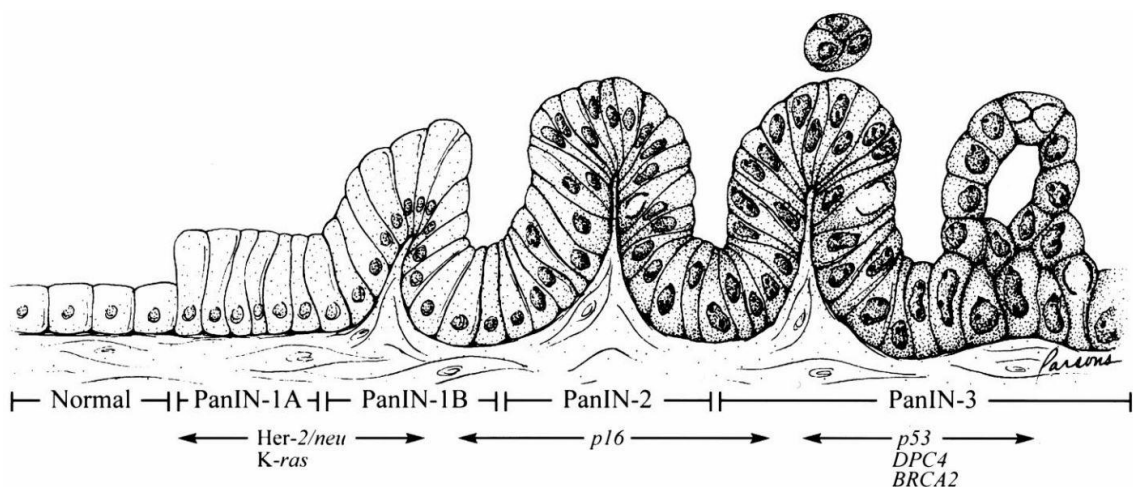


Abbildung 1 Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms

(Hruban, Goggins et al. 2000)

Schematische Darstellung der einzelnen Entwicklungsschritte des Pankreaskarzinoms. Die morphologischen, dysplastischen Veränderungen der duktalen Zellen von PanIN 1-3 werden im Zusammenhang mit den aktivierenden Onkogen- und inaktivierenden Tumorsuppressorgenmutationen demonstriert.

1.3. NF- κ B

Bei dem nuklearen Faktor κ B (NF- κ B) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher 1986 von Baltimore und seinen Mitarbeitern entdeckt wurde. NF- κ B wurde als Protein beschrieben, welches an die Enhancer-Sequenz von κ -Leichtketten von Immunglobulinen bindet und dadurch deren Genexpression anregt (Sen and Baltimore 1986, Algül, Adler et al. 2002, Sethi, Sung et al. 2008). Jedoch zeigte sich schnell, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B nicht nur auf die Transkription von Immunglobulinen Einfluss nimmt, sondern in jedem Zelltyp vorhanden ist (Algül, Adler et al. 2002, Sethi, Sung et al. 2008).

Bei dem Transkriptionsfaktor handelt es sich um einen Dimer, welcher sich aus fünf strukturell verwandten Proteinen zusammensetzt. Zu der NF- κ B - Proteinfamilie gehört C-Rel, RelA, RelB, p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2). Die aufgezählten Proteine besitzen alle die sog. Rel- Homologie-Domäne, welche sich am N-terminalen Ende befindet und aus etwa 300 Aminosäuren besteht. Sie spielt bei der Dimerisation der Proteine, der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern, der Bindung des NF- κ B -Inhibitors I κ B und der Bindung an die Ziel-DNA eine wesentliche Rolle. Häufig bestehen Dimerkomplexe aus RelA/p50. Jedoch sind auch andere Dimerkombinationen möglich. Heterodimere, welche ein Rel-Protein enthalten, regen die Transkription an. Im Gegensatz dazu haben Homodimere aus NF- κ B1 und NF- κ B2 einen inhibitorischen Effekt auf die Transkription (Algül, Adler et al. 2002, Sethi, Sung et al. 2008).

In seiner inaktiven Form liegt NF- κ B an I κ B gebunden im Zytoplasma der Zelle vor. Durch die nichtkovalente Bindung an I κ B, wird die Kernlokalisierungssequenz (NLS) der Rel-Homologie-Domäne maskiert und NF- κ B kann dadurch nicht in den Zellkern gelangen und an die Promoter- bzw. Enhancer- Sequenz des Zielgens binden. Zu den Mitgliedern der NF- κ B- Inhibitoren gehören unter anderem I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl3, NF- κ B1 und NF- κ B2 (Wang, Abbruzzese et al. 1999, Algül, Adler et al. 2002, Sethi, Sung et al. 2008).

Die Aktivierung von NF- κ B kann durch eine Fülle unterschiedlicher Stimuli ausgelöst werden. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, TNF α , TNF β), Medikamente, Bakterien, Viren und oxidativer und/oder physikalischer Stress (Algül, Adler et al. 2002, Gosselin and Abbadie 2003, Sethi, Sung et al.

2008). Bei der Aktivierung von NF- κ B kommt es zunächst zur Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes. Dieser setzt sich aus den beiden Kinasen IKK α und IKK β sowie der Regulator Einheit IKK γ -auch NEMO genannt- zusammen. Durch die Phosphorylierung von Serinresten von I κ B durch den I κ B-Kinase-Komplex kommt es zur Ubiquitinierung von I κ B. Dieses kann anschließend durch Proteasome abgebaut werden. Die dadurch frei werdende Kernlokalisationssequenz liegt folglich in einem unmaskierten Zustand vor. Hierdurch kann der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern gelangen und die Transkription unterschiedlicher Zielgene bewirken, wobei auch I κ B ein solches Zielgen darstellt und NF- κ B durch dessen Expression sich demzufolge selbst inaktiviert. Das neu synthetisierte I κ B bindet hierzu an NF- κ B, welches dadurch wieder in das Zytoplasma der Zelle gelangt (Wang, Abbruzzese et al. 1999, Algül, Adler et al. 2002, Gosselin and Abbadie 2003, Sethi, Sung et al. 2008).

Die fortlaufende Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist ein Merkmal von zahlreichen Tumoren, deren Gruppe auch das Pankreaskarzinom zuzuordnen ist (Rayet and Gelinas 1999). Eine Vielzahl von Versuchen hat hier gezeigt, dass dem Transkriptionsfaktor eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Zellapoptose zukommt. Auch die Tumorangio-genese, die Zellproliferation, die Tumoringression und letztlich auch die Metastasierung von Karzinomen stehen im Zusammenhang mit der Expression von NF- κ B (Sethi, Sung et al. 2008).

1.4. Seneszenz

Hayflick und Kollegen beschrieben Anfang der 60-er Jahre, dass diploide Zellen kein unendliches Proliferationspotential aufweisen, sondern nach einer bestimmten Anzahl von Zelldivisionen trotz adäquaten Wachstumsbedingungen in einen irreversiblen terminalen Proliferationsstopp übergehen. Diesen Zustand bezeichnet man als zelluläre Seneszenz. Die zelluläre Seneszenz kann demnach einen wichtigen Mechanismus zum Schutz vor Tumorentstehung darstellen (Hayflick 1965, Smogorzewska and de Lange 2002, Ben-Porath and Weinberg 2005).

Seneszenz kann in Telomer-abhängige und Telomer-unabhängige Formen unterteilt werden. Bei der von Hayflick dargestellten Seneszenz handelt es sich um die

Telomer-abhängige Ausprägung. Telomere sind immer wiederkehrende DNA-Sequenzen mit der Nukleotid-Sequenz TTAGGG/CCCTAA am Ende von linearen Chromosomen. Sie schützen die Enden der DNA vor Rekombination bzw. Degradation. Da die DNA-Polymerasen bei der Zellteilung die Enden von linearen Molekülen nicht replizieren können, verkürzt sich in jeder S-Phase die Telomer-Sequenz um einige Basenpaare. Mit einer steigenden Anzahl von Replikationen wird eine kritisch kurze Telomerlänge erreicht, wodurch es schließlich zu einer Aktivierung von p53 kommt. Die Zelle geht in der Folge in Seneszenz oder Apoptose über.

Telomerasen sind Enzyme, welche die ursprünglichen Telomerlängen wieder herstellen können. Im Gegensatz zu Keimbahnzellen ist jedoch die Aktivität dieser Enzyme in normalen somatischen Zellen nicht oder nur unzureichend vorhanden (Bodnar, Ouellette et al. 1998, Ben-Porath and Weinberg 2005, Collado, Blasco et al. 2007).

Davon zu unterscheiden ist die Telomer-unabhängige Form der Seneszenz. Sie kann unter anderem durch Schädigung der DNA oder durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Auch die Überexpression von aktivierten Onkogenen, besonders die des Ras, führen zur zellulären Seneszenz (Smogorzewska and de Lange 2002, Ben-Porath and Weinberg 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Adams 2009, Rovillain, Mansfield et al. 2011).

1.4.1. Onkogen-induzierte Seneszenz

Die Überexpression von Onkogenen, wie dem Myc-Onkogen oder dem Ras-Onkogen, führt zum Übergang der Zelle in Seneszenz. Dabei sind drei unterschiedliche Signalwege von zentraler Bedeutung. Bei diesen Signalwegen handelt es sich um den ARF/p53/p21-Signalweg, den p16/pRb- und den DDR-Signalweg (Larsson 2011). Wissenschaftliche Studien gehen davon aus, dass die Onkogen-induzierte Seneszenz eine wichtige Barriere der Tumorentstehung darstellt.

Bei der Karzinomentstehung kommt es zu einer Umgehung dieser Barriere und somit nicht zum Proliferationsstopp der Zelle. Um die Barriere der Seneszenz zu umgehen, werden bei der Entstehung eines Karzinoms häufig wichtige Tumorsuppressorgene wie das Trp53- oder Rb-Tumorsuppressorgen inaktiviert

(Kennedy, Adams et al. 2011, Larsson 2011). Um den Mechanismus des Übergangs in Seneszenz zu verdeutlichen, wird im folgenden Teil näher auf die drei unterschiedlichen Signalwege eingegangen. Abbildung 2 gibt eine Übersicht zu den hier dargestellten Zusammenhängen.

Durch onkogenen Stress wird der p16/pRb-Signalweg aktiviert. Zunächst wird das Gen p16^{INK4A} aus der Familie der CDK-Inhibitoren exprimiert. P16 bindet an CDK 4/6, wodurch diese keinen Komplex mehr mit Cyclin D bilden können. Da Cyclin-abhängige Kinasen nur in Komplexformation mit ihrem zugehörigen Cyclin in der Lage sind, Proteine zu phosphorylieren, bleibt die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) aus. Während des normalen Zellzyklus wird pRb jedoch durch diese Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert. Der Transkriptionsfaktor E2F wird hierdurch frei und die Zelle geht von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus über. In seinem hypophosphorylierten Zustand bindet pRb den Transkriptionsfaktor E2F. Dadurch kommt es in der Folge zum Zellzyklusarrest in G1 (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Larsson 2011, Romagosa, Simonetti et al. 2011).

Beim ARF/p53/p21-Signalweg verursachen aktivierte Onkogene die Genexpression des p19^{Arf} Proteins. Die Zellkonzentration von p53 ist in gesunden Zellen niedrig. Aufgrund der Interaktion des nun exprimierten p19^{ARF} Proteins mit der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 wird p53 von dieser nicht mehr ubiquitiniert. Demzufolge wird p53 nicht degradiert. Als Folge dazu akkumuliert es in der Zelle und seine zelluläre Konzentration steigt an (Ben-Porath and Weinberg 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Larsson 2011).

Auch bei dem DDR-Signalweg (DNA Damage Response Signalweg) kommt es durch p53-Stabilisierung zum Übergang der Zelle in Seneszenz. Bei diesem Signalweg führt die Aktivierung von Onkogenen zur Schädigung der DNA. Durch den erzeugten Replikationsstress der Zelle kommt es zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen der DNA. Daran anknüpfend folgt die Aktivierung der Protein-Kinasen ATR/ATM. Letztere wiederum führen zu einer Phosphorylierung der Kinasen CHK1/CHK2. Über diese Zwischenschritte stabilisiert sich schließlich die p53-Konzentration in der Zelle. Die DDR-Signale stabilisieren bei Zellschäden jedoch nicht nur die p53-Konzentration. Sie aktivieren zudem verschiedene DNA-Reparatursysteme zur

Regeneration der DNA. Bei erfolgreicher DNA Reparatur verstummen die DDR-Signale, die Zellen gehen nicht in Seneszenz über und können erneut Zelldivisionen durchführen (Ben-Porath and Weinberg 2005, Siveke and Schmid 2005, Larsson 2011).

Der Proliferationsstopp dieser beiden Signalwege durch p53 beruht auf der Genexpression des Zellzyklusinhibitor p21. Dieser bindet die Cyclinkinase 2, wodurch auch hier eine Komplexformation mit dem zugehörigen Cyclin ausbleibt. Folglich kann eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins durch die Cyclinkinase nicht mehr stattfinden. Die Zellzyklusprogression bleibt demzufolge aus (Serrano, Lin et al. 1997, Adams 2009).

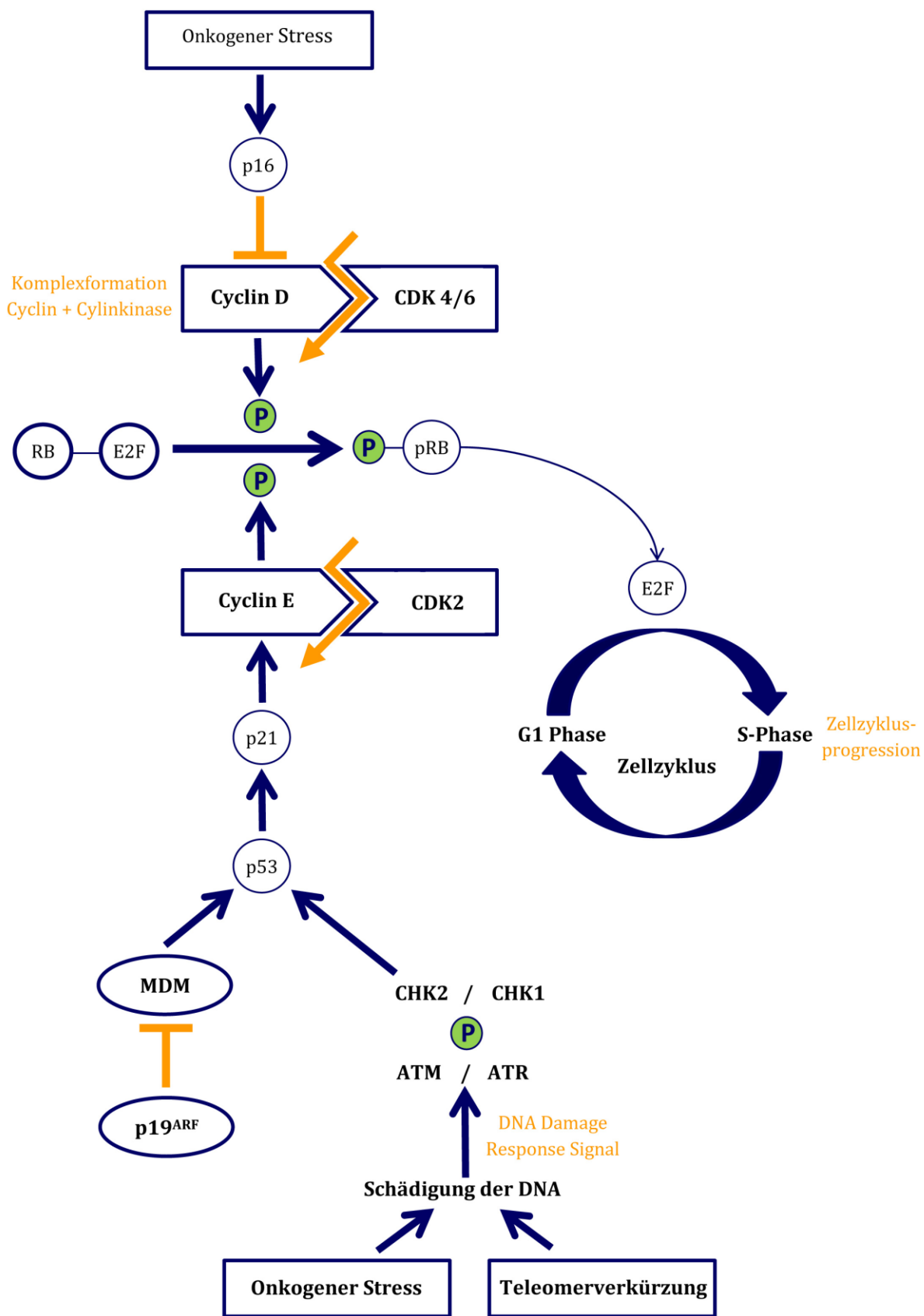


Abbildung 2 Onkogen induzierte-Seneszenz
 Schematische Darstellung des ARF/p53/p21-, p16/pRb- und DDR-Signalwegs.

1.4.2. Eigenschaften von Onkogen-induzierten seneszenten Zellen

Das Hauptmerkmal von seneszenten Zellen ist der irreversible Proliferationsstopp. Die Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der G1-Phase des Zellzyklus. In ihrer Morphologie erscheinen seneszente Zellen vergrößert und abgeflacht. Zudem weist ihr Zytoplasma zahlreiche Vakuolen auf.

Ein für seneszente Zellen bedeutender Biomarker ist die erhöhte β -Galaktosidaseaktivität. Diese erhöhte Enzymaktivität kann durch immunhistochemische Färbemethoden nachgewiesen werden. Aufgrund der besonderen Genexpression im Rahmen der Onkogen-induzierten Seneszenz stellen p16^{INK4}, p19^{ARF}, p53 und p21 weitere wichtige Biomarker dar.

Durch den DDR-Signalweg in seneszenten Zellen werden die Kinasen ATR/ATM und CHK1/CHK2 aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung des Histons H2AX am Serinrest 139. Das Histon wird in der Folge als γ H2AX bezeichnet (Hruban, Goggins et al. 2000, Siveke and Schmid 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Izeradjene, Combs et al. 2007, Chien, Scuoppo et al. 2011, Larsson 2011, Romagosa, Simonetti et al. 2011, Caldwell, DeNicola et al. 2012).

Ein weiteres Merkmal von seneszenten Zellen ist der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp (SASP). Dieser entsteht durch die Sekretion einer Vielzahl an Wachstumsfaktoren (zum Beispiel VEGF, EGF), Proteasen und inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-8). Der SASP enthält eine Reihe von Faktoren, die kontradiktorische Wirkungen aufzeigen. Beispielsweise kommt es durch Interleukin 8 zum Übergang von Zellen in Seneszenz. Interleukin 8 kann aber auch zur Ras-Onkogen-induzierten Tumorentstehung beitragen. Der in SASP involvierte Faktor IL-8 kann demzufolge die Entstehung von Tumoren sowohl begünstigen als auch einschränken. Es ist bislang nicht hinreichend geklärt, wann solche Faktoren im Tumorprogressionsmodell suppressiv und wann diese induzierend wirken.

Ein zentraler Trigger des Seneszenz-assoziierten Phänotyps ist der NF- κ B Signalweg. Studien haben gezeigt, dass der aktivierte NF- κ B Signalweg und die proinflammatorischen Faktoren zwar einerseits charakteristisch andererseits nicht obligat für den Übergang der Zellen in Seneszenz sind. Das umliegende Gewebe präsentiert sich beim Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp entzündet

(Siveke and Schmid 2005, Izeradjene, Combs et al. 2007, Acosta and Gil 2012, Salminen, Kauppinen et al. 2012).

Eine weitere Eigenschaft ist die veränderte Chromatinstruktur von seneszenten Zellen, wodurch es zur Ausbildung sogenannter Seneszenz-assoziiierter Heterochromatin Foci (SAHF) kommt. Diese Foci wurden 2003 von Scott Lowes Arbeitsgruppe zum ersten Mal beschrieben. Nach Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) kommt es bei seneszenten Zellen zum Sichtbarwerden dieser Heterochromatin-Körperchen. Dieser Phänotyp ist mit Heterochromatinmarkern wie etwa dem Heterochromatinprotein 1 (HP1) und dem an Lysin 9 methylierten Histon 3 (H3K9) assoziiert (Hruban, Goggins et al. 2000, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Chien, Scuoppo et al. 2011, Collins, Bednar et al. 2012).

Die oben aufgelisteten Eigenschaften können in seneszenten Zellen vorhanden sein, sind jedoch nicht obligat. Zudem sind sie nicht spezifisch für seneszente Zellen. Die Summe dieser unterschiedlichen Merkmale in seneszenten Zellen ermöglicht es jedoch, diese als solche einzuordnen (Hruban, Goggins et al. 2000).

1.5. Mausmodelle

In der heutigen Krebsforschung stellt das onkogene Mausmodell eines der zentralen Werkzeuge dar. Mithilfe solcher Modelle ist die Möglichkeit gegeben, durch Überexpression von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen die menschliche Karzinogenese an lebenden Tieren zu erforschen (Resor, Bowen et al. 2001).

Im Jahr 2007 erhielten Mario Capecchi, Martin Evans und Oliver Smithies einen Nobelpreis für ihre Grundlagenarbeit aus dem Jahr 1989 an Knockout-Mäusen, die es heute ermöglicht, ein beliebiges Gen oder Teile von diesem in Mäusen auszuschalten (Frohman and Martin 1989).

Zur Erzeugung von Knockout-Mäusen wird das Cre/loxP-Rekombinasesystem, welches ursprünglich aus den Bakteriophagen P1 stammt, verwendet. Um das gewünschte Zielgen auszuschalten wird dieses zunächst durch einbringen von loxP-

Elementen, welche das Zielgen oder ein funktionell wesentliches Exon dieses Gens umschließen, markiert. Um im nächsten Schritt das gewünschte Gen auszuschneiden wird in das Genom einer zweiten Mauslinie die Rekombinase Cre und ein zugehöriger Promoter eingefügt. Durch eine Vielzahl von gewebsspezifischen Promotern kann bestimmt werden, in welchem spezifischen Gewebe das Gen nicht mehr exprimiert werden soll. Die Kreuzung der beiden Mauslinien führt schließlich durch die Rekombinase in der darauffolgenden Mausgeneration zum Ausschneiden des Genabschnitts zwischen den loxP-Elementen und somit zu der gewünschten Knockout-Maus.

Da einige Promoter auch schon in der Embryonalentwicklung aktiv sind, kann eine frühzeitige Inaktivierung von bedeutenden Genen zu lebensunfähigen Nachkommen führen. Dies ist zum Beispiel bei der homologen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie dem Retinoblastom-Gen der Fall. Allerdings kann diese Entwicklung durch ligandenaktivierbare Cre-Rekombinasen vermieden werden. Das Ligandenaktivierbare Cre-Rekombinase-System hat den Vorteil, dass die Cre-Rekombinase zu einem beliebigen Zeitpunkt aktiviert werden kann (Resor, Bowen et al. 2001). Zum Beispiel fusionierten Metzger und Chambon die Cre-Rekombinase mit einer veränderten Ligandenbindungsdomäne von Östrogenrezeptoren. Diese Modifikation ermöglichte, dass Cre nur an synthetisch hergestelltes Tamoxifen, jedoch nicht an körpereigenes Östrogen binden konnte. Ohne Tamoxifen konnte die Cre-Rekombinase somit nicht mehr in den Zellkern gelangen und das geflochte Gen aus der DNA herausschneiden (Metzger and Chambon 2001).

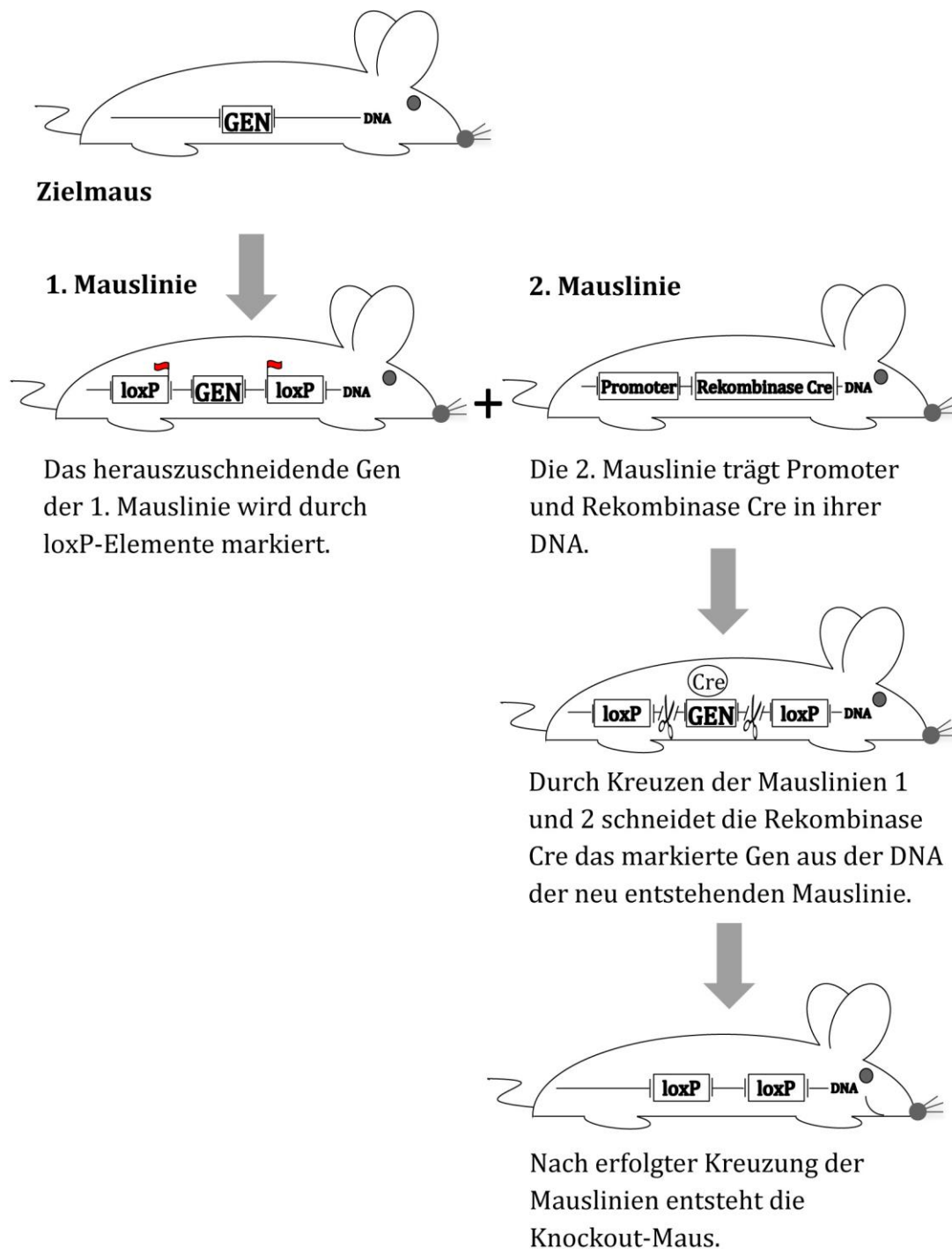


Abbildung 3 Erzeugung von Knockout-Mäusen

Die Graphik zeigt die einzelnen Schritte der Erzeugung von Knockout-Mäusen unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinasesystems.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Dissertation steht der Einfluss des Transkriptionsfaktors NF- κ B/RelA auf die Tumorentstehung des Pankreaskarzinoms.

Zu Beginn wurde der Einfluss des NF- κ B/RelA-Signalwegs auf die mediane Überlebenszeit von Kras^{G12D}-Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich ein Überlebensvorteil von Kras^{G12D}-Mäusen, welche in der Lage waren NF- κ B/RelA zu exprimieren. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob RelA einen Einfluss auf die Progression des PanIN-Progressionsmodells hat und es in Abhängigkeit von RelA zum Übergang der Zellen in Seneszenz kommt.

In diesem Zusammenhang wurden zunächst die Faktoren des SASP untersucht. Von besonderer Bedeutung war hierbei zum einen, dass NF- κ B ein Regulator dieser Faktoren zu sein scheint und zum anderen die bestehende Diskrepanz zwischen Synthese- und Wirkort dieser Faktoren.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der CXCR2-Rezeptor für den Übergang von Zellen in Seneszenz von zentraler Bedeutung ist. Unter Zugrundelegung dieser Annahme wurde die Expression des CXCR2-Rezeptors in Abhängigkeit von RelA ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Versuchstiere

Mauslinien	Abkürzungen
LSL-Kras ^{G12D} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CK
LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKA
LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKP
LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKPA
LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F}	KA (negativ Kontrolle)

Abbildung 4 Versuchstiere

2.1.2. Chemikalien

Verwendete Chemikalien	Hersteller
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bovine Pituitary Extract	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Calcium chloride dehydrate	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Cholera toxin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Citronensäure-Monohydrat 99,5%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Collagen I, rat tail	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DNA- Größenstandard (1 kb-Leiter)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Deoxynucleotide Mix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Eosin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Epidermal Growth Factor	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Ethanol absolut /96%/70%	Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
Ethidium bromide solution (10mg/ml in H ₂ O)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG (Berlin, Deutschland)
Formaldehyde	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Fungizone	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycerin, wasserfrei	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Glycine	Fluka (Buchs, Schweiz)
HAM'S F12	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
1M (4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazin-Ethansulfonsäure	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Histosec® pastilles without DMSO	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isofluran	Abbott GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
ITS Premix	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Ladepuffer (6x)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
L-Glutamine	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
LightCycler® 480 SYBR® Green I Master	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mayers Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
McCoy's 5A Modified Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Mounting Medium	Vector Laboratories (California, USA)
Natriumchlorid	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natronlauge	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Nicotinamide	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nuclear Fast Red Counterstain	Vector Laboratories (California, USA)
Nu-Serum IV	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Oligo(dt) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen (Karlsruhe; Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PBS Dulbecco	Biochrom KG (Berlin, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Proteinase K	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
2-Propanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (TWEEN® 20)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Potassium dihydrogen phosphate	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Potassium ferrocyanide	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RED Taq ReadyMix® PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Roti®-Histol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SB225002	Tocris Bioscience (Ellisville, USA)
SDS Ultra pure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Soybean Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Sytox Green Nucleic Acid Stain	Molecular Probes (Eugene, USA)
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
3,3',5-Triiodo-L-thyronine	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TRIS-hydrochlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypan Blue Solution, 0.4%	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin- EDTA	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Waymouth's Medium	Gibco® (Darmstadt, Deutschland)
X-β-Gal	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Abbildung 5 Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien

Die weiteren Chemikalien wurden von folgenden Firmen hergestellt: Fluka, Merck, Roth oder Sigma-Aldrich.

2.1.3. Kits

Bezeichnung	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
SYBR® Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
TSA Kit	Molecular Probes (Eugene, USA)
VECTASTAIN® ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

Abbildung 6 Zusammenfassung der verwendeten Kits

2.1.4. Oligonukleotide

Primer	Sequenz
p48 forward	5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CCA A -3'
p48as1642 reverse:	5'-CCT CGA AGG CGT CGT TGA TGG ACT gca-3'
p53-loxP-1 forward	5'-CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G-3'
p53-loxP-2 reverse:	5'-AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC-3'
Kras K005 forward:	5'-AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A-3'
Kras K006 reverse:	5'-CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA- 3'
p65loxP1 forward:	5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3'
p65loxP2 reverse:	5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3'

Abbildung 7 Zusammenfassung der Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

2.1.5. Quantitative Real-Time-PCR Primer

m IL-6 forward	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'
m IL-6 reverse:	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA -3'
m IL-1 β forward	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG -3'
m IL-1 β reverse:	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
m GM-CSF forward	5'-GCCATCAAAGAAGCCCTGAA-3'
m GM-CSF reverse	5'-GCGGGTCTGCACACATGTTA-3'
m KC forward	5'-TGCACCCAAACCGAAGTCATAG-3'
m KC reverse	5'-GTGGTTGACACTTAGTGGTCTC-3'
m CXCL2 forward	5'-GGCACATCAGGTACGATCCAG-3'
m CXCL2 reverse	5'-ACCCTGCCAAGGGTTGACTTC-3'

Abbildung 8 Zusammenfassung der quantitativen Real-Time-PCR Primer

2.1.6. Puffer/Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
BrdU-Lösung	Stock- Lösung 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU in H ₂ O
DMEM/F12 full medium	500 ml DMEM/F12 medium 5 mg/ml D-Glucose 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor type I 2,5 ml ITS+ Premix 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bovine Pituitary Extract 20 ng/ml Epidermal Growth Factor 5 nM 3,3',5-Triiodo-L-thyronine 1 μM Dexamethason 1.22 mg/ml Nicotinamide 5% Nu-Serum IV 100 ng/ml Cholera toxin 5 ml Penicillin/ Streptomycin

Culture medium	DMEM und HAM's F12 (1:1) 2 mM L-Glutamine 1% Penicillin/ Streptomycin 10% Kälberserum
Fixative Solution	20% Paraformaldehyd 2% Glutaraldehyd PBS
G-Solution	1L Hank's Balanced Salt Solution 1x Penicillin/Streptomycin 5-10 ml Fungizone 0.9 g/L Glucose 47.6 μ M CaCl ₂
PBS- Puffer, pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer	PBS-Puffer 0,1% (v/v) TWEEN® 20
Phosphat-Citrat Puffer	0.2 M Na ₂ HPO ₄ 0.1 M Citrate
Quenching-Puffer	75 mM NH ₄ Cl 20 mM Glycine in PBS
Solution I	Solution II 1,2 mg/ml Collagenase from Clostridium histolyticum
Solution II	McCoy's 5A Modified Medium 0,1% BSA
Staining Solution	0,1M Citrate/ Na ₂ MPO ₄ (=pH 6,0) 1M MgCl ₂ NaCl 20mg/ml x-Gal in DMF 500mM Potassium ferrocyanid

TBS-Puffer, pH 7,6	20 mM TRIS-hydrochlorid 137 mM NaCl
TBST-Puffer	20 mM TRIS-hydrochlorid 137 mM NaCl 0,1% (v/v) TWEEN® 20
Lysispuffer zur DNA Isolation aus Maus- schwanzspitzen	50mM TRIS-hydrochlorid, pH8,0 100mM EDTA 100mM NaCl 1% (w/v) SDS ultra pure 0,5mg/ml Proteinase K, kurz vor der Lyse da- zugeben
TE-Puffer	10 mM TRIS-hydrochlorid, pH 8,0 1mM EDTA, pH 8,0
TAE-Puffer	0,4M TRIS-hydrochlorid 0,2M Eisessig 0,01M EDTA x NA ₂ x 2H ₂ O
Wash Solution	PBS 2mM MgCl ₂

Abbildung 9 Zusammensetzung der Puffer/Lösungen

2.1.7. Gebrauchswaren

Gebrauchswaren	Hersteller
Cryo Tube™ Vials	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Deckglas	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Filterpipetten	Becton Dickinson (Jersey, USA)
Mikroröhre mit Verschuß	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Nylon cell strainer	BD Biosciences (San Jose, USA)

Objektträger Super-Frost®Plus	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polypropylenröhrchen, 15 ml und 50 ml Falcon	Becton Dickinson (Jersey, USA)
Safe-Lock Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spritzen	Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterican® Standardkanülen	Braun (Melsungen, Deutschland)
SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Thermo-Fast® 96 PCR Detection Plate	Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Petrischale 35 mm	BD Bioscience (New Jersey, USA)

Abbildung 10 Zusammenfassung der verwendeten Gebrauchsgüter

2.1.8. Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller
Axio Imager Mikroskop	Carl Zeiss AG (Göttingen, Deutschland)
Durchlicht- und FL- Mikroskop: Zeiss AxioStar plus FL	Carl Zeiss AG (Göttingen, Deutschland)
HERAccl®240 CO2-Inkubator	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Horizontal Electrophoresis Systems	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

Easypet® (Pipettierhilfe)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einkanalpipette (Eppendorf Research® plus Pipetten in den Größen: 0,5 µl - 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ziegra Eismaschine ZBE 150	ZIEGRA (Isernhagen, Deutschland)
Fully Automatic X- ray Film Processor	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Gel Doc™XR System	Bio-Rad (München, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Microcentrifuge Model 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom Thermo Scientific Microm HM355S	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikrowelle HF 22024	Siemens AG (München, Deutschland)
Paraffin-Streckbad GFL 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
pH Meter MP220	Mettler-Toledo GmbH (Giessen, Deutschland)
ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System ,SDS Software (real-time-PCR Gerät)	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Spectrophotometer 200	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank HERA-safe	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)

Mastercycler Gradient (Thermo-cycler)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage analytic	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)

Abbildung 11 Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel

2.2. Methoden

2.2.1. Zellisolierung

2.2.1.1. Isolation von Azini

Zur Isolation von pankreatischen Azini wurde nach Eröffnung der Maus das Pankreas vorsichtig entnommen und von diesem sichtbare Fettanteile entfernt. Im nächsten Schritt wurde dem Pankreas Solution I, welche Kollagenaselösung enthält, injiziert. Im Anschluss folgte der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes eine Inkubation für insgesamt 20 Minuten bei 37°C in Solution I. Die Lösung war nach 10 Minuten zu erneuern. Nachdem das Gewebe die gewünschte Größe erreicht hatte, konnte es zu einer Gewebe-Zell-Suspension homogenisiert und anschließend durch ein Nylonnetz filtriert werden. Schließlich war das Netz mit Solution II zu spülen, die Azinuszellen zu waschen und der durch Zentrifugation entstandene Sedimentationsüberstand zu verwerfen.

Um die Anzahl der vitalen Zellen der Zellsuspension zu ermitteln, wurden unter Verwendung des Farbstoffes Trypanblau Vitalitätstests durchgeführt. Die Funktionsweise des Tests beruht darauf, dass der Farbstoff nur von abgestorbenen, nicht jedoch von lebenden Zellen aufgenommen wird. Die Aufnahme des Farbstoffes ist somit ein Maß für die Membrandurchlässigkeit der Zelle. Sie gibt jedoch keinen Aufschluss über die Zellfunktion. Lag der Anteil der nicht angefärbten Zellen unter mikroskopischer Begutachtung bei mindestens 85% war die Qualität der Zellen ausreichend um mit diesen weiter zu arbeiten.

2.2.1.2. Isolation von Zellen

Nach erfolgter Organentnahme war das Gewebe rasch in G-Lösung zu überführen und auf Eis zu lagern. Unter Verwendung eines Becherglases wurde das Fettgewebe entfernt und das verbleibende Gewebe anschließend mit einer sterilen Schere mechanisch zerkleinert. Als nächstes konnte erneut G-Solution hinzugefügt und die aufsteigenden an der Oberfläche schwimmenden Fettanteile verworfen werden. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis die Fettanteile entfernt waren.

Im nächsten Schritt wurde mit dem Magnetrührer MR 3011 die Zellsuspension gerührt und der entstandene Überstand verworfen.

Von der verbleibenden, das Pankreasgewebe enthaltenden Suspension waren 2 ml zu entnehmen, mit Kollagenaselösung zu versetzen und anschließend für 15 bis 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad enzymatisch zu spalten.

Durch Verdünnung mit der G-Lösung wird diese Reaktion gestoppt. Das gesamte Gewebe wurde anschließend in ein 50 ml Falcon gefüllt und mit G-Lösung bis auf 50 ml aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren mit 1.000 rpm war es möglich, den Überstand zu verwerfen um dann 2 ml Trypsin/EDTA für 2 Minuten bei Raumtemperatur hinzuzufügen. Durch das Hinzufügen des Trypsin/EDTA kam es zur Auflösung der Zellkontakte.

Schließlich wurde ein Trypsininhibitor hinzugegeben und das Falcon erneut bei 1.000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in DMEM/F12 full medium bei 1.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, daran anschließend erneut in DMEM/F12 full medium überführt und für 2 bis 3 Tage auf eine kollagenbeschichtete 6-Well-Platte aufgebracht.

2.2.2. Histologie

2.2.2.1. Histotechnik

2.2.2.1.1. Gefrierschnitte

Um Schädigungen empfindlicher Antigene zu vermeiden, mussten Gefrierschnitte angefertigt werden. Zunächst wurde das Pankreasgewebe in Tissue-Tek Medium in Aluminiumförmchen eingelegt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die schockgefrorenen Gewebeproben konnten für mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden. Das schnelle Einfrieren diente der Strukturhaltung des Gewebes. Im Anschluss wurden mittels Kryostat Gefrierschnitte mit Schnittbreiten von 5-10µm angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und mit Paraformaldehyd für 10 Minuten nachfixiert.

2.2.2.1.2. Paraffinschnitte

Zunächst musste das Pankreasgewebe für 12-24 Stunden in gepuffertes Paraformaldehyd eingelegt werden. In der Folge war es möglich das Gewebe zu entwässern und in Paraffin einzugießen.

Nach Fertigstellung des Paraffinblocks wurden unter Verwendung eines Mikrotoms 3,5µm dicke Schnitte angefertigt und anschließend in ein warmes Wasserbad gelegt. Von dort konnten die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet werden. Nach dem Trocknen der Schnitte war es notwendig, diese 2 mal 5 Minuten in Xylol zu entparaffinieren. Die Rehydratation erfolgte durch Einlegen in 99,8%-igen, 96%-igen und 70%-igen Alkohol für jeweils 3 Minuten sowie zum Abschluss in H₂O für mindestens 5 Minuten.

Durch das fixieren in Paraformaldehyd und das Einbetten in Paraffin kam es zu einer Quervernetzung (=Maskierung) der Gewebsproteine. Diese Quervernetzung verhindert in der Folge die Antikörperbindung an die Epitope der Proteinantigene. Die Antikörperbindung stellt jedoch die Grundvoraussetzung der immunhistochemischen Färbung dar.

Um die beschriebenen Quervernetzungen wieder aufzulösen, wurden die Gewebsschnitte durch Beimischung von Citrat-Puffern und anschließender Erwärmung in der Mikrowelle demaskiert. Zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität waren die Schnitte für 15 Minuten in H₂O₂-Lösung zu schwenken. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte 3 mal in Waschpuffer) gewaschen.

2.2.2.2. Chemische Färbemethoden

2.2.2.2.1. Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung besteht aus zwei verschiedenen Einzelfärbungen und ermöglicht es, verschiedene Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild zu erfassen. Es handelt sich um eine Routine- bzw. Übersichtsfärbung, die es gestattet, vor den immunhistochemischen Färbungen spezielle Fragestellungen zu untersuchen. Das Hämalaun färbt alle basophilen (=sauren) Strukturen wie zum Beispiel die Zellkerne mit der sauren Desoxyribonukleinsäure und dem rauen endoplasmatischen

Retikulum blau. Eosin hingegen färbt alle acidophilen (= basischen) Strukturen rot. Dies betrifft vor allem die Proteine des Zytoplasmas und die extrazelluläre Matrix.

2.2.2.2. Immunhistochemische Färbemethoden

Die Immunhistochemie macht sich zum Nachweis von Antigenen in Zellen und Geweben die Spezifität von Antikörpern zu Nutze. Die spezifische Antigen-Antikörperbindung wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen (mit anschließender visualisierender Reaktion) sichtbar gemacht. Besonders gut sind jene Antigene geeignet, die nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten. Je nach Position und Art des Proteins kommen unterschiedliche Färbemethoden zum Einsatz.

In der Immunhistochemie werden direkte von den indirekten Färbemethoden unterschieden. Bei den direkten Methoden ist der spezifisch gegen das Antigen gerichtete Primärantikörper direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff oder dem Enzym gekoppelt. Nach Substratzugabe reagiert das Enzym mit dem Substrat und der Antigen-Antikörperkomplex wird histochemisch sichtbar. Bei der indirekten Färbemethode hingegen ist der gegen das FC-Fragment des spezifischen Primärantikörpers gerichtete Sekundärantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff oder einem solchen Enzym gekoppelt. Die Immunfluoreszenz mit einem Fluoreszenzfarbstoff bietet den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität sowie einer sehr präzisen Antigenlokalisation bei optimalen Bedingungen. Wie bei allen anderen Färbemethoden auch, hängt bei der Immunfluoreszenz die Qualität der Färbung –neben einigen weiteren Faktoren- von den richtigen Inkubationszeiten, den passenden Antikörperkonzentrationen und zutreffend gewählten Temperaturen ab.

2.2.2.2.3. Avidin-Biotin-Methode

Die indirekte, häufig angewendete Avidin-Biotin-Methode basiert auf der signifikanten Affinität des Glykoproteins Avidin für das Vitamin Biotin. Dabei verfügt Avidin über vier Bindungsstellen für Biotin. Nach Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper wird der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben. Bei

der Biotinylierung bindet das Biotin kovalent an den Sekundärantikörper. Anschließend wird der Avidin-Biotin-Enzymkomplex hinzugegeben, welcher über eine der vier Bindungsstellen des Avidins an das Biotin bindet. Bei dem Enzymkomplex handelt es sich meistens um Meerrettich-Peroxidase. Dieser wird im nächsten Schritt Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten, wodurch Protonen frei werden und Wasser entsteht. Die ebenfalls hinzugegebene Chromogenlösung DAB (3,3'-Diaminobenzidin) wird durch die freien Protonen oxidiert und es entsteht ein braunes Endprodukt.

Antikörper	Typ	Wirt	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
NF- κ B p65	pAb	Kaninchen	1:100	16 Std. bei 4°C	Santa Cruz
CXCR2	pAb	Kaninchen	1:250	16 Std. bei 4°C	Abcam

Abbildung 12 Zusammenfassung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Inkubation	Hersteller
Anti-rabbit in goat	1:500	1Std. bei RT	Sigma-Aldrich

Abbildung 13 Zusammenfassung der verwendeten Sekundärantikörper

2.2.2.2.4. β -Galaktosidase-Färbung von Zellen

Für den Nachweis von Seneszenz kann die Eigenschaft des Enzyms β -Galaktosidase genutzt werden, welches bei einem pH-Wert von 6 nur in seneszenten Zellen aktiv ist. Bei der β -Galaktosidase-Färbung wird dem Enzym das Substrat x-Gal angeboten und so von diesem 5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl abgespalten. Das entstandene Indoxyl oxidiert zum Farbstoff Indigo und die seneszenten Zellen erscheinen somit tiefblau.

Zu Beginn der Färbung wurden die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur für 15-30 Minuten erwärmt. Anschließend konnten die Zellen durch Zugabe von Fixative Solution für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert werden. Daran schlossen sich zwei Waschvorgänge mit Wash Solution an. Im nächsten Schritt erfolgte die Anfärbung der Zellen mit Staining Solution bei 37°C über Nacht. Schließlich folgten drei Waschvorgänge mit PBS. Um ein Anfärben der Zellkerne zu erreichen kam die Nu-

clear Fast Red Counterstain-Färbung von Vector zur Anwendung. Hierzu wurden die Schnitte erneut mit Wasser gewaschen und anschließend mit der Nuclear Fast Red Counterstain-Färbung für 10 Minuten inkubiert. Vor dem Eindecken mit Mounting Medium wurden die Gefrierschnitte erneut mit Wasser für 10 Minuten gewaschen. Die mit Indigo angefärbten Zellen konnten anschließend mikroskopisch quantifiziert werden.

2.2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.3.1. Präparation von Desoxyribonukleinsäuren aus Mausgewebe

Zur Isolation genomischer DNA wurde ein 0,8 - 1 cm langes Mausschwanzstück verwendet. Dieses wurde mit 750 μ l Lysispuffer sowie zum proteolytischen Verdau mit Proteinase K versetzt und über 12 Stunden bei 55°C fortwährend gemischt. Zur Trennung nichtlöslicher Zellbestandteile wurde dem Gemisch im Anschluss 250 μ l 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben und die gesamte Probe zentrifugiert. Der so entstandene Überstand war mit 175 μ l 100% Isopropanol zu versetzen und erneut für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zu zentrifugieren. Hierdurch kam es zur Entstehung eines sichtbaren DNA-Präzipitats, welches in 70%-igem Ethanol zu reinigen war. Die schließlich getrocknete DNA konnte so dann in TE-Puffer überführt und gelöst werden.

Zur anschließenden Bestimmung der DNA-Konzentrationen und zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde ein Photometer des Herstellers Thermo Fisher Scientific verwendet. Die maximale Absorption von DNA findet bei 260 nm statt, während Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm erreichen. Durch Vergleich der Extinktion der DNA-Lösung bei 260nm mit jener bei 280nm, kann der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Bei einem maximalen Reinheitsgrad der DNA beträgt die optische Dichte von E_{260}/E_{280} 1,8. Eine optische Dichte von 1 ($OD_{260}=1$) entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA.

2.2.2.3.2. PCR-Amplifikation

RED Taq ReadyMix® PCR Reaction Mix	12,5 µl
Forward Primer 10 pmol/µl	1 µl
Reverse Primer 10pmol/µl	1 µl
DNA	1 µl
dH ₂ O	9,5 µl

Abbildung 14 Reaktionsansatz der PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA. Im Wesentlichen stellt die PCR einen wiederkehrenden Zyklus aus drei Teilschritten dar.

1. Denaturierung

Zu Beginn wurde die Reaktionslösung mit der zu amplifizierenden DNA, den Polymerasen, den Primern und den Nukleotiden für drei Minuten auf 95°C erhitzt. Bei dieser sogenannten initialen Denaturierung kommt es zur Lösung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die komplementären DNA Doppelstränge zusammen gehalten haben. Bei den darauffolgenden Zyklen war das Erhitzen der Reaktionslösung auf 95°C für nur 30 Sekunden ausreichend um DNA Einzelstränge zu erhalten.

2. Primerhybridisierung

Durch das Herabsetzen der Temperatur haben sich die in der Reaktionslösung enthaltenen einzelsträngigen Primer komplementär an die DNA-Einzelstränge angelagert. Dieses sogenannte Annealing benötigt je nach Primer ca. 30 Sekunden. Um eine möglichst hohe Bindungsspezifität des Primers zu erzielen, wählt man eine Annealing-Temperatur, die circa 3°C unter der Schmelztemperatur des Primers selbst liegt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten PCRs betrug die Annealing-Temperatur 58°C.

3. Elongation

Damit die verwendete Polymerase aus dem RED Taq ReadyMix® weitere Nucleotide anlagern konnte, musste zunächst die Temperatur auf 72°C erhöht werden. Durch die DNA-Polymerase kann schließlich eine Anlagerung von komplementären Nucleotiden an den DNA-Einzelstrang erreicht werden. Bei dem letzten Zyklus wurde eine Finale Polymerisation durchgeführt. Dabei war das Halten der Temperatur von 72°C für 10 Minuten ausschlaggebend, damit sich an alle nicht vollendeten Einzelstränge Nucleotide anlagern konnten.

Die Reaktionsschritte 1-3 wurden circa 35-40 mal wiederholt. Entsprechend den jeweiligen Anforderungen war dieses Prozedere anzupassen. Beispielsweise war die benötigte Annealing-Temperatur je nach verwendetem Primer zu optimieren und an dessen spezifische Schmelzpunkttemperatur anzugleichen. Um diese wechselnden Reaktionstemperaturen einfach und genau zu erreichen, wurde ein Thermocycler des Herstellers Eppendorf verwendet.

2.2.2.3.3. Elektrophorese

Bei der Elektrophorese handelt es sich um eine analytische Methode, welche die Auftrennung und die Bestimmung der Stranglänge der mittels PCR gewonnen DNA ermöglicht. Beim Anlegen eines 100 Volt starken elektrischen Feldes wandert die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladene DNA durch ein Agarose-Gel zur positiv geladenen Anode. Das Agarose-Gel fungiert hierbei als Filter. Es ermöglicht kleineren DNA-Fragmenten eine schnellere Bewegung durch die Poren als großen Fragmenten. In Abhängigkeit von der erwarteter Fragmentgröße der DNA wurde die Konzentration des Agarose-Gels zwischen 1% und 3% variiert. Die Porengröße des Gels nahm mit steigender Gelkonzentration ab.

Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in TAE-Puffer in einem Mikrowellenherd erhitzt und nach Abkühlung bei Raumtemperatur auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid vermischt. Das Ethidiumbromid haltige Gel (0,5 µg/ml) wurde anschließend in eine Gelkammer gefüllt und nach dem Erhärten mit Ladepuffer, den DNA-Proben und dem DNA-Größenstandard versetzt. Anschließend wanderten der Größenstandard und die Nukleinsäuren nach Anschalten des elektrischen Felds durch das

Gel. Das verwendete Ethidiumbromid ermöglichte es, die DNA zu visualisieren. Dabei interkalierte es in die DNA, fluoreszierte unter ultraviolettem Licht und konnte bei einem Absorptionsmaximum von 516 bis 518nm nachgewiesen werden. Zur Geldokumentation konnte das GelDoc™ XR System verwendet werden.

2.2.2.3.4. RNA-Isolation aus Pankreasgewebe

Um die Aktivität von Pankreaszellen zu einem bestimmten Zeitpunkt untersuchen zu können, war die RNA dieser Zellen vorher zu isolieren. Die Hauptfunktion von RNA besteht in der Transkription von DNA und ihrer anschließenden Translation. Somit erlaubt die Isolierung von RNA aus Zellen eine Momentaufnahme der Zellaktivität.

Die RNA des Pankreasgewebes wurde unter Zuhilfenahme des RNeasy® Mini Kits und des Standardprotokolls der Firma Qiagen isoliert. Dieses Kit basiert auf der Silica-Membrantechnologie. Hierbei bindet die RNA selektiv an die Silica-Gel-Membran. Kontaminationen können anschließend effizient durch die mitgelieferten Waschpuffer entfernt und die gewonnen RNA eluiert werden.

2.2.2.3.5. Synthese von cDNA

Um die Expression von Genen mittels qPCR zu analysieren muss die zugehörige mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dabei katalysieren Reverse Transkriptasen, welche RNA-abhängige Polymerasen darstellen, das Umschreiben der mRNA. Die Sequenzabfolge der mRNA fungiert hierbei als Matritze der cDNA. In dieser Arbeit wurde das Kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase der Firma Invitrogen zur cDNA Herstellung verwendet. Dieses Kit enthält außer der notwendigen Reverse Transkriptase auch die nötigen Oligo (dT) 12-18 Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate.

2.2.2.3.6. Quantitative Real-Time-PCR

SYBR® Green PCR Master Mix	2x
Forward Primer	900 nM
Reverse Primer	900 Nm
cDNA	100 ng
dH2O	Bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl

Abbildung 15 Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-PCR handelt es sich um eine Polymerase-Kettenreaktion, welche die quantitative Messung der neu entstandenen DNA-Fragmente während des Reaktionsprozesses also in Echtzeit ermöglicht. Durch den fluoreszierenden DNA-Farbstoff SYBR® Green, welcher mit den neu entstandenen DNA-Doppelsträngen interkaliert, ist eine Messung der Produktbildung möglich.

2.2.2.3.6.1. Durchführung der Real-Time-PCR

Ein Amplifikationszyklus der qPCR enthält 40 sich wiederholende Zyklen. Dabei besteht ein einzelner Zyklus aus einer Denaturierungs-, Primer-Hybridisierungs- und Elongationsphase.

Die Phase der Denaturierung dauerte 30 Sekunden an und fand bei 94°C statt, wobei es zur Auftrennung der doppelsträngig vorliegenden DNA kam. Zu Beginn der qPCR wurde eine initiale Denaturierung bei 94°C für 3 Minuten durchgeführt. Die anschließende Primer-Hybridisierung bei 60°C diente der Anlagerung des Primers an das DNA-Template. Bei der darauffolgenden Elongationsphase kam es zur Synthese eines der Template-DNA komplementären DNA-Stranges. Die Temperatur war für 30 Sekunden auf 72°C zu erhöhen, wodurch das Temperaturoptimum der Taq-DNA-Polymerase erreicht wurde.

Vor der anschließenden Fluoreszenzmessung des DNA-Farbstoffs SYBR® Green wurde eine zusätzliche Inkubation für 3 Sekunden bei 80°C durchgeführt. Eine wesentliche Eigenschaft des DNA-Farbstoffes SYBR® Green ist, dass er mit hoher Affinität an doppelsträngige, jedoch mit niedriger Affinität an einzelsträngige DNA

bindet. Durch die Temperaturerhöhung kam es zu einer Dissoziation von Primer-Dimeren, da diese einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifisch amplifizierte DNA aufweisen. Hierdurch konnte eine zusätzliche Fluoreszenzemission von doppelsträngig vorliegenden Primern verhindert werden.

Um das Ergebnis der durchgeführten qPCR zu überprüfen, wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Im Rahmen der durchgeführten Schmelzkurvenanalyse wurde am Ende der PCR die Temperatur von 70°C auf 94°C unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung erhöht. Durch den Temperaturanstieg kam es zur Auftrennung doppelsträngiger DNA und somit zur Abnahme der Fluoreszenzemission. Zum Zeitpunkt des Erreichens des Schmelzwertes der amplifizierten DNA-Doppelstränge zeigte sich ein Maximum der messbaren Fluoreszenzabnahme. Weitere Maxima der Schmelzkurvenanalyse deuten auf unspezifische Nebenprodukte hin, welche in den meisten Fällen Primer-Dimeren entsprechen. Um die Bildung der Nebenprodukte zu verhindern wurden die Primer optimiert.

2.2.2.3.6.2. Die absolute und relative Quantifizierung der qPCR

Die absolute und die relative Quantifizierung stellen die zwei gängigsten Methoden zur Quantifizierung der Real-Time-PCR dar. Dabei erfolgt die absolute Quantifizierung unter Zuhilfenahme vorgegebener Kaliberkurven (z.B. Verdünnungsreihen der cDNA). Die Expression des Zielgens wird durch den direkten Vergleich mit der Kaliberkurve bestimmt.

Eine relative Quantifizierung setzt die Expression des Zielgens ins Verhältnis mit der Expression eines „Housekeeping“ Gens (HKG) oder eines HKG Index, der sich aus mehreren solcher Gene zusammensetzt. Das HKG stellt meist je ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen dar. Die Relativierung der Expressionsergebnisse anhand des HKG oder HKG Index bezeichnet man als Normalisierung. Durch die Normalisierung kann die Varianz der Expressionsergebnisse durch Relativierung von Störfaktoren (z.B. bei Fehlfunktion der Reverse Transkriptase in einer Probe) gesenkt werden. Als HKG wurde in dieser Studie Cyclophilin verwendet.

Unter Zuhilfenahme des sog. Crossing Points (CP-Wert) wird die Messung des Ausgangswerts durchgeführt. Dieser Wert markiert den Beginn der exponentiellen

Amplifizierung des Zielgens. Eine Quantifizierung der Genexpression ist nur während und nicht vor oder nach des exponentiellen Genanstiegs möglich.

Das Expressionsniveau des Zielgenes lässt sich mit folgender Formel berechnen: $2^{-\Delta CP}$. Um das Delta (Δ) zu erhalten, ist jeweils die Differenz der CP-Werte von Ziel- und Referenzgenen zu bilden. Bei der Verwendung der oben genannten Formel wird von einer Effizienz der PCR von 100% ausgegangen. Dies bedeutet, dass bei jedem Replikationszyklus das DNA-Produkt verdoppelt wird und das Fluoreszenzsignal proportional mit diesem ansteigt. In der Realität wird die Fluoreszenz durch unterschiedliche Faktoren herabgesetzt (Pfaffl, 2004).

2.2.2.3.7. Mikroarray-Analyse der Genexpression

Bei der Affymetrix-Technologie der Mikroarray-Genanalyse handelt es sich um ein Verfahren, welches es uns ermöglicht, die Expression einer Vielzahl von Genen durch deren zugehörige mRNA zu visualisieren und zu quantifizieren. Das Grundprinzip dieser Genexpressionsanalysen stellt die komplementäre Hybridisierung dar. Zunächst wurde die mRNA isoliert und in biotinylierte cRNA umgeschrieben. Die biotinylierte cRNA wurde auf die Chipmatrix aufgetragen und hybridisierte mit dem komplementären Gegenpart auf dem Array. Die isolierte RNA der pankreatischen Zelle wurden nach dem Arbeitsprotokoll von Affymetrix auf die Chipmatrix aufgetragen. Mithilfe des Affymetrix Mikroarray Suite 5.0 wurde der Genchip gescannt und analysiert. Die GSEA v2.07 Software zur Auswertung wurde vom Broad Institut Of MIT And Havard zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Mikroarrayanalysen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schmid/Dr. Einwächter der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Mauslinien

Mauslinien	Abkürzungen
LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKA
LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKP
LSL-Kras ^{G12D} ;Trp53 ^{F/F} ;RelA ^{F/F} ;Ptf1a-cre ^{ex1}	CKPA
LSL-Kras ^{G12D} ;RelA ^{F/F}	KA (negativ Kontrolle)

Abbildung 16 Mauslinien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen handelt es sich um LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1}, um LSL-Kras^{G12D};Trp53^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1}, um LSL-Kras^{G12D};Trp53^{F/F};RelA^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} und um LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F} Mäuse. Bei letzteren handelt es sich um Kontrollmäuse, da ihnen das Cre-Rekombinasesystem zum Herausschneiden der geflochten Genabschnitte fehlt. Im folgenden Abschnitt wird am Beispiel der LSL-Kras^{G12D}, RelA^{F/F}; Ptf1a-cre^{ex1} Mauslinie näher auf die einzelnen Kreuzungsschritte eingegangen.

Eine der häufigsten Mutationen eines Pankreaskarzinoms stellt die Punktmutation auf Codon 12 dar. Es kommt hierbei zu einem Aminosäureaustausch auf Exon 1. Das als Kras^{G12D} bezeichnete mutierte K-Ras durchläuft einen Austausch von Glycin gegen Aspartat. Folge der Mutation ist eine ständige Aktivierung des Ras-Signalwegs. Die vor dem Kras^{G12D}-Genlocus sitzende Stoppkassette unterdrückt eine Überexpression von Kras^{G12D}. Diese Stoppkassette wurde in unserer Mauslinie an beiden Enden gefloxt (=loxP-Stopp-loxP). Durch Kreuzung der geflochten Maus mit einer weiteren Maus, welche den pankreasspezifischen Promoter Ptf1a und die Cre-Rekombinase in ihrem Genom trägt, kommt es in der darauffolgenden Mausgeneration zum Verlust der inhibierenden Stoppkassette (Jackson, Willis et al. 2001, Hingorani, Petricoin et al. 2003). Bei der LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} Mauslinie kam es zusätzlich zu einem Knockout der Transkriptionsfaktoruntereinheit RelA. Letztere wurde ebenfalls an beiden Enden gefloxt und nach anschlie-

ßender Kreuzung mit Hilfe des Cre-Rekombinasesystems aus dem Genom herausgeschnitten. Die weiteren Mauslinien wurden an anderen Genabschnitten gefloxt, wodurch diese wiederum herausgeschnitten werden konnten. Die Vorgehensweise erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

3.2. Die kontroverse Bedeutung von NF- κ B/RelA für die mediane Überlebenszeit

Um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu untersuchen, wurden zunächst die Überlebenszeiten unterschiedlicher Mauslinien analysiert. Dabei zeigten LSL-Kras^{G12D};Ptf1a-cre^{ex1} (=CK)-Mäuse, bei welchen es zur anhaltenden Expression von K-Ras kommt, im Vergleich zu LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} (=CKA)-Mäusen, bei denen zusätzlich die Untereinheit p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht exprimiert wird, eine längere Überlebenszeit. Die durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse hat für CK-Mäuse eine mediane Überlebenszeit von 482 Tagen ergeben. Diese ist signifikant länger als die Überlebenszeit von CKA-Mäusen, welche eine mediane Überlebenszeit von nur 381 Tagen aufzeigten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der NF- κ B/RelA-Signalweg suppressiv auf die Pankreaskarzinomentstehung wirkt.

Bei einer zusätzlichen Inaktivierung des Tumorsuppressorgens Trp53, verändert sich das Verhältnis der Überlebenszeiten dieser beiden Mauslinien zueinander. LSL-Kras^{G12D};Trp^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} (CKP)-Mäuse wiesen mit einer medianen Überlebenszeit von 61 Tagen eine schlechtere Prognose auf als LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F};Trp^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1} (CKPA)-Mäuse mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 82 Tagen.

Die Tumorentstehung des Pankreaskarzinoms beruht nach heutiger Auffassung meist auf dem PanIN-Progressionsmodell. Durch Mutationen im K-Ras-Onkogen kommt es zur Entstehung von PanIN-Läsionen unterschiedlicher Schweregrade. Eine alleinige Mutation von K-Ras reicht jedoch meist nicht zur Entstehung eines invasiven Karzinoms aus. Hierzu sind weitere Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen nötig (Feldmann, Beaty et al. 2007). Dem klassischen PanIN-Progressionsmodell zur Karzinomentstehung steht die Tumorentstehung durch Inaktivierung des Trp53 Tumorsuppressorgens gegenüber. Bei Trp53 Knockout-

Mäusen kommt es in Unabhängigkeit von PanIN-Läsionen zur Karzinomentstehung (Hingorani, Petricoin et al. 2003).

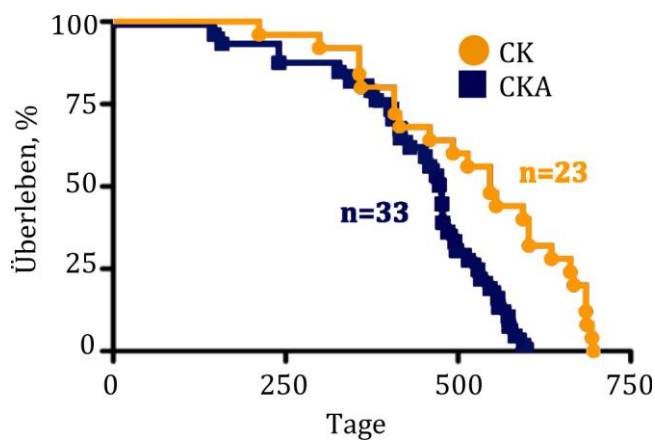


Abbildung 17 RelA-Mangel senkt die Überlebenschance in $Kras^{G12D}$ -Mäusen

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 381 Tagen für CKA-Mäuse im Gegensatz zu 482 Tagen für CK-Mäuse. *** $p < 0.0001$ (CKA vs. CK) im Mantel-Cox Log-Rank-Test.

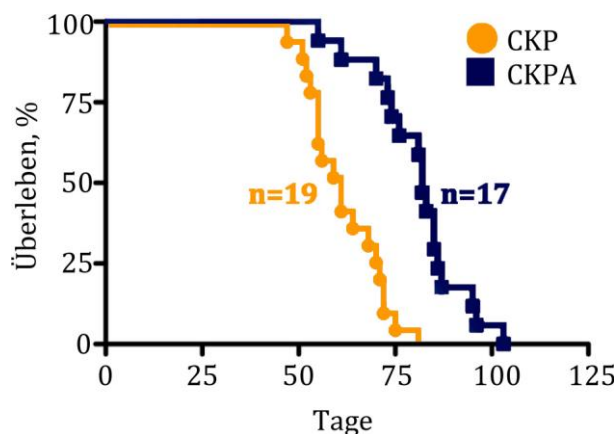


Abbildung 18 Paradoxerweise zeigen CKPA-Mäuse eine bessere Prognose als CKP-Mäuse.

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt eine durchschnittliche Überlebenszeit der CKP-Mäuse von 61 Tagen, wohingegen CKPA-Mäuse mit 82 Tagen signifikant länger leben. *** $p = 0.0001$ im Mantel-Cox Log-Rang-Test.

3.3. RelA-Mangel führt zur Umgehung von zellulärer Seneszenz

Einen wesentlichen Inhibitor der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms stellt der Übergang präneoplastischer Zellen in Onkogen-induzierte Seneszenz dar. Um den Einfluss der RelA-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf die zelluläre

Seneszenz aufzuzeigen, wurde Pankreasgewebe von neun, dreizehn und achtzehn Wochen alten CK- und CKA-Mäusen auf Seneszenz analysiert.

Hierzu wurden die Gewebsschnitte anhand der β -Galaktosidasefärbung auf eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität untersucht. Diese stellt einen der wichtigsten Biomarker für seneszente Zellen dar, wodurch diese visualisiert werden können.

Die Quantifizierung von β -Gal-positiven Zellen zeigte in neun Wochen alten CK-Mäusen eine signifikante Mehranreicherung im Vergleich zu CKA-Mäusen desselben Alters. Des Weiteren konnte mit steigendem Mausalter eine Abnahme der β -Galaktosidaseaktivität in PanIN-Läsionen von CKA-Mäusen nachgewiesen werden. Dagegen war bei CK-Mäusen von dreizehn Wochen zunächst ein Anstieg zu verzeichnen. Das Balkendiagramm in Abbildung 19a veranschaulicht diese Zusammenhänge. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass RelA ein entscheidender Faktor für den Übergang der Zellen in Seneszenz darstellt.

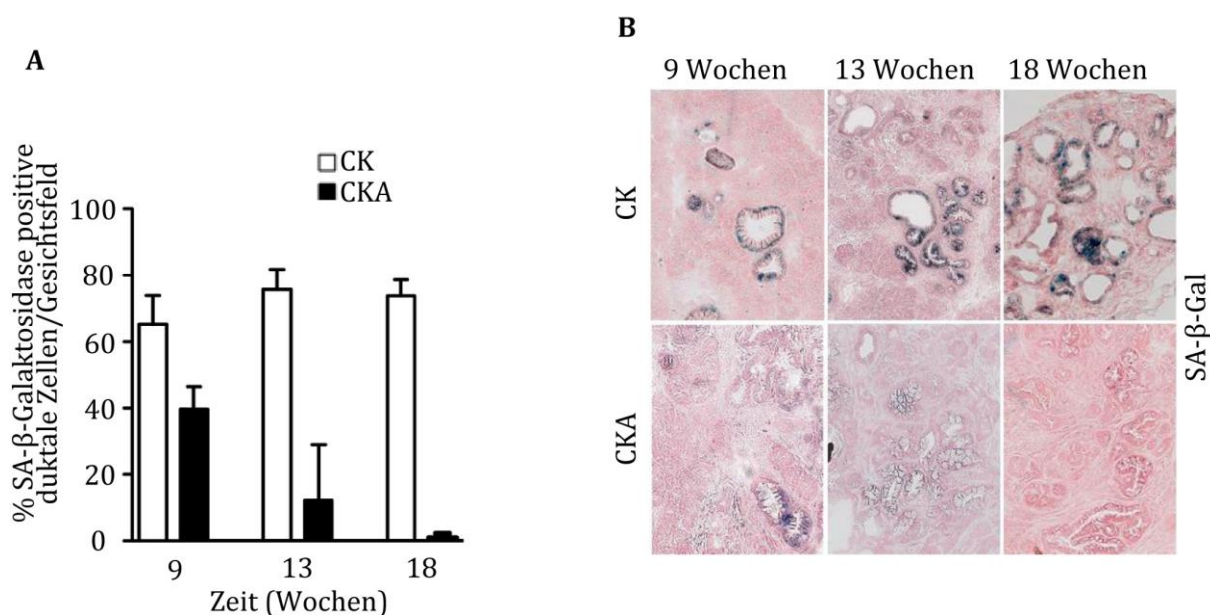


Abbildung 19 RelA-Mangel gefährdet Onkogen-induzierte Seneszenz

(A) Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität in Pankreasgewebe in neun, dreizehn und achtzehn Wochen alten CK- und CKA-Mäusen. Datenmittelwerte \pm S; (n=3).

(B) Visualisierung von seneszenten Zellen in Pankreasgewebe von CK- und CKA-Mäusen zu den oben genannten Zeitpunkten. Verwendung der β -Galaktosidasefärbung in Gefrierschnitten. Abbildungsmaßstab 50 μ m.

3.4. Expression der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps in CK- und CKA Mäusen

Abbildung 20a zeigt Pankreasgewebe, welches von sieben Tagen alten LSL-Kras^{G12D};RelA^{F/F} (KA, negativ Kontrolle)-Mäusen, CK- und CKA-Mäusen stammt. Die Paraffinschnitte dieser Mäuse wurden mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Bei der mikroskopischen Betrachtung dieser HE-Schnitte fiel auf, dass sich das Pankreasgewebe von sieben Tage alten CK- und CKA-Mäusen in seiner Morphologie nicht unterscheidet.

Die Mikroarray-basierte Genexpressionanalyse von Pankreasgewebe dieser Mäuse zeigte jedoch trotz der gleichen Gewebsmorphologie abweichendes Genexpressionsverhalten.

Die Mäuse wurden hierbei auf die Expression der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps untersucht (Coppe, Patil et al. 2010). In dieser quantitativen Genexpressionsanalyse wiesen CK-Mäuse im Vergleich zu CKA-Mäusen einen hohen Enrichment Score für die Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Expression von NF- κ B/RelA für die zelluläre Seneszenz von zentraler Bedeutung ist.

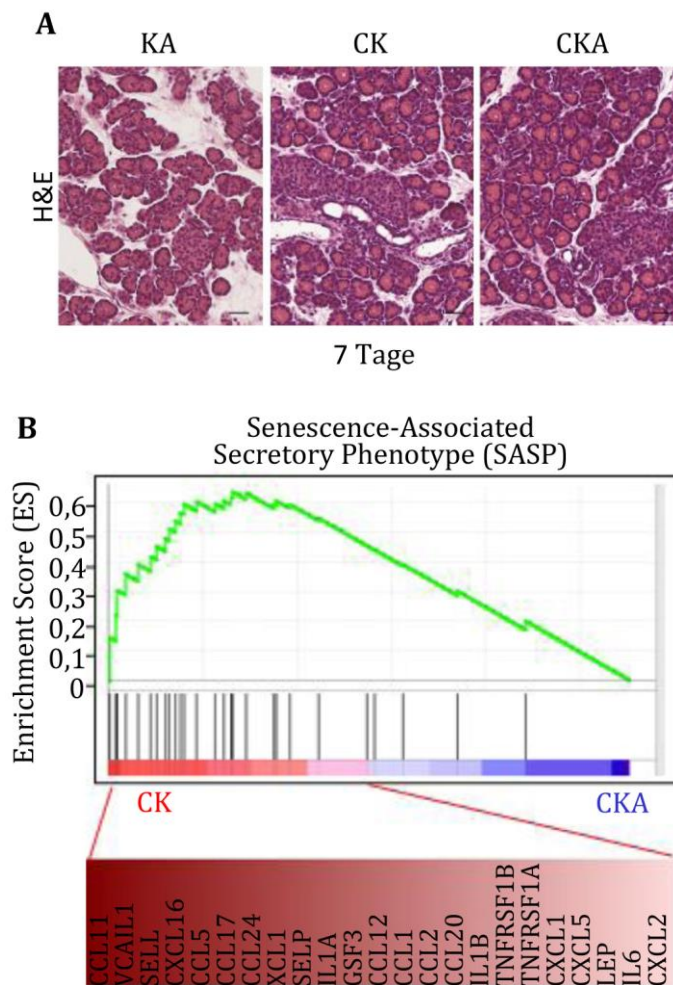


Abbildung 20 Paradoxe Differenz zwischen Gewebemorphologie und Genexpression

(A) H&E-Färbungen von Pankreasgewebe von 7 Tage alten KA-, CK- und CKA-Mäusen. Abbildungsmaßstab 50 μ m.

(B) Mikroarray-basierte Genexpressionsanalyse der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps von sieben Tagen alten CK- und CKA-Mäusen (Coppe, Patil et al. 2010).

3.5. Azini als Syntheseort der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps

Pankreasgewebe von sieben Tage alten CK- und CKA-Mäusen setzt sich im Wesentlichen aus azinären Zellen zusammen. Der Anteil der dukталen Zellen ist zu diesem Zeitpunkt gering. Die in der Genexpressionsanalyse nachgewiesenen Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps der CK-Mäuse müssen folglich aus den Azini des Pankreas stammen. Zur Untermauerung dieser Schlussfolgerung wurden quantitative Real-Time-PCRs (q-PCR) unterschiedlicher Zelltypen durchgeführt. Bei der

Durchführung der q-PCRs wurde die Genexpression von Pankreasgewebe neun Wochen alter Mäuse im Ganzen, als auch von isolierten azinären und dukta- len Zellen untersucht. Die q-PCRs des gesamten Pankreasgewebes der neun Wochen alten Mäuse bestätigten die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Mikroarray-Analysen und die Annahme, dass NF- κ B/RelA wichtig für den Übergang der Zelle in Senes- zenz ist. Dabei zeigte sich im Vergleich von CK- zu CKA-Mäusen eine signifikant stärkere Genexpression der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps -IL-6, IL-1 β , GM-CSF, KC und CXCL2- in CK-Mäusen. Als nächstes wurden q-PCRs aus iso- lierten Azini von KA-, CK- und CKA-Mäusen durchgeführt. Die KA-Mäuse wiesen ebenso wie die CKA-Mäuse nur eine geringfügige Expression der oben genannten Faktoren auf. Wohingegen die CK-Mäuse auch hier mit Abstand die höchste Genex- pression zeigten.

Im Einklang mit unserer Hypothese zeigten die Ergebnisse der q-PCRs der dukta- len Zellen nur eine schwache Expression der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps. Dabei war die Expression der SASP bei CK-Mäusen nicht bedeutend stärker als jene bei KA-Mäusen. Somit belegten die q-PCRs unsere aufgestellte Hy- pothese und es ist davon auszugehen, dass die Zellen der Azini den Syntheseort der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps darstellen.

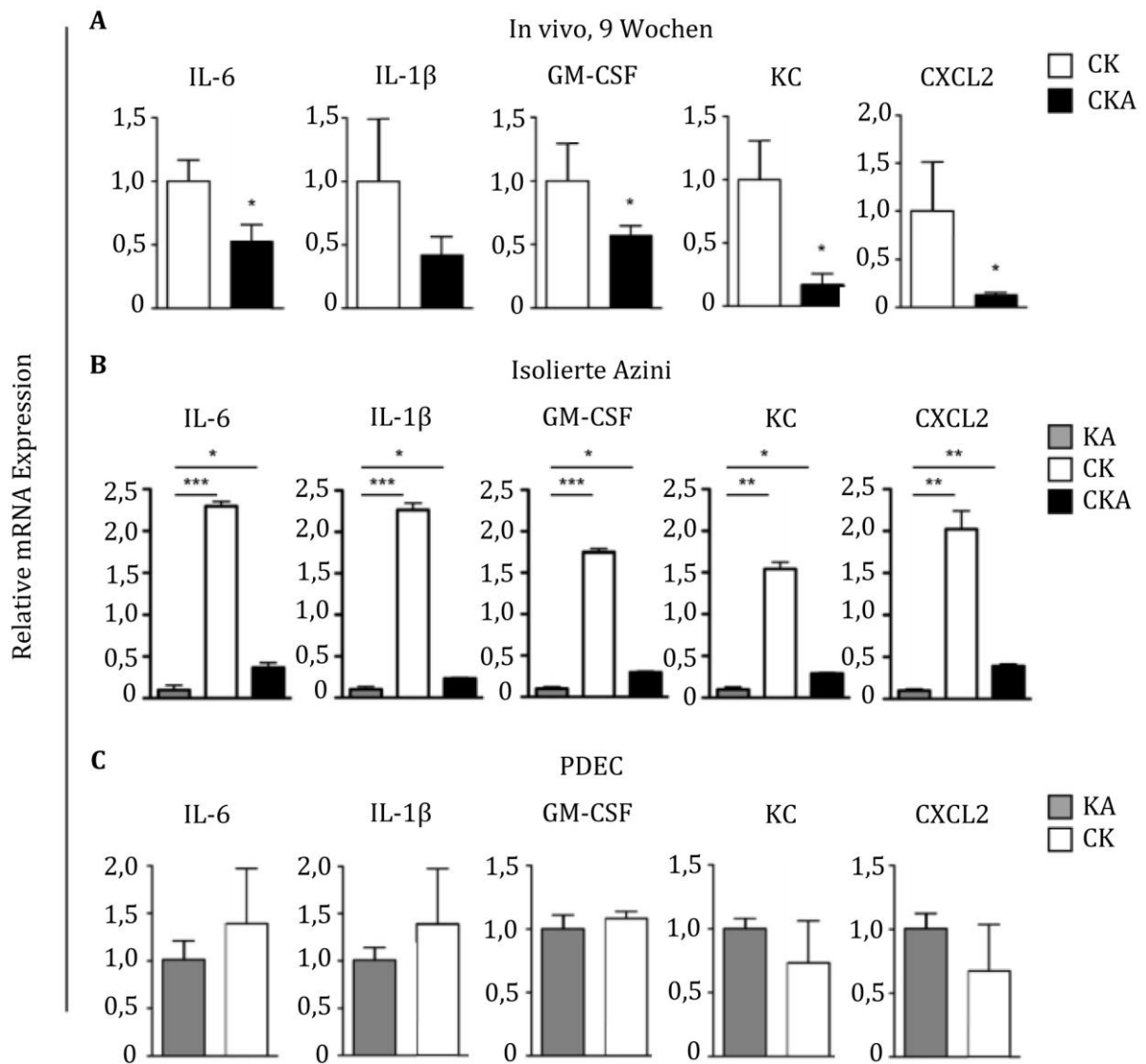


Abbildung 21 Pankreatische Azini als Hauptsyntheseort der Faktoren des SASP

(A) Quantitative RT-PCR Analyse der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps von Pankreasgewebe neun Wochen alter CK- und CKA-Mäuse. Die Daten sind als ein Vielfaches der Kontrollwerte dargestellt (CK-Mäuse). Datenmittelwerte \pm S; (n=3); *p<0,05.

(B) Quantitative RT-PCR Analyse der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps von azinären Zellen von KA-, CK- und CKA-Mäusen. Die Daten sind als Vielfaches der Kontrollwerte dargestellt (KA-Mäuse). Datenmittelwerte \pm S; (n=3); *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

(C) Quantitative RT-PCR Analyse der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps von duktaalen Zellen von CK- und KA-Mäusen. Die Daten sind als Vielfaches der Kontrollwerte dargestellt (KA-Mäuse) Datenmittelwerte \pm S; (n=3).

3.6. Die Expression duktaler CXCR2-Rezeptoren wird durch den NF- κ B Signalweg vermittelt

Acosta und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Herabregulierung des Chemokinrezeptors CXCR2 zu einer Verringerung des Übergangs der Zellen in zelluläre Seneszenz führt. Eine verstärkte CXCR2 Expression hingegen verursacht einen frühzeitigen Übergang der Zelle in Seneszenz (Acosta, O'Loughlen et al. 2008). Unter der Annahme, dass CXCR2 am Übergang der Zelle in Seneszenz beteiligt ist, wurde zunächst Pankreasgewebe von neun Wochen alten CK- und CKA-Mäusen mit dem CXCR2-Antikörper angefärbt. Dabei zeigten CK-Mäuse im Gegensatz zu CKA-Mäusen eine positive Farbreaktion der dukталen Pankreaszellen. Das Ergebnis der Farbreaktion ist in zweifacher Hinsicht interessant.

Zum einen konnte bei den CKA-Mäusen eine im Vergleich zu den CK-Mäusen stark verminderte Expression des CXCR2-Rezeptors beobachtet werden. Die Quantifizierung der CXCR2-Rezeptoren von CK- und CKA-Mäusen mittels deren mRNA-Expression und anschließender Darstellung in einem Balkendiagramm veranschaulicht diesen Expressionsunterschied. Siehe Abbildung 22. Die Expression des CXCR2-Rezeptors scheint somit abhängig von NF- κ B/RelA zu sein und schlussfolgernd durch den NF- κ B Signalweg vermittelt.

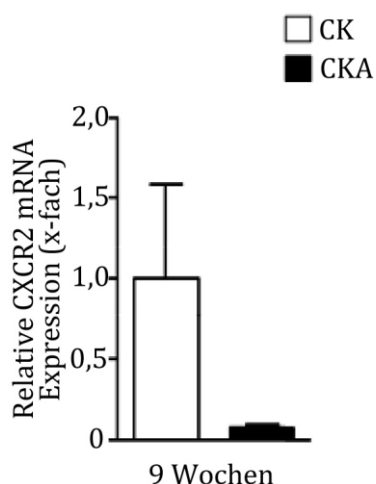


Abbildung 22 NF- κ B/RelA-abhängige Expression von CXCR2

Zum anderen ist auffällig, dass sich die dukталen nicht aber die azinären Zellen des Pankreasgewebes anfärbten. Wie oben beschrieben stellen jedoch die azinären Zel-

len den Syntheseort der Faktoren des Seneszenz-assoziierten Phänotyps dar. Folglich kommt es nach der Expression dieser Faktoren in den Azini auf parakrinem Weg zu einer Aktivierung der CXCR2-Rezeptoren der duktaalen Zellen.

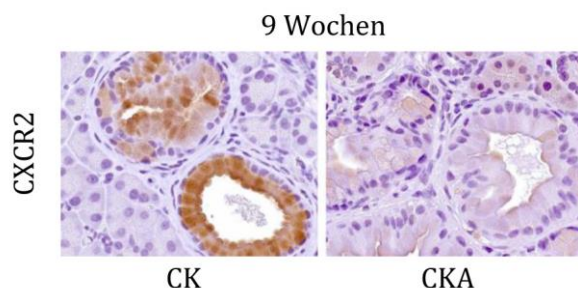


Abbildung 23 Immunhistochemische CXCR2-Färbung von CK- und CKA-Mäusen
Nachweis von CXCR2-Rezeptoren in Pankreata neun 9 Wochen alter CK- und CKA-Mäusen mittels immunhistochemischer CXCR2-Färbung. Abbildungsmaßstab 20 μ m.

3.7. Der CXCR2-Rezeptor ist von zentraler Bedeutung für die zelluläre Seneszenz

Unter der Annahme, dass die Expression von CXCR2 von zentraler Bedeutung für den Übergang von Zellen in Seneszenz ist, wurden fünf Wochen alte CK-Mäuse mit dem CXCR2-Inhibitor SB225002 behandelt. Bei den Mäusen der Kontrollgruppe wurde stattdessen PBS injiziert. Im nächsten Schritt wurden sowohl das Gewebe der Versuchsgruppe als auch das der Kontrollgruppe mittels der β -Galaktosidasefärbung auf seneszente Zellen untersucht.

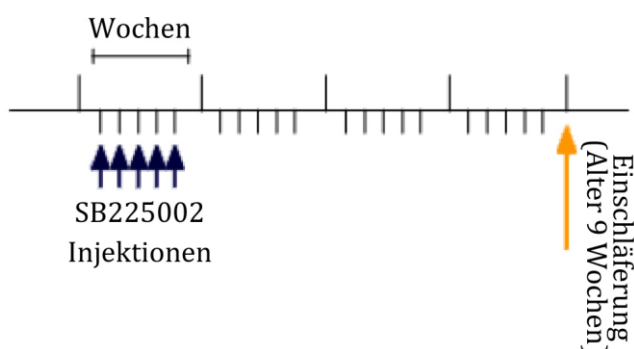


Abbildung 24 Schematische Darstellung des SB225002 Behandlungsplans der CK-Mäuse

Den fünf Wochen alten CK-Mäusen wurde für vier Wochen an fünf Tagen der Woche der CXCR2-Inhibitor SB225002 intraperitoneal injiziert. Die Dosis betrug 0,5 mg/kg. Der Kontrollgruppe wurde PBS injiziert (Ijichi, Chytil et al. 2011). Nach vier Wochen wurde das Pankreasgewebe immunhistochemisch untersucht.

Bei den Gewebeschnitten der mit dem CXCR2-Inhibitor SB225002 behandelten Mäuse kam es im Gegensatz zu den Mäusen der Kontrollgruppe nur zu einer sehr schwachen Anfärbbarkeit. Die Quantifizierung der β -Gal-positiven duktaalen Zellen verdeutlicht im Balkendiagramm den signifikanten Abfall der β -Galaktosidaseaktivität der duktaalen Zellen, nachdem diese mit dem Inhibitor behandelt wurden. Hierdurch konnte bestätigt werden, dass CXCR2 für den Übergang der Zellen in Seneszenz essentiell ist.

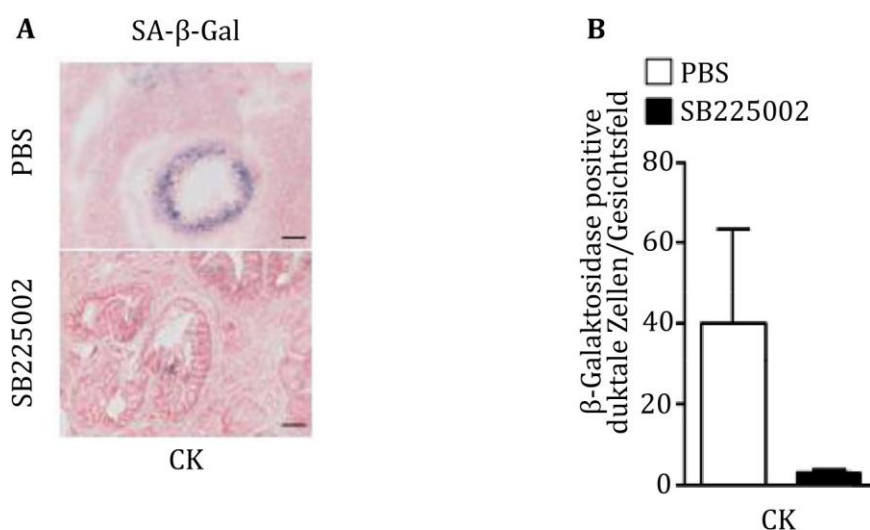


Abbildung 25 CXCR2 ist essentiell für den Übergang in Seneszenz

(A) Nachweis von seneszenten Zellen unter Verwendung der β -Galaktosidase-färbung in mit SB225002 oder PBS behandelten CK-Mäusen. Abbildungsmaßstab 50 μ m.

(B) Quantifizierung von β -Gal-positiven duktaalen Zellen der mit SB225002 oder PBS behandelten CK-Mäuse. β -Gal-positive Zellen wurden mittels 5 zufällig ausgewählten Sichtfeldern quantifiziert. Datenmittelwerte \pm S; (n=3).

Bei den mit dem CXCR2-Inhibitor behandelten Mäusen zeigte sich eine signifikant schnellere Tumorprogression. So präsentierten Mäuse der Versuchsgruppe, welche mit dem CXCR2-Inhibitor behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant häufiger PanIN-Läsionen. In der Kontrollgruppe kam es hauptsächlich zur Entwicklung von PanIN-Läsionen ersten Grades. Nur selten konnte ein Übergang in einen höheren Dysplasiegrad beobachtet werden. In der Versuchsgruppe hingegen entwickelten sich häufiger PanIN-Läsionen höheren Malignitätsgrades, wie etwa PanIN-Läsionen zweiten und dritten Grades. (Siehe Balkendiagramm Abbildung 26b). Abbildung 26a zeigt Gewebsschnitte neun Wochen alter CK-Mäuse der Versuchs- und Kontrollgruppe. Diese wurden mittels HE-Färbung angefärbt. In

den Gewebeschnitten der Kontrollgruppe erkennt man PanIN-1 Läsionen. Sie sind flach und besitzen keine Atypien. Im Vergleich hierzu zeigen die HE-Schnitte der Versuchsgruppe papilläre Strukturen und Atypien. Die PanIN-3 Läsionen der Versuchsgruppe weisen die Morphologie eines Karzinoms in situ auf.

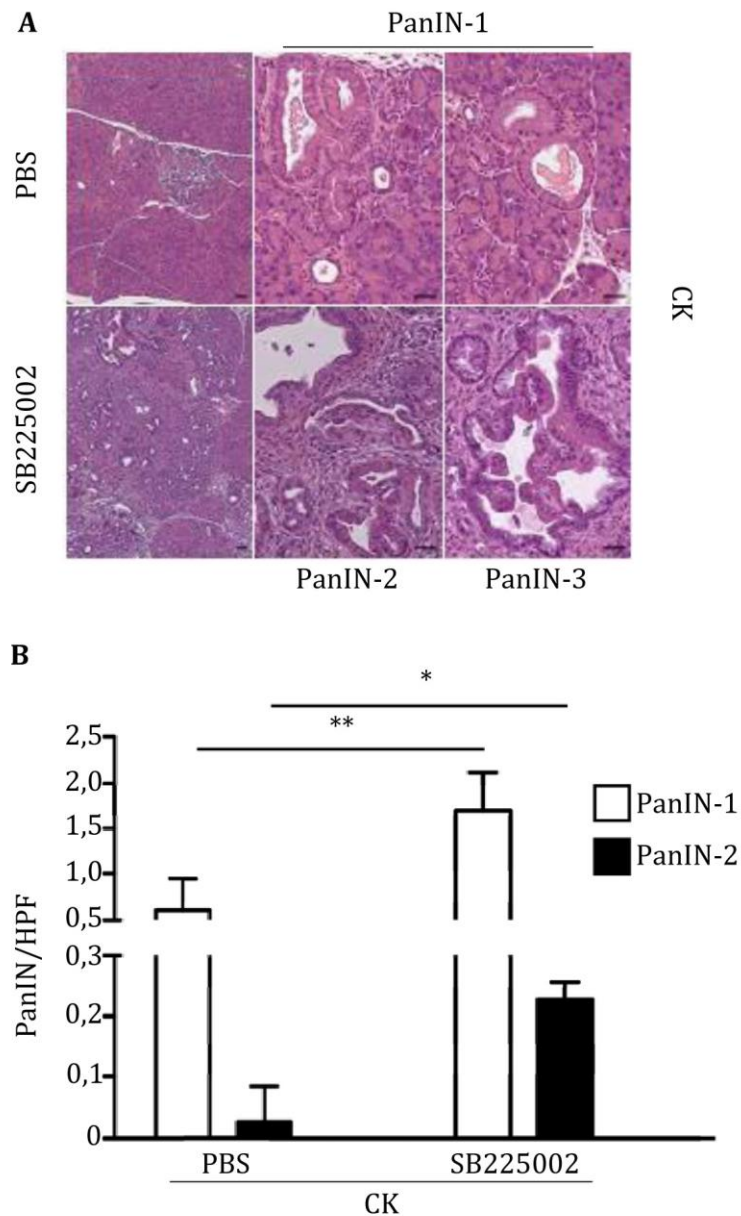


Abbildung 26 Die tumorsuppressive Wirkung von CXCR2

(A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Pankreasgewebe neun 9 Wochen alter CK-Mäuse, welche mit SB225002 oder PBS behandelt wurden. Abbildungsmaßstab 50 μ m.

(B) Quantifizierung der unterschiedlichen PanIN-Läsionen der 9 Wochen alten mit SB225002 oder PBS behandelten CK-Mäuse. Datenmittelwerte \pm S; (n=5); * p <0,05. ** p <0,005.

3.8. CXCR2 stellt einen Prognosefaktor für das mediane Überleben von Pankreas- karzinompatienten dar

Von 21 Patienten mit einem duktalem Pankreaskarzinom wurden Gewebeschnitte angefertigt, welche immunhistochemisch mit CXCR2-Antikörpern angefärbt wurden. Die Stärke der Farbreaktion auf die CXCR2-Antikörper lässt auf die Anzahl der CXCR2-Rezeptoren schließen. Bei 10 von den insgesamt 21 Gewebeschnitten kam es nur zu einer leichten oder zu keiner Farbreaktion. Somit wurden diese mit einem Score-Wert von 0-2 gewertet. Die anderen 11 Gewebsschnitte zeigten hingegen eine gute bis sehr gute Anfärbbarkeit und wurden daher mit einem höheren Score-Wert von 3-6 bewertet. In einem weiteren Schritt wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, welche einen Vergleich der medianen Überlebenszeit von Patienten mit hohem Score und Patienten mit niedrigen Score anstellt. Karzinome mit einer starken CXCR2-Expression (Score 3-6) besaßen mit einer medianen Überlebenszeit von 19,5 Monaten eine wesentlich bessere Prognose als Patienten, deren Karzinome nur eine niedrige CXCR2 Expression zeigten. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug bei diesen Patienten nur neun Monate.

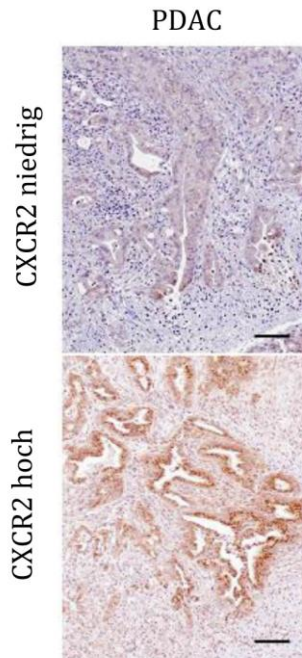


Abbildung 27 Immunhistochemische CXCR2-Färbung von menschlichem Pankreasadenokarzinom-Gewebe

In 10 von 21 Fällen war die Färbung negativ oder nur schwach positiv. In den anderen 11 Fällen war die Färbung ausgeprägter. Abbildungsmaßstab 100 μm .

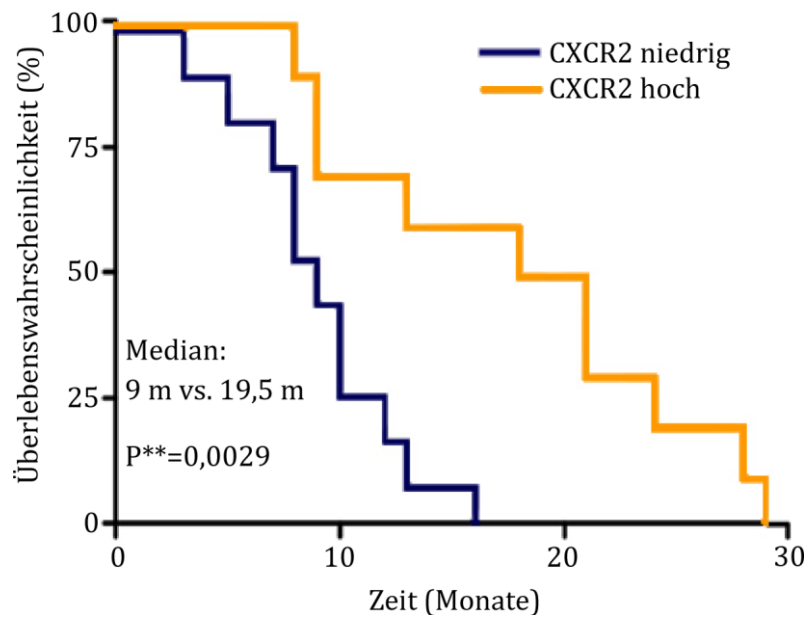


Abbildung 28 Eine niedrige CXCR2 Expression korreliert mit einer schlechten Prognose

Die Kaplan-Meier-Kurven veranschaulichen die signifikant kürzere mediane Überlebenszeit und somit schlechtere Prognose von Patienten mit niedriger CXCR2-Expression im Vergleich zu Patientin mit hoher CXCR2-Expression. **p=0,0029 im Mantel-Cox Log-Rank-Test.

4. Diskussion

Unter zellulärer Seneszenz versteht man den irreversiblen Proliferationsstopp von Zellen. Eine Vielzahl an Studien hat ergeben, dass Seneszenz im Zusammenhang mit Malignomen eine wertvolle Tumorprogressionsbarriere darstellt. Als einer der Schlüsselmechanismen der Tumorsuppression unterdrückt sie den Übergang von präneoplastischen Läsionen unterschiedlicher Schweregrade in Karzinome. In Studien zu Prostata- und Kolonkarzinomen konnte diese wertvolle Eigenschaft der zellulären Seneszenz bereits aufgezeigt werden (Rovillain, Mansfield et al. 2011).

Bei dem Übergang von Zellen in Seneszenz stellt der NF- κ B Signalweg eine wichtige Signaltransduktionskaskade dar. Eine Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten konnte diese Annahme bestätigen. Transkriptionsfaktoranalysen der Promoterregionen unterschiedlicher Gene seneszenter Zellen stützen ebenfalls diese Hypothese. Dabei stellte sich heraus, dass Gene, an die der Transkriptionsfaktor NF- κ B bindet, zu den häufigsten zehn Prozent der hoch- beziehungsweise herabregulierten Gene in seneszenten Zellen gehören. Zudem führen die Inaktivierung der RelA-Untereinheit von NF- κ B und die Expression eines NF- κ B-Inhibitors zur Umgehung der zellulären Seneszenz. Folglich kommt es durch die fortlaufende Proliferation von Zellen zur Tumorprogression (Rovillain, Mansfield et al. 2011).

Auch die Ergebnisse, welche dieser Arbeit zugrunde liegen, lassen auf eine tumorsuppressive Wirkung des Transkriptionsfaktors NF- κ B schließen. Dabei zeigte sich eine suppressive Wirkung auf die Karzinogenese von Adenokarzinomen des Pankreas durch die Aktivierung von NF- κ B.

In einer durchgeführten Kaplan-Meier-Analyse wurde die mediane Überlebenszeit von Kras^{G12D}-Mäusen, welche RelA exprimieren (CK-Mäuse) mit der medianen Überlebenszeit von RelA Knockout-Mäusen (CKA-Mäusen) verglichen. Die mediane Überlebenszeit der CK-Mäuse war mit durchschnittlich 482 Tagen signifikant länger als die der CKA-Mäuse. Diese lebten durchschnittlich lediglich 381 Tage. Durch das Ergebnis dieser statistischen Analyse ergab sich für die vorliegende Arbeit zunächst die Fragestellung, ob bei CKA-Mäusen wegen der fehlenden RelA-Untereinheit der Übergang in Seneszenz nicht stattfinden kann, woraus schließlich eine schlechtere Prognose für die mittlere Überlebenszeit dieser Mäuse resultiert.

Zellen können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Trigger in Seneszenz übergehen. Es wird zwischen der Telomer-abhängigen und der Telomer-unabhängigen Form der Seneszenz unterschieden. Bei der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms stellt die Onkogen-induzierte Seneszenz, die der Gruppe der Telomer-unabhängigen zugeordnet wird, eine der Hauptursachen für den Proliferationsstopp dar. Die Überexpression von Onkogenen führt bei dieser Unterform durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege zum Übergang in Seneszenz. Zu diesen Signalwegen gehören der ARF/p53/p21-Signalweg, der p16/pRb- und der DDR-Signalweg (Larsson 2011).

In den in dieser Arbeit verwendeten $Kras^{G12D}$ -Mäusen kommt es durch Expression des $Kras^{G12D}$ -Onkogens zur Induktion der Seneszenz. Um die vorliegende Theorie, dass CKA-Mäuse aufgrund des fehlenden RelA und dem fehlenden Übergang in Seneszenz eine schlechtere Prognose aufweisen zu überprüfen, wurden neun, dreizehn und achtzehn Wochen alte CK und CKA Mäuse auf Seneszenz untersucht. Dabei kam die β -Galaktosidasefärbung, welche eine der sensitivsten Biomarker für Seneszenz darstellt, zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass CKA-Mäuse verglichen mit CK-Mäusen weniger Seneszenz, gemessen in β -Galaktosidase positiven Zellen, aufweisen. Des Weiteren war mit steigendem Mausalter eine Abnahme der seneszenten Zellen in CKA-Mäusen zu beobachten. Dagegen stieg der Anteil an seneszenten Zellen in CK-Mäusen an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die schlechtere Prognose der CKA-Mäuse auf den fehlenden Übergang in Seneszenz zurück zu führen ist.

Dieses Ergebnis bestätigt frühere wissenschaftliche Arbeiten, bei denen aufgezeigt wurde, dass NF- κ B wesentlich am Übergang von Zellen in Seneszenz beteiligt ist. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führt zum Übergang von präneoplastischen Läsionen in Seneszenz. Frühere Forschungsergebnisse deuten auch darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B für den Seneszenz-assoziierten Phänotyp essentiell ist. Dieser Phänotyp mit seiner Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen stellt wiederum eine wichtige Voraussetzung für den Übergang von Zellen in Seneszenz dar. Chien et al. gingen in ihrer Arbeit davon aus, dass NF- κ B den Seneszenz-assoziierten Phänotyp durch die Expression von NF- κ B Zielgenen auf direktem Weg steuert (Chien, Scoppo et al. 2011). Eine frühere Studie bekräftigt eben-

falls die Auffassung, dass die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine der seneszenten Zellen den irreversiblen Proliferationsstop regulieren. Des Weiteren geht diese Studie davon aus, dass durch den SASP eine Immunantwort ausgelöst wird, welche zugleich die Beseitigung der seneszenten Läsion zur Folge hat (Acosta and Gil 2009). Kuilman und seine Mitarbeiter konnten am Beispiel von Interleukin 6 und 8 die Bedeutung einzelner Faktoren des SASP aufzeigen. Ein Fehlen dieser Interleukine führte in ihrer Studie zur Umgehung der Onkogen-induzierten Seneszenz. Demgemäß konnten sie auch in seneszenten Zellen eine erhöhte Expression dieser Faktoren nachweisen. In einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit wurden hohe Konzentrationen von Interleukin 8 in sich nicht teilenden Krypten von Kolonadenomen nachgewiesen (Kuilman, Michaloglou et al. 2008, Acosta and Gil 2009). Zusammenfassend stützen diese Studien die Hypothese, dass die Faktoren des SASP wesentlich für den Übergang der Zelle in Seneszenz sind.

Ein Erklärungsansatz für die erhöhte Sekretion solcher Botenstoffe könnte die veränderte Genexpression von seneszenten Zellen sein. Diese wiederum kann auf eine veränderte Chromatinstruktur zurückgeführt werden, wodurch es bei einigen Zelltypen zu einem veränderten Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren kommt. Chien et al. konnten im Zusammenhang mit diesem Erklärungsansatz zeigen, dass die Untereinheit RelA (p65) des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit am stärksten in seneszenten Zellen angereichert ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das NF- κ B einen wichtigen Regulator des SASP darstellt (Chien, Scuoppo et al. 2011).

Unsere Ergebnisse bestätigen diese Hypothese. Unter Zuhilfenahme von Mikroarray-Analysen wurde die Genexpression der Faktoren des SASP von CK- und CKA-Mäusen untersucht. Die Daten dieser Analysen zeigten eine deutlich höhere Anreicherung dieser Faktoren in sieben Tage alten CK-Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen CKA-Mäusen auf.

Aus der Erkenntnis heraus, wie wichtig die Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps für die zelluläre Seneszenz sind, stellte sich die Frage nach dem Syntheseort dieser Faktoren. Zu deren Klärung wurden zunächst sieben Tage alte CK- und CKA-Mäuse mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung morphologisch untersucht. Dabei fiel auf, dass sich die Morphologie des Pankreasgewebes

der CK- und CKA-Mäuse nicht wesentlich von dem der Kontrollmäuse unterscheidet. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten sich hauptsächlich azinäre Zellen. Daraus kann die These abgeleitet werden, dass die Azini der Syntheseort des SASP sind. Zur Stützung dieser Hypothese wurden quantitative Real-Time-PCRs unterschiedlicher Gewebe durchgeführt. Zunächst wurde dafür das Gewebe von neun Wochen alten CK- und CKA-Mäusen auf die Expression der SASP Faktoren untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich im Vergleich zu CKA-Mäusen eine signifikant stärkere Expression dieser Faktoren in CK-Mäusen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den oben beschriebenen Mikroarray-Daten und bekräftigt erneut die zentrale Bedeutung des NF- κ B Signalwegs für den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp und folglich für den Übergang der Zelle in Seneszenz.

Im Anschluss wurden unterschiedliche Gewebszellarten auf die Genexpression der Faktoren des SASP analysiert. Dabei zeigten insbesondere azinäre Zellen von CK-Mäusen eine sehr starke Expression. Wohingegen die Expression in CKA- und Kontrollmäusen vergleichsweise gering war. In Kontrast zu der starken Expression der azinären Zellen von CK-Mäusen war die Expression der dukталen Zellen gering. Die Expression der Faktoren war in den Zellen der kleinen Pankreasgänge der CK- und Kontroll-Mäuse annähernd gleich.

Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCRs belegen folglich die These, dass die Azini des Pankreas den Syntheseort der SASP Faktoren darstellen. Diese wiederum induzieren den Übergang in Seneszenz.

Des Weiteren haben wissenschaftliche Studien in der Vergangenheit gezeigt, dass in seneszenten Zellen nicht nur die Faktoren des SASP sondern auch der Chemokinrezeptor CXCR2 vermehrt exprimiert wird. Angrenzend daran führt eine Reduktion dieses Rezeptors zu einer Abnahme der Onkogen-induzierten Seneszenz. Die vermehrte Expression hingegen führt zu einem vorzeitigen Übergang der Zellen in Seneszenz (Acosta, O'Loghlen et al. 2008).

Schlussfolgernd scheint die Anzahl der seneszenten Zellen positiv mit der Menge an CXCR2-Rezeptoren zu korrelieren. Im Ergebnis führt dies zur Annahme, dass die Expression von CXCR2 essentiell für den Übergang der Zelle in Seneszenz ist. Eine Studie aus dem Jahr 2009 konnte zeigen, dass die Konzentration von CXCR2 in präneoplastischen Läsionen erhöht ist. In ausgereiften Prostatakarzinomen zeigt

te sich hingegen eine verminderte Expression dieses Rezeptors (Acosta and Gil 2009). Unter dem Gesichtspunkt, dass die zelluläre Seneszenz eine Tumorprogressionsbarriere darstellt, spricht die erhöhte CXCR2-Konzentration in präneoplastischen Läsionen für den CXCR2 abhängigen Übergang dieser in Seneszenz. Eine verminderte CXCR2-Konzentration in Prostatakarzinomen steht für die Tumorentstehung und gegen den Übergang in Seneszenz. Eine aktuelle Studie geht davon aus, dass ausschließlich präneoplastische Läsionen bzw. gesunde differenzierte Zellen die Fähigkeit besitzen, in Seneszenz über zu gehen. Diese Tatsache ist darin begründet, dass zu einem späteren Zeitpunkt der Karzinogenese der Seneszenz-Signalweg gestört scheint (Ruan, Liao et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CXCR2 positiv mit der Präsenz des NF- κ B Transkriptionsfaktors korreliert. So konnte für CK-Mäuse im Gegensatz zu CKA-Mäusen der immunhistochemische Nachweis von CXCR2 geführt werden. Histomorphologisch zeigten hierbei insbesondere duktale Zellen ein positives Ansprechen auf die immunhistochemische CXCR2-Färbung. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Azini des Pankreas den Synthesort der Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps darstellen, kam es zu folgendem Erklärungsansatz:

In präneoplastischen Läsionen von Kras^{G12D}-Mäusen kommt es in Abhängigkeit von NF- κ B einerseits zur Expression der Faktoren des SASP in den Azini und andererseits zur Expression von CXCR2 in den dukталen Zellen. Es ist davon auszugehen, dass die synthetisierten Faktoren der Azini auf parakrinem Weg zu den dukталen Zellen gelangen, und dort durch CXCR2-Rezeptorbindung die Onkogen-induzierte Seneszenz der Zelle auslösen. Demnach ist ein tumorsuppressiver Effekt auf die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu unterstellen. Diese Erkenntnis wird durch frühere Studien bekräftigt. Etwa konnte gezeigt werden, dass neutralisierende Antikörper von Interleukin 8 -ein Ligand von CXCR2- zur Verminderung der Onkogen-induzierten Seneszenz führen (Acosta, O'Loghlen et al. 2008). In einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit von Matsuo et al. kam es durch CXCR2-Antikörper zu einer Reduktion des Tumolvolumens in Pankreaskarzinomen von Mäusen. Das Augenmerk in dieser Arbeit richtete sich vor allem auf die Hemmung der Angiogenese durch die CXCR2-Antikörper und die hieraus resultierende Re-

duktion des Tumolvolumens. Jedoch wirkten sich diese Antikörper auch in Form einer nachweisbaren Reduktion des Ki-67 Proliferationsindex aus, was für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist (Matsuo, Raimondo et al. 2009). Dies steht mit der Hypothese in Einklang, dass die tumorsuppressive Wirkung von CXCR2 auf der Onkogen-induzierten Seneszenz beruht. Um die Notwendigkeit des Chemokinrezeptors für die Onkogen-induzierte Seneszenz aufzuzeigen, kam bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen der CXCR2-Inhibitor SB225002 zur Anwendung. Dabei wurden fünf Wochen alten CK-Mäusen nach einem festgelegten zeitlichen Schema der CXCR2-Inhibitor SB225002 injiziert. Nachdem diese Mäuse ein Alter von neun Wochen erreichten, wurde deren Pankreasgewebe mit Hilfe der β -Galaktosidasefärbung auf Seneszenz untersucht. Bei der quantitativen Auswertung der β -Galaktosidase positiven Zellen zeigte sich eine drastische Reduktion von seneszenten, duktalem Zellen in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, der PBS statt SB225002 injiziert wurde. Durch diesen Versuch ist es gelungen, die zentrale Bedeutung des CXCR2-Rezeptors für den Übergang der Zelle in Seneszenz wissenschaftlich zu belegen.

Die histopathologische Untersuchung von Paraffinschnitten mit Hilfe der konventionellen HE-Färbung zeigte in der mit SB225002 behandelten Versuchsgruppe signifikant häufiger präneoplastische Läsionen eines höheren Dysplasiegrades, wie zum Beispiel pankreatische intraepitheliale Neoplasien zweiten und dritten Grades. Auch PanIN-1-Läsionen lagen mit einer wesentlich größeren Häufigkeit vor. Die Häufigkeit und vor allem das Vorkommen der Dysplasien höheren Grades sprechen für eine rasante Tumorprogression der Versuchsgruppe. Hauptverantwortlich hierfür ist der fehlende Übergang der präneoplastischen Läsionen in Seneszenz, die durch CXCR2 vermittelt wird.

Nicht nur in Mausmodellen vermittelt CXCR2 eine Hemmung der Tumorprogression und folglich eine bessere Prognose des Pankreaskarzinoms. Um die klinische Relevanz des CXCR2-Rezeptors aufzuzeigen, wurden Pankreaskarzinome von 21 Patienten immunhistochemisch auf die Expression von CXCR2 untersucht und die mediane Überlebenszeit der Patienten bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten mit einer starken CXCR2-Expression (Score 3-6) mit einer medianen Überlebenszeit von 19,5 Monaten signifikant länger lebten, als Patienten mit einer

niedrigen CXCR2 Expression (Score 1-2). Deren durchschnittliche Überlebenszeit betrug lediglich neun Monate. Bei diesen Patienten zeigte sich ein wesentlich aggressiveres Voranschreiten der Erkrankung, was sich in der bedeutend kürzeren Überlebenszeit und somit schlechteren Prognose widerspiegelt. Die positive Korrelation zwischen der CXCR2-Expression und der Länge der Überlebenszeit spiegelt die tumorsuppressive Wirkung von CXCR2 wieder. Diese kann durch den CXCR2-vermittelten Übergang der Zelle in Seneszenz begründet werden.

Die Rolle von CXCR2 scheint jedoch nicht ausschließlich tumorsuppressiv zu sein. Ganz im Gegenteil belegen andere wissenschaftliche Arbeiten einen pro-onkogenen Effekt von CXCR2 auf die Karzinogenese unterschiedlicher Malignome (Ruan, Liao et al. 2012). Ruan et al. gehen davon aus, dass p21 dafür verantwortlich ist, ob CXCR2 tumorprogressiv oder tumorsuppressiv wirkt. Zellen, die in der Lage sind p21 zu exprimieren, gehen nach Aktivierung von CXCR2 über den p21-Signalweg in Seneszenz über. Im Gegensatz hierzu kommt es in Zellen, bei denen dieser Signalweg gestört ist, zur Umgehung der zellulären Seneszenz und somit zur Tumorprogression durch CXCR2 (Ruan, Liao et al. 2012). Bei der Onkogen-induzierten Seneszenz führen zum einen der ARF/p53/p21-Signalweg und zum anderen der DDR-Signalweg durch p53-Stabilisierung und anschließende Expression des Zellzyklusinhibitors p21 zur zellulären Seneszenz (Serrano, Lin et al. 1997, Ben-Porath and Weinberg 2005, Campisi and d'Adda di Fagagna 2007, Adams 2009, Freund, Patil et al. 2011, Larsson 2011). Morton und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass Trp53-Mutationen durch die fehlende Expression von p21 zur Pankreaskarzinomentstehung in $Kras^{G12D}$ -Mäusen führen. Grund der Karzinomentstehung ist hierbei ebenfalls der fehlende Übergang der präneoplastischen Läsionen in Seneszenz. Durch Trp53-Mutationen, bei welchen der Zellzyklusinhibitor p21 weiterhin exprimiert wird, konnte die Pankreaskarzinomentstehung jedoch verhindert werden (Morton, Timpson et al. 2010). Acosta et al. beschreiben analog zu Ruan et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2009 die mögliche paradoxe Wirkung des CXCR2-Signalwegs. Der Übergang in Seneszenz wird hierbei durch den p53-Signalweg vermittelt. Unterbrechungen bzw. Mutationen dieses Signalwegs können den tumorsuppressiven Effekt von CXCR2 aufheben. CXCR2 kann in diesem Zusammenhang einen komplett gegensätzlichen und somit pro-onkogenen Effekt auf die Tumorentstehung haben (Acosta and Gil 2009). Auch das

Ergebnis unserer durchgeführten Kaplan-Meier-Analyse konnten wir mit Hilfe des Erklärungsansatzes des Paradoxons des CXCR2-Signalwegs begründen. Bei dieser statistischen Analyse wurde die mediane Überlebenszeit von CKP (LSL-Kras^{G12D};Trp53^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1})-Mäusen mit der von CKPA (LSL-Kras^{G12D};Trp53^{F/F};RelA^{F/F};Ptf1a-cre^{ex1})-Mäusen verglichen. CKP-Mäuse hatten mit durchschnittlich 61 Tagen eine vergleichsweise schlechte Prognose gegenüber den CKPA-Mäusen, welche im Median 82 Tage lebten. Die schlechte Prognose der CKP-Mäuse mit intakter RelA-Untereinheit kann durch die fortlaufende NF-κB abhängige Expression der Faktoren des SASP erklärt werden. Durch den Trp53 Knockout der CKP-Mäuse können präneoplastische Läsionen nicht mehr CXCR2-vermittelt über den p53-Signalweg in Seneszenz übergehen. Die synthetisierten proinflammatorischen Zytokine des SASP tragen somit nicht mehr durch Rezeptorbindung an CXCR2 zum Übergang der Zelle in Seneszenz bei. Ganz im Gegenteil rückt die kanzerogene Wirkung der CXCR2-Liganden in den Vordergrund. Schon in früheren Studien wurde der onkogene Effekt der inflammatorischen Zytokine der Faktoren des SASP beschrieben (Acosta and Gil 2009).

Zusammenfassend stellt die Onkogen-induzierte Seneszenz eine wichtige Tumorprogressionsbarriere bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps, welche für den Übergang der Zelle in den Proliferationsstopp verantwortlich sind, abhängig von NF-κB/RelA in den Azini des Pankreas synthetisiert werden. Diese Faktoren stellen Liganden des Chemokinrezeptors CXCR2 dar, welcher ebenfalls über den NF-κB-Signalweg exprimiert wird. Die Faktoren des SASP führen schließlich auf parakrinem Weg zur Aktivierung der CXCR2-Rezeptoren der dukталen Zellen, die wiederum durch Rezeptorbindung in Seneszenz übergehen. In diesem Zusammenhang hat die Aktivierung des CXCR2-Signalwegs durch den Übergang der dukталen Zellen in Seneszenz eine tumorsuppressive Wirkung. Die Faktoren des SASP können jedoch nicht nur rein tumorsuppressiv wirken. Ganz im Gegenteil kann es durch die RelA-abhängige Expression dieser Faktoren bei einem gestörten CXCR2-Signalweg, bzw. bei Trp53 Knockout-Mäusen zur Umgehung der Seneszenz und somit zu einem pro-onkogenen Effekt kommen.

Da sowohl die Liganden des CXCR2-Rezeptors als auch der Rezeptor selbst NF- κ B abhängig exprimiert werden, stellt das genaue Verständnis der paradoxen Wirkung des CXCR2-Signalwegs einen interessanten Ansatzpunkt für weitere wissenschaftliche Arbeiten dar. Möglicherweise kann eines Tages die Therapie des Pankreaskarzinoms durch NF- κ B-Inhibitoren ergänzt und hierdurch die Prognose der Patienten verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört zu den 10 häufigsten Tumorarten in Deutschland und stellt nach dem Kolon- und Magenkarzinom den dritthäufigsten Tumor des Gastrointestinaltraktes der westlichen Industrienationen dar (Pausch and Rösch 2009). Im Jahr 2011 zählte es in den USA zu den vier häufigsten Todesursachen in Folge von Karzinomerkrankungen (Siegel, Ward et al. 2011).

Histologisch handelt es sich bei der Mehrzahl der Pankreaskarzinome um Adenokarzinome, die von den duktalem Zellen des Pankreas ausgehen und vorwiegend im Pankreaskopf lokalisiert sind. Ein charakteristisches Merkmal des Pankreaskarzinoms ist die oft fehlende oder sehr unspezifische Frühsymptomatik, wodurch es meist erst in weit fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. Weitere prognostisch ungünstige Eigenschaften sind das aggressive Tumorwachstum und die Tendenz zu einer frühzeitigen Metastasierung. Die radikale Tumorresektion stellt meist das einzige kurative Therapieverfahren dar und ist nur in lokal begrenzten und nicht metastasierten Tumorstadien möglich. In der Mehrzahl der Fälle ist das Tumorwachstum jedoch schon fortgeschritten und eine kurative Operation ausgeschlossen. In diesen Fällen kommt größtenteils nur eine palliative Chemotherapie bzw. symptomatische Therapie zur Verbesserung bzw. Erhaltung der Lebensqualität in Frage (Kalff J. 2008, Herold G. 2012).

Die Entstehung des Pankreaskarzinoms beruht nach Auffassung der Wissenschaft auf einem Tumorprogressionsmodell. In diesem Modell kommt es durch aktivierende Protoonkogen- bzw. inaktivierende Tumorsuppressorgenmutationen über pankreatische intraepitheliale Neoplasien zur Entstehung eines invasiven Karzinoms. Diese pankreatischen intraepithelialen Neoplasien stellen folglich die Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms dar und werden nach ihrer Morphologie in Klassen von PanIN-1 bis PanIN-3 eingeteilt. K-Ras-Genmutationen und Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p16 und Trp53 sind die häufigsten und bedeutendsten genetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms (Almoguera, Shibata et al. 1988, Hruban, van Mansfeld et al. 1993, Grippo, Nowlin et al. 2003, Hingorani, Petricoin et al. 2003, Hruban, Maitra et al. 2008, Kennedy, Adams et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang der Pankreaskarzinomentstehung und der zellulären Seneszenz untersucht. Als zelluläre Seneszenz wird der irreversible Proliferationsstop von Zellen bezeichnet. Sie fungiert als wichtige Tumorprogressionsbarriere. Einen bedeutsamen Trigger der Seneszenz stellt die Überexpression von Ras-Onkogenen dar. Beim Übergang der Zelle in Onkogen-induzierte Seneszenz sind die folgenden drei Signalwege ausschlaggebend: Der ARF/p53/p21- Signalweg, der p16/pRb- und der DDR- Signalweg (Larsson 2011).

Auch der NF- κ B Signaltransduktionskaskade ist eine große Bedeutung beim Übergang der Zelle in Seneszenz beizumessen (Rovillain, Mansfield et al. 2011). Mithilfe von unterschiedlichen Mauslinien wurde der Einfluss von NF- κ B/RelA auf Seneszenz und folglich auf die Tumorprogression untersucht.

Zum einen konnte gezeigt werden, dass der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp, der für den Übergang der Zellen in Seneszenz von zentraler Bedeutung ist, in den Azini des Pankreas RelA-abhängig exprimiert wird. Die Faktoren des SASP gelangen hierbei auf parakrinem Weg zu den duktalem Zellen des Pankreas, um dort durch Bindung an den ebenfalls NF- κ B-abhängig synthetisierten CXCR2-Rezeptor den Übergang der Zellen in Seneszenz auszulösen. Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CXCR2 nicht nur rein tumorsuppressiv wirkt. Durch Inaktivierung von Trp53 kommt es zu einer Störung des CXCR2 Signalwegs, wodurch der Übergang in Seneszenz gestört wird. Infolge dessen tritt die kanzerogene Wirkung der Faktoren des SASPs in den Vordergrund.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms.....	15
Abbildung 2	Onkogen induzierte-Seneszenz.....	21
Abbildung 3	Erzeugung von Knockout-Mäusen	25
Abbildung 4	Versuchstiere	27
Abbildung 5	Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien	27-31
Abbildung 6	Zusammenfassung der verwendeten Kits.....	32
Abbildung 7	Zusammenfassung der Oligonukleotide	32
Abbildung 8	Zusammenfassung der quantitativen Real-Time-PCR Primer	33
Abbildung 9	Zusammensetzung der Puffer/Lösungen.....	33-35
Abbildung 10	Zusammenfassung der verwendeten Gebrauchswaren	35-36
Abbildung 11	Zusammenfassung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel....	36-38
Abbildung 12	Zusammenfassung der verwendeten Primärantikörper.....	43
Abbildung 13	Zusammenfassung der verwendeten Sekundärantikörper	43
Abbildung 14	Reaktionsansatz der PCR.....	45
Abbildung 15	Reaktionsansatz der quantitativen Real-Time-PCR.....	48
Abbildung 16	Mauslinien	51
Abbildung 17	RelA-Mangel senkt die Überlebenschance in $Kras^{G12D}$ -Mäusen.....	53
Abbildung 18	Paradoxe Weise zeigen CKPA-Mäuse eine bessere Prognose als CKP-Mäuse.....	53
Abbildung 19	RelA-Mangel gefährdet Onkogen-induzierte Seneszenz	54
Abbildung 20	Paradoxe Differenz zwischen Gewebemorphologie und Genexpression.....	56
Abbildung 21	Pankreatische Azini als Hauptsyntheseort der Faktoren des SASP	58
Abbildung 22	NF- κ B/RelA-abhängige Expression von CXCR2.....	59
Abbildung 23	Immunhistochemische CXCR2-Färbung von CK- und CKA-Mäusen.....	60
Abbildung 24	Schematische Darstellung des SB225002 Behandlungsplans der CK-Mäuse	60

Abbildung 25	CXCR2 ist essentiell für den Übergang in Seneszenz	61
Abbildung 26	Die tumorsuppressive Wirkung von CXCR2	62
Abbildung 27	Immunhistochemische CXCR2-Färbung von menschlichem Pankreasadenokarzinom-Gewebe	63
Abbildung 28	Eine niedrige CXCR2 Expression korreliert mit einer schlechten Prognose.....	64

Literaturverzeichnis

- Acosta, J. C. and J. Gil (2009). "A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer?" Cancer Research **69**(6): 2167-2170.
- Acosta, J. C. and J. Gil (2012). "Senescence: a new weapon for cancer therapy." Trends Cell Biology **22**(4): 211-219.
- Acosta, J. C., A. O'Loghlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando and J. Gil (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." Cell **133**(6): 1006-1018.
- Adams, P. D. (2009). "Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence." Molecular Cell **36**(1): 2-14.
- Algül, H., G. Adler and R. Schmid (2002). "NF- κ B/Rel transcriptional pathway." International Journal of Gastrointestinal Cancer **31**(1): 71-78.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim and M. Perucho (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." Cell **53**(4): 549-554.
- Arslan, A. A., K. J. Helzlsouer, C. Kooperberg, X. O. Shu, E. Steplowski, H. B. Bueno-de-Mesquita, C. S. Fuchs, M. D. Gross, E. J. Jacobs, A. Z. Lacroix, G. M. Petersen, R. Z. Stolzenberg-Solomon, W. Zheng, D. Albanes, L. Amundadottir, W. R. Bamlet, A. Barricarte, S. A. Bingham, H. Boeing, M. C. Boutron-Ruault, J. E. Buring, S. J. Chanock, S. Clipp, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, S. E. Hankinson, P. Hartge, R. N. Hoover, D. J. Hunter, A. Hutchinson, K. B. Jacobs, P. Kraft, S. M. Lynch, J. Manjer, J. E. Manson, A. McTiernan, R. R. McWilliams, J. B. Mendelsohn, D. S. Michaud, D. Palli, T. E. Rohan, N. Slimani, G. Thomas, A. Tjonneland, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, J. Virtamo, B. M. Wolpin, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte and A. V. Patel (2010). "Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan)." Archives of internal medicine **170**(9): 791-802.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." The international journal of biochemistry & cell biology **37**(5): 961-976.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.
- Brat, D. J., K. D. Lillemoe, C. J. Yeo, P. B. Warfield and R. H. Hruban (1998). "Progression of pancreatic intraneoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas." The American journal of surgical pathology **22**(2): 163-169.
- Caldwell, M. E., G. M. DeNicola, C. P. Martins, M. A. Jacobetz, A. Maitra, R. H. Hruban and D. A. Tuveson (2012). "Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer." Oncogene **31**(12): 1599-1608.

- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nature reviews. Molecular cell biology **8**(9): 729-740.
- Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, P. Premririt, W. Luo, A. Chicas, C. S. Lee, S. C. Kogan and S. W. Lowe (2011). "Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity." Genes & Development **25**(20): 2125-2136.
- Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-233.
- Collins, M. A., F. Bednar, Y. Zhang, J. C. Brisset, S. Galban, C. J. Galban, S. Rakshit, K. S. Flannagan, N. V. Adsay and M. Pasca di Magliano (2012). "Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice." The Journal of Clinical Investigation **122**(2): 639-653.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, A. Krtolica, C. M. Beausejour, S. Parrinello, J. G. Hodgson, K. Chin, P. Y. Desprez and J. Campisi (2010). "A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen." PLoS One **5**(2): e9188.
- Feldmann, G., R. Beaty, R. H. Hruban and A. Maitra (2007). "Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia." Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery **14**(3): 224-232.
- Freund, A., C. K. Patil and J. Campisi (2011). "p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype." The EMBO Journal **30**(8): 1536-1548.
- Frohman, M. A. and G. R. Martin (1989). "Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice." Cell **56**(2): 145-147.
- Gosselin, K. and C. Abbadie (2003). "Involvement of Rel/NF- κ B transcription factors in senescence." Experimental Gerontology **38**(11-12): 1271-1283.
- Grippo, P. J., P. S. Nowlin, M. J. Demeure, D. S. Longnecker and E. P. Sandgren (2003). "Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice." Cancer research **63**(9): 2016-2019.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Experimental cell research **37**: 614-636.
- Herold G., "Pankreaskarzinom", in: Innere Medizin, Herold, G. (Hrsg.), Köln, 2012: 497-498.
- 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 (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." Cancer Cell **4**(6): 437-450.
- Holstege A., Pausch J., Rösch W., "Leber, Galle, Pankreas", in: Innere Medizin, Bob A., Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012, 3. Auflage: 664-666.

- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." The American journal of surgical pathology **25**(5): 579-586.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons and S. E. Kern (2000). "Progression model for pancreatic cancer." Clinical Cancer Research **6**(8): 2969-2972.
- Hruban, R. H., A. Maitra, R. Schulick, D. Laheru, J. Herman, S. E. Kern and M. Goggins (2008). "Emerging molecular biology of pancreatic cancer." Gastrointestinal cancer research **2**(4 Suppl): 10-15.
- Hruban, R. H., A. D. van Mansfeld, G. J. Offerhaus, D. H. van Weering, D. C. Allison, S. N. Goodman, T. W. Kensler, K. K. Bose, J. L. Cameron and J. L. Bos (1993). "K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization." The American journal of pathology **143**(2): 545-554.
- Ijichi, H., A. Chytil, A. E. Gorska, M. E. Aakre, B. Bierie, M. Tada, D. Mohri, K. Miyabayashi, Y. Asaoka, S. Maeda, T. Ikenoue, K. Tateishi, C. V. Wright, K. Koike, M. Omata and H. L. Moses (2011). "Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma." The Journal of Clinical Investigation **121**(10): 4106-4117.
- Iodice, S., S. Gandini, P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2008). "Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis." Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie **393**(4): 535-545.
- Izeradjene, K., C. Combs, M. Best, A. Gopinathan, A. Wagner, W. M. Grady, C. X. Deng, R. H. Hruban, N. V. Adsay, D. A. Tuveson and S. R. Hingorani (2007). "Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas." Cancer Cell **11**(3): 229-243.
- Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Krebsinformationsdienstes, Deutsches Krebsforschungszentrum, "Bauchspeicheldrüse" in: Krebs in Deutschland 2007/2008, Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin, 2012, 8. Auflage: 48-52.
- Kalff, J., Rudolph, J., "Pankreas, Milz und Omentum majus", in: Chirurgie, Hirner, A., Wiese, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, 2. Auflage: 560-573.
- Kennedy, A. L., P. D. Adams and J. P. Morton (2011). "Ras, PI3K/Akt and senescence: Paradoxes provide clues for pancreatic cancer therapy." Small Gtpases **2**(5): 264-267.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell **133**(6): 1019-1031.

- Larsson, L. G. (2011). "Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence." Seminars in cancer biology **21**(6): 367-376.
- Maitra, A. and R. H. Hruban (2008). "Pancreatic cancer." Annual review of pathology **3**: 157-188.
- Matsuo, Y., M. Raimondo, T. A. Woodward, M. B. Wallace, K. R. Gill, Z. Tong, M. D. Burdick, Z. Yang, R. M. Strieter, R. M. Hoffman and S. Guha (2009). "CXCL12/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer." International Journal of Cancer **125**(5): 1027-1037.
- Morton, J. P., P. Timpson, S. A. Karim, R. A. Ridgway, D. Athineos, B. Doyle, N. B. Jamieson, K. A. Oien, A. M. Lowy, V. G. Brunton, M. C. Frame, T. R. Evans and O. J. Sansom (2010). "Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States **107**(1): 246-251.
- Pfaffl, W. M. (2004). "Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung" Biospektrum: 92-95.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2009). "Epidemiology of pancreatic cancer: an overview." Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology **6**(12): 699-708.
- Rayet, B. and C. Gelinas (1999). "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer." Oncogene **18**(49): 6938-6947.
- Resor, L., T. J. Bowen and A. Wynshaw-Boris (2001). "Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis." Human Molecular Genetics **10**(7): 669-675.
- Romagosa, C., S. Simonetti, L. Lopez-Vicente, A. Mazo, M. E. Lleonart, J. Castellvi and S. Ramon y Cajal (2011). "p16^{Ink4a} overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors." Oncogene **30**(18): 2087-2097.
- Rovillain, E., L. Mansfield, C. Caetano, M. Alvarez-Fernandez, O. L. Caballero, R. H. Medema, H. Hummerich and P. S. Jat (2011). "Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence." Oncogene **30**(20): 2356-2366.
- Ruan, J. W., Y. C. Liao, I. Lua, M. H. Li, C. Y. Hsu and J. H. Chen (2012). "Human pituitary tumor-transforming gene 1 overexpression reinforces oncogene-induced senescence through CXCR2/p21 signaling in breast cancer cells." Breast Cancer Research **14**(4): R106.
- Salminen, A., A. Kauppinen and K. Kaarniranta (2012). "Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)." Cell Signalling **24**(4): 835-845.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappaB by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-928.

- Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}." Cell **88**(5): 593-602.
- Sethi, G., B. Sung and B. B. Aggarwal (2008). "Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside." Experimental Biology and Medicine (Maywood) **233**(1): 21-31.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley and A. Jemal (2011). "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." CA: A Cancer Journal for Clinicians **61**(4): 212-236.
- Siveke, J. T. and R. M. Schmid (2005). "Chromosomal instability in mouse metastatic pancreatic cancer--it's Kras and Tp53 after all." Cancer Cell **7**(5): 405-407.
- Smogorzewska, A. and T. de Lange (2002). "Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells." The EMBO Journal **21**(16): 4338-4348.
- Tramacere, I., L. Scotti, M. Jenab, V. Bagnardi, R. Bellocco, M. Rota, G. Corrao, F. Bravi, P. Boffetta and C. La Vecchia (2010). "Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation." International Journal of Cancer **126**(6): 1474-1486.
- Wang, W., J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, L. Larry, K. R. Cleary and P. J. Chiao (1999). "The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells." Clinical Cancer Research **5**(1): 119-127.

Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst Herrn Prof. Dr. med. Roland M. Schmid, Leiter der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hana Algül danke ich besonders für die Stellung des Themas der Arbeit, die hervorragende und angenehme Betreuung und Anleitung sowie für seine stetige Hilfsbereitschaft. Ich danke ihm auch herzlich für sein nachhaltiges Engagement mich fachlich anzuleiten.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Marina Lesina und Frau Karen Dlubatz gilt mein ausdrücklicher Dank für die zahlreichen Anregungen und die hilfsbereite und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern, meinem Partner, meiner Großmutter und meinen Geschwistern möchte ich mich besonders herzlich für die liebevolle und wichtige Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Sie war stets Grundlage für meine Motivation und mein Vorankommen.