

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. R. M. Schmid)

Die Funktion von NF- κ B/RelA in der pankreatischen Onkogenese: Analyse im *Kras^{G12D} in vivo* Modell

Olga Korneeva

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. H. Algül

2. Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 04.06.2018 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.05.2019
angenommen.

Eigene Veröffentlichungen:

1. Lesina, M., Wörmann, S. M., Morton, J., Diakopoulos, K. N., **Korneeva, O.**, Wimmer, M., Einwächter, H., Sperveslage, J., Demir, I. E., Kehl, T., Saur, D., Sipos, B., Heikenwälder, M., Steiner, J. M., Wang, T. C., Sansom, O. J., Schmid, R. M., Algül, H. (2016). RelA regulates CXCL1/CXCR2-dependent oncogene-induced senescence in murine Kras-driven pancreatic carcinogenesis. *J Clin Invest.* 26(8), 2919-2932.

2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 16.-19. September 2015, Leipzig
„NF- κ B/RelA hemmt die pankreatische Onkogenese durch Induktion onkogen-induzierter Seneszenz und Modulation von Tumorenvironment“
Lesina M., Wörmann S., Diakopoulos K. N., **Korneeva O.**, Einwächter H., Sperveslage, J., Heikenälder, M., Schmid, R. M., Algül, H.

3. 33. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub 22.-24. November 2012, Leipzig
„NF- κ B/RelA abhängige Interaktion zwischen azinären und duktaalen Zellen hemmt die pankreatische Onkogenese durch Induktion von Seneszenz“
Lesina M., Wörmann S., **Korneeva O.**, Riemann M., Neuhöfer P., Wimmer M., Diersch S., Henrich A., Einwächter H., Sperveslage J., Demir I. E., Kehl T., Saur D., Sipos B., Weih F., Schneider G., Schmid R. M., Algül H.

1. Einleitung	5
1.1 Das Pankreaskarzinom	5
1.1.1 Epidemiologische Daten	5
1.1.2 Klinische und morphologische Aspekte des Tumors	5
1.1.3 Diagnose und Therapie	6
1.1.4 Molekulargenetische Aspekte	7
1.2 Relevante Signalwege in der pankreatischen Onkogenese	10
1.2.1 Der NF- κ B/Rel-Signalweg	11
1.2.2 Der ERK/MAPK-Signalweg	13
1.2.3 Der PI3K/AKT-Signalweg	14
1.2.4 Wachstumsfaktoren	14
1.2.5 Der NOTCH-Signalweg	15
1.2.6 Der Stat3-Signalweg	16
1.3 Murine Modelle für Pankreaskarzinom	16
1.3.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem	17
1.3.2 <i>Kras</i> ^{G12D} -Mausmodell für Pankreaskarzinom	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien und Materialien	21
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel	23
2.1.3 Puffer und Lösungen	24
2.1.4 Enzyme, Kits, PCR-Primer, Antikörper	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 DNA-Analysen	28
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Mausgewebe	28
2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.1.3 Amplifikation von DNA und Polymerase-Kettenreaktion	28
2.2.2 Isolierung von RNA aus Mauspankreas	30
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.3.1 Isolierung von Proteinen aus Mausgewebe	30
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	30
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	31
2.2.3.4 Western Blot Analyse	32
2.2.4 Immunhistochemie	33
2.2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte	33
2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.2.4.3 Immunhistochemische Färbemethoden	33
2.2.5 Zellkultur	34
3. Ergebnisse	36
3.1 <i>In vivo</i> Analyse der Rolle von RelA/p65 in der <i>Kras</i>^{G12D}-induzierten Karzinogenese des Pankreas	36
3.1.1 Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 im <i>Kras</i> ^{G12D} -Mausmodell	36
3.1.2 Makroskopische Analyse RelA/p65 defizienter <i>Kras</i> ^{G12D} -Mäuse	41
3.1.3 Untersuchungen zur Proliferation im Pankreas der <i>Kras</i> ^{G12D} -Mauslinie mit pankreasspezifischer Inaktivierung von RelA/p65	41
3.1.4 Einfluss der Deletion von RelA/p65 auf die PanIN-Progression im <i>Kras</i> ^{G12D} -Mausmodell	43

3.1.5 Einfluss von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorzinzidenz und Morphologie in der <i>Kras^{G12D}</i> -Mauslinie.....	46
3.2 <i>In vitro</i> Analyse der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 in der <i>Kras^{G12D}</i>-induzierten Karzinogenese des Pankreas.....	49
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	50
4. Diskussion	51
4.1 <i>Kras^{G12D}</i>-Mausmodell – ausgezeichnete Basis in der Erforschung des NF-κB/Rel Signalwegs im Pankreaskarzinom.....	51
4.2 Rolle der transkriptionell relevanten Komponente des NF-κB/Rel Signalweges RelA/p65 in der pankreatischen Onkogenese	52
4.2.1 Microenvironment: Interaktion der Tumorzelle mit dem Stroma	55
4.2.2 Rolle von Onkogen-induzierter Seneszenz im Pankreaskarzinom.....	56
5. Zusammenfassung.....	59
6. Literaturverzeichnis	63
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	71
8. Abkürzungsverzeichnis	72
9. Danksagung	76

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologische Daten

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Neubildung der Bauchspeicheldrüse. 2012 erkrankten deutschlandweit etwa 16 700 Menschen am duktalem Pankreaskarzinom (www.gekid.de). Das sind zwar nur etwa 3 % aller Krebserkrankungen des Landes, aber gleichzeitig ist das Pankreaskarzinom für ca. 6 % der Krebstodesfälle im Jahr verantwortlich. Es ist nach Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes und die fünfthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen in der westlichen Welt (Herold 2015). Die Krankheit tritt meist erst im höheren Lebensalter auf. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 70. und dem 75. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind.

1.1.2 Klinische und morphologische Aspekte des Tumors

Die genauen Ursachen des Pankreaskarzinoms sind unbekannt. Neben der genetischen Disposition sind Zigarettenrauchen, Übergewicht und chronische Pankreatitis die einzig gut belegten Risikofaktoren für das sporadische Pankreaskarzinom (Hart et al., 2008). Weitere potentielle Risikofaktoren wie chronischer Alkoholkonsum, Diabetes mellitus Typ 2 und ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, werden zurzeit noch kontrovers diskutiert. Einige genetische Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, das FAMMM-Syndrom („familial atypical multiple mole melanoma“), das hereditäre Mammakarzinom und das HNPCC-Syndrom gehen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms einher (Hezel et al., 2006; Wilentz et al., 2000).

Das Pankreaskarzinom hat unter allen gastrointestinalen Tumoren die schlechteste Prognose. Diese hat sich in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland für Männer bei 8 % und für Frauen bei 7 % (<http://www.rki.de>). Damit haben Patienten mit Pankreaskarzinom im Vergleich zu anderen malignen Neoplasien die kürzeste Lebenserwartung aller malignen Neoplasien. Durch das Fehlen von Frühsymptomen und ihrer

unspezifischen Klinik (Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Oberbauchbeschwerden, Übelkeit, Ikterus, Begleitpankreatitis) wird die Erkrankung meist sehr spät bemerkt. Auch wird eine frühe Infiltration des umliegenden Gewebes durch die anatomisch enge Lagebeziehung des Pankreas zu Gefäß-, Lymph- und Nervenbahnen begünstigt. Diese Umstände schließen die Möglichkeit einer kurativen Behandlung meist aus. Häufige Lokalisation der möglichen Metastasen sind die umliegenden Lymphknoten und die Leber, seltener auch die Lunge, der Knochen und das Gehirn (Lee et al., 1984).

95 % der Pankreaskarzinome entstehen im exokrinen Anteil des Pankreas, von denen 75 – 92 % duktale Adenokarzinome (PDAC = pancreatic ductal adenocarcinoma) darstellen. Im Folgenden soll nur auf diese Form des Pankreaskarzinoms eingegangen werden.

Das PDAC ist gekennzeichnet durch ein dichtes Stroma aus Fibroblasten und inflammatorischen Zellen, welches man auch als Desmoplasie bezeichnet. Das feingewebliche Wachstumsmuster zeigt einen glandulären Charakter mit gangähnlichen Strukturen. Morphologisch sind die meisten dukталen Adenokarzinome gut differenziert und sind in bis zu 70 % der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert.

1.1.3 Diagnose und Therapie

Bedingt durch die retroperitoneale Lage im Bauchraum ist das Pankreas für Screening- und diagnostische Untersuchungen schwer zugänglich. Abgesehen von Anamnese und körperlicher Untersuchung gehören Ultraschall, Endosonographie sowie Spiral-Computertomographie und Kernspintomographie des Abdomens zu den wichtigsten diagnostischen Maßnahmen bei Verdacht auf Pankreaskarzinom. Da ein Großteil der PDAC sich im Pankreaskopf bildet, ist der Nachweis des Gallen- und Pankreasgangverschlusses mit der ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) oft wegweisend. Der Tumormarker CA 19-9 und das unspezifische CEA haben richtungsweisende Bedeutung oder geben im Einzelfall Auskunft über den Erfolg der Behandlung, ermöglichen aber keine Diagnosestellung (Boeck et al., 2006).

Die einzige potenziell kurative Therapieoption besteht in der chirurgischen Resektion des Tumorgewebes, wobei diese nur bei 15 – 20 % aller Patienten möglich ist

(Conlon et al., 1996; Trede et al., 2001; Erbar, 2002). Die chirurgische Therapie wird in der klinischen Praxis oft von einer adjuvanten Chemotherapie begleitet. Die multimodalen Therapiestrategien sind prinzipiell sinnvoll, um das Langzeitüberleben zu verbessern. Voraussetzung für eine adjuvante bzw. additive Chemotherapie ist die kurativ intendierte Pankreasresektion (R0/R1).

Nach der R0-Resektion ohne Vorliegen von Fernmetastasen konnte in drei randomisierten Studien und in einer Metaanalyse ein Vorteil im krankheitsfreien Überleben durch adjuvante Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chirurgie, gezeigt werden. Das 5-Jahresüberleben lag bei randomisierten Studien nach adjuvanter Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU bei ca. 20 %, während es mit alleiniger Chirurgie bei ca. 10 % lag. Ferner kann mit Hilfe einer neoadjuvanten Strahlenchemotherapie oder Chemotherapie bei primär nicht resektablen exokrinen Pankreaskarzinomen in einigen Fällen eine Resektabilität erreicht werden. Bei Patienten mit einem nicht operablen Pankreastumor ist derzeit die Therapie mit dem Zytostatikum Gemcitabin als Standard etabliert (http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032010OLI_S3_Exokrines_Pankreaskarzinom_21112013.pdf). Unter palliative Therapiemöglichkeiten fallen die Strahlentherapien, Schmerzbekämpfung, Eingriffe wie biliodigestive Anastomosen oder endoskopische Stenteinlagen in den Ductus choledochus bei Cholestase.

Obwohl Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie in den letzten Jahren nachvollziehbare Fortschritte gemacht haben, kann die Auswirkung auf das Überleben der Patienten nur als begrenzt bezeichnet werden (Glimelius et al., 1996). Die Hauptursachen davon sind die erschwerte Diagnostik und die weitgehende Resistenz des PDAC gegen alle gängigen Formen der Radio- und der Chemotherapie. Neue Therapieoptionen auf molekularer Ebene sind vielversprechend, haben sich allerdings noch nicht bewährt.

1.1.4 Molekulargenetische Aspekte

Die Progression solider Tumore verläuft in vielen Organen über eine Reihe prämaligener Vorstufen, die mit genetischen Veränderungen der Zelle einhergehen. Diese genetischen Alterationen führen u.a. zur Aktivierung von Onkogenen, die die Tumorentstehung und die Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die unkontrolliertes Zellwachstum hemmen, unterstützen. Ein Karzinom würde aber erst

dann entstehen, wenn mehrere Mechanismen betroffen sind (Vogelstein et al., 1993).

Eine „Ursprungszelle“ des Pankreaskarzinoms ist noch nicht klar definiert. Die duktale Morphologie des PDAC führte zu der Annahme, dass duktale Zellen der Ursprung der malignen Alteration seien. Ebenfalls kontrovers diskutiert wird, ob das PDAC nicht von den endokrinen oder zentroazinären Zellen ausgeht (Shi et al., 2008). Vermutet wird der Ursprung in den Azinuszellen, den dukталen Zellen oder auch den zentroazinären Zellen des Pankreas. Darüber hinaus wurden bisher drei verschiedene duktale neoplastische Läsionen beschrieben: PanIN (pankreatische intraepitheliale Neoplasie), MCN (muzinöse zystische Neoplasie) und IPMN (intraduktales papilläres muzinöses Neoplasie). Diese Vorläuferläsionen sind sehr wahrscheinlich die Variationen derselben malignen Transformation, die zum PDAC führt (Hezel et al., 2006). Die ersten morphologischen Hinweise auf ein Tumorprogressionsmodell für das Pankreaskarzinom gab es bereits im Jahr 1954 (Sommers et al., 1954). Ähnlich der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms wurde auch für das PDAC ein Progressionsmodell definiert. Im Jahr 2000 wurde ein allgemeines Nomenklatorsystem für Vorläuferläsionen des invasiven Pankreaskarzinoms (PanINs) eingeführt (Hruban et al., 2000, 2001).

Im Folgenden soll dieses Tumorprogressionsmodell vorgestellt werden: ein normales duktales Epithel zeichnet sich durch kuboidale Zellen mit runden, basal liegenden, gleichförmigen Zellkernen aus (Abbildung 1A, B). PanIN-1 ist eine Epithelläsion aus Zylinderepithel mit basalliegender runden Zellkern und reichlich supranukleär gelegenen muzinhaltigen Zytoplasma. Kernatypien sind hier noch keine zu finden. Die Läsionen zeigen entweder flaches (PanIN-1A) oder papilläres (PanIN-1B) Epithel. PanIN-2 beschreibt eine Epithelläsion, deren Kerne leichtgradige Atypien wie Kerngrößenschwankungen, Verlust der Polarität und Hyperchromasie aufweisen. PanIN-3-Läsionen sind durch schwere Zellatypien und papilläres Wachstum mit Bildung von kleinen Epithelzellnestern im Lumen und luminales Nekrosen charakterisiert (Maitra et al., 2003; Hruban et al., 2006). Dysplastische Stadien (PanIN-2 und PanIN-3) werden also immer von Zellkernveränderung (Atypie) begleitet, wobei das PanIN-3-Stadium bereits einem intraepithelialen Tumor (Carcinoma in situ) entspricht (Wilentz et al., 2000).

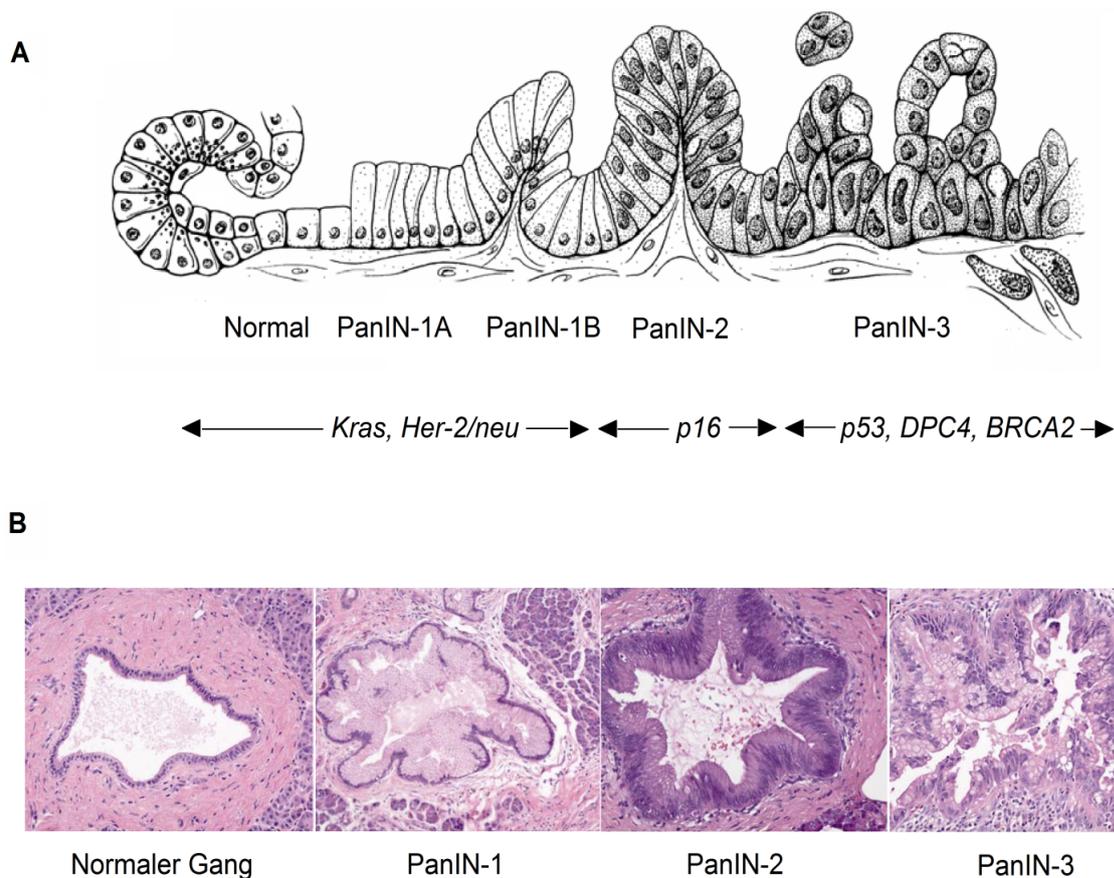


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms (modifiziert nach Hruban et al., 2008)

A: Schematische Darstellung des normalen Gangepithels sowie der einzelnen PanIN-Stadien. Genetische Veränderungen und das Stadium ihres Auftretens im Verlauf der Pankreaskarzinomentstehung.

B: Histopathologische Darstellung des Progressionsmodells von normalen Gängen bis zu pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) mit sowohl architektonischen und zellulären Atypien: die Zellkerne der PanIN-1 gleichmäßig und basal; die Kerne der PanIN-2 größer, basophiler und mit Verlust ihrer nukleären Polarität; Kernpolymorphie des PanIN-3-Stadiums.

Es sind in den letzten Jahren die häufigsten charakteristischen molekulargenetischen Veränderungen für PanINs und für das Pankreaskarzinom identifiziert worden. Die parallele Entwicklung von morphologischen und genetischen Aberrationen unterstützt das vorgeschlagene Progressionsmodell (Abbildung 1A). In PanIN-1-Läsionen findet man bereits die aktivierende Mutation des *Kras*-Onkogens, die in über 90 % aller duktaalen Pankreaskarzinome zu finden ist (Moskaluk et al., 1997).

Kras ist ein Mitglied der Ras-Genfamilie und kodiert für ein membrangebundenes 21 kD großes Protein, das Signale in die Zelle transduziert und mehrere physiologische Prozesse reguliert. Das *Kras*-Protein verfügt über eine GTPase-Aktivität. Durch die *Kras*-Gen-Mutation, v.a. im Kodon 12 (Austausch von Glycin

gegen Aspartat (G12D) im kodierten Protein), seltener auch in Kodon 13 und 61, scheint das Protein diese GTPase-Aktivität zu verlieren und dadurch auch die Fähigkeit der Selbstdeaktivierung. Die Folge ist eine kontinuierliche Stimulation verschiedener Signalwege mit einer Reihe von zellulären Effekten, u.a. die Induktion der DNA-Synthese und Proliferation.

Die *Kras*-Mutation ist ein früheres Ereignis in der Entstehung des Pankreaskarzinoms. Die Mutationsrate steigt mit fortschreitender Dysplasie, so dass nahezu alle duktales Pankreaskarzinome durch eine Mutation in *Kras* gekennzeichnet sind (Schneider and Schmid, 2003). Trotz der hohen Prävalenz der Mutation beim Pankreaskarzinom scheint *Kras* als Marker zur Diagnostik ungeeignet, da es sich auch im unveränderten Pankreasepithel (19-38 %) und in Gewebe mit chronischer Pankreatitis nachweisen lässt (Rivera et al., 1997; Berger et al., 1999).

Eine Inaktivierung des Tumorsuppressors *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, Synonym zu *p16INK*, abgekürzt *p16*) tritt häufiger in höhergradigen, stark dysplastischen Läsionen auf. Normale duktales Pankreaszellen zeigen dagegen keine *p16INK*-Mutationen (Yamano et al., 2000). Mutationen von *p16INK* verkürzen die Lebenszeit von Patienten mit Pankreaskarzinom signifikant und sind bei der chronischen Pankreatitis extrem selten nachweisbar (Gerdes et al., 2001).

Der Verlust der Tumorsuppressorgene *p53*, *DPC4* („*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*“, auch *SMAD4* genannt) und *BRCA2* werden erst spät in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms (PanIN-3) detektiert (Almoguera et al., 1988; Caldas et al., 1994; Hruban et al., 2000; Maitra et al., 2003). Somit sind die Aktivierung des *Kras*-Onkogens und der Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene *p16*, *p53*, *DPC4* sowie *BRCA2* charakteristische genetische Veränderungen des Pankreaskarzinoms und dessen Vorstufen.

1.2 Relevante Signalwege in der pankreatischen Onkogenese

Die Entstehung jedes Tumors beruht auf veränderten Eigenschaften, Aktivitäten und intrazellulären Konzentrationen von Onko- und Tumorsuppressorproteinen. Es sind nicht die einzelnen Proteine als solche, sondern deren biochemische Interaktionen und signalweiterleitende Verbindungen, die an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligt sind. Diese Veränderungen spiegeln sich in einer Reihe von Signalwegen wieder. In der pankreatischen Onkogenese sind mehrere

Zellsignalwege kürzlich definiert worden, die eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie des Tumors spielen scheinen (Jones et al., 2008). Unter anderem die durch pankreasspezifisches aktivierendes Kras-Protein induzierten Signalwege, wie der NF- κ B-, der ERK/MAPK- und der PI₃K-Signalweg. Diese und weitere relevante Signalwege sowie ihre Mediatoren werden im Folgenden dargestellt.

1.2.1 Der NF- κ B/Rel-Signalweg

Der NF- κ B/Rel-Signalweg spielt eine ausschlaggebende Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Gastrointestinaltraktes (Eckmann et al., 2008). Seine Beteiligung in der Regulation verschiedener biologischer Prozesse, wie Apoptose, Nekrose, Proliferation sowie die Steuerung proinflammatorischer Chemokine, Zytokine und Adhäsionsproteine heben die große biologische Bedeutung hervor (Karin, 2008).

Endpunkt der Signalkaskade ist der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor NF- κ B/Rel. NF- κ B (Nuclear Factor kappaB) wurde anfangs als B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben. Später wurde deutlich, dass die Aktivität von NF- κ B in allen Zellarten induzierbar ist (Bonizzi and Karin, 2004; Hayden and Ghosh, 2008).

In Säugerzellen umfasst die NF- κ B-Familie fünf Mitglieder. Diese sind NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB und c-Rel (Rel: Retikuloendotheliale Lymphomatose). Sie bilden untereinander verschiedene Homo- und Heterodimere mit unterschiedlicher Wirkung auf die Transkription (Karin, 2006).

Man unterscheidet zwei Wege der NF- κ B/Rel-Aktivierung – den klassischen und den alternativen Signalweg (Abbildung 2). Der klassische Weg wird hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1 β) und Pathogene aktiviert. NF- κ B-Dimere liegen im Zytoplasma an I κ B-Proteine (I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ) gebunden. In dieser Form sind sie inaktiv. Im Zentrum der Regulation des NF- κ B-Signalweges steht der IKK-Komplex (IK-Kinasenkomplex), der nach Bindung von Liganden aktiviert wird. Durch weitere Phosphorylierung und proteasomalen Abbau von I κ B-Proteinen werden NF- κ B-Dimere freigesetzt (im klassischen Weg überwiegend p50/RelA-Dimere). Diese gelangen in den Zellkern und regulieren nach Bindung an DNA die Transkription eigener Zielgene. Dazu gehört auch I κ B α , welches nach

Neusynthese in den Nukleus wandert, NF- κ B von der DNA ablöst und zurück ins Zytoplasma überführt. Durch diese negative Rückkopplung reguliert NF- κ B seine eigene Aktivität (Hoffmann et al., 2006). Der alternative Weg besteht aus der NIK- (NF- κ B-induzierende Kinase) und IKK α -abhängigen NF- κ B2-Aktivierung sowie der nuklearen Translokation eines p52/RelB-Dimers (Hamacher et al., 2008).

Die Zielgene des Heterodimers RelA/p65 und NF- κ B1/p50 sind für die Regulation der Immunantwort sowie für Stress- und entzündliche Reaktionen zuständig. Einerseits ist die Signalübertragung durch Botenstoffe wie Chemokine und Zytokine, die durch NF- κ B aktiviert werden, ein essentieller Faktor bei der Immunantwort. Andererseits spielt NF- κ B bei der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle. Es reguliert sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse, zellulär kommt es meistens zur Hemmung der Apoptose. Da NF- κ B die gesunden Immunzellen vor Apoptose im entzündlichen Gewebe bewahrt, kann die Überaktivierung des Signalweges zur unkontrollierten Zellvermehrung und dadurch zur Tumorentstehung führen (Greten et al., 2004). Tatsächlich ist der NF- κ B-Weg in vielen Karzinomen, u.a. auch im duktalem Pankreaskarzinom, konstitutiv aktiv. Dabei werden mehrere proliferative und antiapoptotische Mechanismen beeinflusst (Rayet and Gelinas, 1999). Darüber hinaus scheint eine konstitutive NF- κ B/Rel-(RelA)-Aktivierung im Rahmen einer *Ras*-Mutation im PDAC erforderlich zu sein (Wang et al., 1999, Arsur et al., 2000).

Ausgehend von diesen Informationen entstanden in den letzten Jahren Bemühungen zur Evaluation dieses Signalweges auch im Zusammenspiel mit anderen molekularen Signalwegen in der pankreatischen Onkogenese.

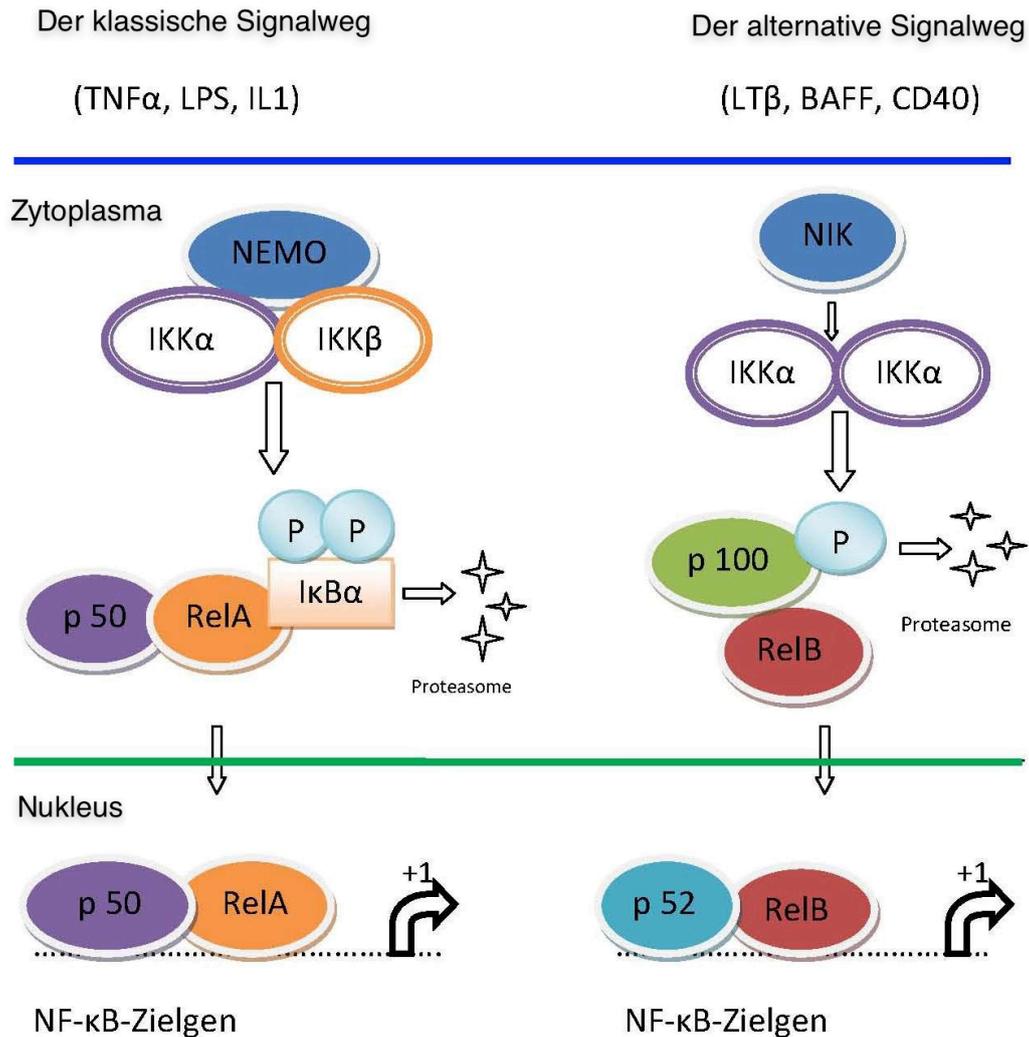


Abbildung 2: Zwei Wege der NF- κ B-Aktivierung (modifiziert nach Hamacher et al., 2008)

1.2.2 Der ERK/MAPK-Signalweg

Der ERK/MAPK („*extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*“)-Signalweg ist ein wichtiger und gut untersuchter Signalweg. Er beinhaltet die Aktivierung von Ras-, Raf-Proteinen und MAP-Kinasen (MAPK).

Die Bindung eines Liganden (z.B. Wachstumsfaktoren) an eine Rezeptor-Tyrosinkinase bewirkt deren Dimerisierung, welche die Autophosphorylierung des Rezeptors zur Folge hat. Der phosphorylierte Rezeptor dient nun als Andockstelle für das zytosolische Adapterprotein GRB2, welches wiederum mit Ras-GEF SOS (Son Of Sevenless) verbunden ist. SOS aktiviert nun Ras, indem GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Aktiviertes Ras-GTP kann nun das Effektorprotein Raf-Kinase

binden und aktivieren. Die B-Raf-Kinase phosphoryliert und aktiviert die Kinasen MEK 1 und 2 (MAP Kinase-ERK-Kinase), und diese wiederum aktivieren die Kinasen ERK 1 und 2 (Extrazellulär regulierte MAP-Kinase). Aktiviertes ERK gelangt in den Zellkern und kann hier durch Phosphorylierung eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktivieren (Kolch, 2000).

Dadurch werden mehrere Mechanismen wie Proliferation, Überleben und Differenzierung über c-Fos, c-Myc und Cyclin D1 reguliert.

1.2.3 Der PI3K/AKT-Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalweg überwacht wichtige Prozesse der Onkogenese wie Proliferation und Zellüberleben und wird durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK), G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPKR) oder onkogenes Kras aktiviert. PI3K (Phosphoinositidase 3-Kinase) vermittelt den Übergang von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ($PI(3,4,5)P_3$). Der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert im Chromosom 10) kann diese Reaktion wieder aufheben.

AKT ist eine Serin/Threonin-Kinase, die einer Proteinkinase B entspricht. AKT ist ein Protoonkogen. Es wandert zur Zellmembran und interagiert mit $PI(3,4,5)P_3$. Dabei wird AKT von mehreren Kinasen phosphoryliert und aktiviert. Aktiviertes AKT kontrolliert den G1-S-Phasen Übergang und sorgt seinerseits für Zellproliferation, Zellüberleben etc. Es ist bekannt, dass der PI3K/AKT Signalweg in PDAC Zellen konstitutiv aktiviert ist. Die molekularen Mechanismen dieser Aktivierung sind bisher noch unklar. Daneben zählen die Transkriptionsfaktoren c-Myc und NF- κ B im Pankreaskarzinom zu den wichtigen Zielstrukturen stromabwärts des PI3K-Signalwegs (Liptay et al., 2003; Asano et al., 2004). Darüber hinaus scheint die pharmakologische Hemmung der PI3K die Empfindlichkeit der PDAC-Zelllinien gegenüber der Chemotherapie zu verändern, TNF- α -bedingte Apoptose zu verstärken und seruminduzierte Proliferation zu vermindern (Shah et al., 2001).

1.2.4 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren (*Growth Factors*, *GFs*) werden aufgrund ihrer zellteilungsaktivierenden Funktion auch Mitogene genannt. Viele Faktoren

stimulieren außerdem Zelldifferenzierung und Zellmotilität. Diese sind extrazelluläre Proteine, die autokrin (auf die gleiche Zelle) oder parakrin (auf benachbarte Zellen) im Gewebe wirken können. Das Wirkprinzip deutet bereits daraufhin, dass viele von ihnen sowie die Proteine der angeschalteten Signalwege (Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren) von Proto-Onkogenen kodiert werden.

In mehreren präklinischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Pankreaskarzinome vermehrt den EGF-Rezeptor und seine autokrinen Liganden (EGF und TGF α) exprimieren (Friess et al., 1999). Dies korrelierte mit einem aggressiven Fortschreiten der Tumorerkrankung und einer signifikant schlechteren Überlebenszeit. Weitere Wachstumsfaktoren wie IGF (*Insulin-like Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular endothelial Growth Factor*) und TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*) tragen ebenfalls durch Regulation des Überlebens, der Invasion, der Chemotaxis und der Angiogenese zur Progression der malignen Erkrankung des Pankreas bei (Hezel et al., 2006).

1.2.5 Der NOTCH-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist einer der grundlegenden Signalwege, welcher die Entwicklung des Zellschicksals und der Zellproliferation in der Embryonalphase steuert. Es hat sich auch gezeigt, dass die Notch-Proteine in der Karzinogenese eine wesentliche Rolle spielen (Radtke and Raj, 2003; Kadesch, 2004).

Die Aktivierung dieses Signalweges beginnt mit der Bindung eines membranständigen Notch-Rezeptors (Notch1-4) und seines Liganden (Delta-like und Jagged). Dieser Schritt induziert die proteolytische Abspaltung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors und bewirkt seine nukleäre Translokation mit weiterer Transkription der Zielgene.

Es wurde eine erhöhte Expression der Notch-Proteine und ihrer Liganden in PanIN-Läsionen und PDAC detektiert (Miyamoto et al., 2003). Außerdem haben mehrere Autoren die Interaktionen zwischen Ras- und Notch-Signalwegen, sowohl in der Entwicklung, als auch in der Tumorgenese demonstrieren können (Sundaram, 2005).

1.2.6 Der Stat3-Signalweg

Das Protein *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (Stat 3) gehört zur Familie der Stat-Proteine (STAT 1-6). STATs dienen nicht nur als Transmitter extrazellulärer Signale ins Zytoplasma, sondern sind auch in der Lage als Transkriptionsfaktoren selbst gezielt Einfluss auf die Genexpression zu nehmen (Aaronson et al., 2002). Einige STATs spielen in malignen Prozessen (z.B. der Aktivierung von Stat3 in der Korrelation zwischen Immunantwort und Tumorwachstum) eine entscheidende Rolle und dienen daher als Zielobjekte der aktuellen Krebsforschung (Lesina et al., 2011).

Die Expression der Stat-Proteine ist vom Zelltyp abhängig. Stat3 ist ein Transkriptionsfaktor (Heinrich et al., 1998), der an der Signalübertragung der Interleukin 6 ähnlichen Zytokine (u.a. IL-6, Leukemia inhibitor faktor [LIF], IL-11, Oncostatin M) über Rezeptoruntereinheit gp130 beteiligt ist. Dabei wird der IL-6-Rezeptor dimerisiert und es findet eine Phosphorylierung der gebundenen Januskinasen (JAKs) statt. JAKs aktivieren ihrerseits mittels Phosphorylierung Stat3. Aktivierte Stat-Proteine bilden Dimere und wandern in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Motive binden und ihre Rolle als Transkriptionsfaktoren ausüben können (Kisseleva et al., 2002). Der JAK/STAT-Signalweg wird über einen wichtigen negativen Rückkopplungsmechanismus (Stat-SOCS-JAK) reguliert. SOCS-Proteine (*Suppressors of Cytokine Signaling*) werden durch STATs aktiviert. Diese binden und hemmen ihrerseits die Januskinasen (JAKs). Schlussfolgernd könnte eine Inhibition des Stat3-Proteins und somit des Stat3-Signalweges auf molekularer Ebene die Karzinomentstehung hemmen oder gar verhindern.

1.3 Murine Modelle für Pankreaskarzinom

Aktivierte Onkogene führen zur Entstehung maligner Veränderungen durch Funktionsgewinn, Tumorsuppressorgene hingegen durch Funktionsverlust. Für eine genaue Untersuchung dieser Gene hat man verschiedene methodische Ansätze entwickelt, die es ermöglichen, Gene bzw. Genprodukte funktionell zu aktivieren oder zu inaktivieren. Mit der Entwicklung der neuen *Knock-out* und *Knock-in* Technologie ist es gelungen, große Fortschritte im Bereich der Mausgenetik zu erzielen. Solche genetisch veränderten Mäuse spiegeln die wesentlichen Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorprogression beim Menschen wieder.

1.3.1 Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem

Das Prinzip des Cre/*loxP*-Rekombinationssystems ist die Herstellung gewebespezifisch inaktiver Gene mit Hilfe des Cre/*loxP*-Systems, welches in dieser Arbeit zur Generierung einer pankreasspezifischen Inaktivierung des *rela* Gens genutzt wurde.

Die Cre-Rekombinase (Cre = engl. *cyclization recombination*) stammt aus dem Bakteriophagen P1 und katalysiert eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNA (Sauer and Henderson, 1988). Sie erkennt dabei spezielle, 34bp lange *loxP*-Sequenzen (*loxP* = engl. *locus of X-over of P1*) im Genom und vermittelt eine Rekombination zwischen zwei *loxP*-Stellen. So wird ein zwischen zwei gleichgerichteten *loxP*-Sequenzen liegendes DNA-Segment („gefloxtes“ DNA-Segment) durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut. Nur eine der beiden *loxP*-Sequenzen bleibt auf dem Chromosom zurück (Abbildung 3A).

Zur Generierung einer gewebespezifischen Knockout-Maus werden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt: eine „gefloxte Maus“ mit dem, durch zwei *loxP*-Sequenzen markierten, DNA-Abschnitt und eine „gewebespezifische Cre-Maus“ mit der selektiv exprimierten Cre-Rekombinase (Abbildung 3B). Durch Kreuzung einer „gefloxten“ und einer „Cre-exprimierenden“ Maus, kann eine konditionale Deletion des untersuchten Gens erzielt werden (Hoess and Abremski, 1985).

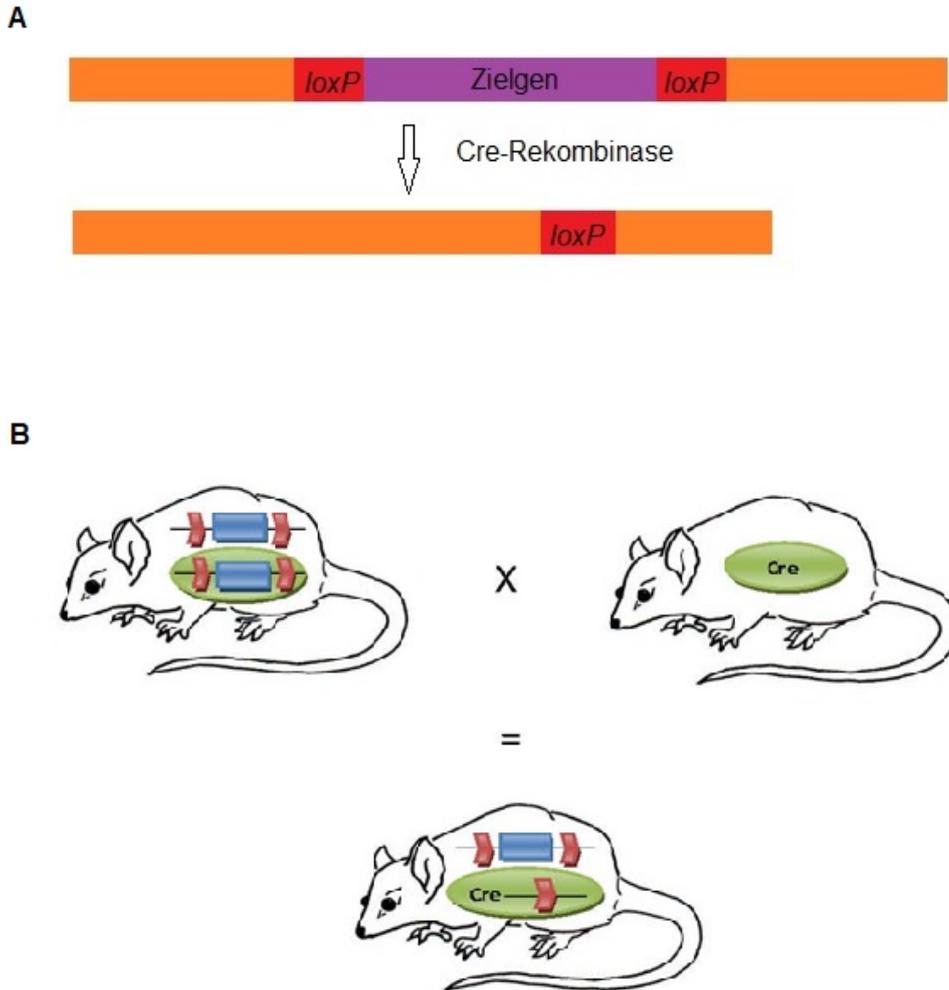


Abbildung 3: Gewebespezifische Cre/loxP-vermittelte Gendeletion

A: Cre-vermittelte Exzision eines „geflochten“ Zielgens: ein DNA-Abschnitt (violett), der zwischen zwei loxP-Sequenzen (rot) liegt, wird durch die Cre-Rekombinase „ausgeschnitten“ (= Exzision) und zusammen mit einer loxP-Sequenz in der Zelle abgebaut.

B: Gewebespezifische Deletion eines Genabschnitts: Es wird eine „geflochte“ Zielmaus mit einer gewebespezifischen Cre-Maus gekreuzt. Die Cre-Expression wird durch gewebespezifische Promotoren kontrolliert. Die Exzision findet nur in den Zellen statt, in denen der Promotor vor dem Cre-Gen aktiv ist.

1.3.2 $Kras^{G12D}$ -Mausmodell für Pankreaskarzinom

In dieser Arbeit spielt das von David Tuveson und Kollegen etablierte $Kras^{G12D}$ -Mausmodell eine entscheidende Rolle. Es basiert auf der gezielten, spezifischen Aktivierung des onkogenen $Kras^{G12D}$ -Allels (Hingorani et al., 2003). Da bereits in PanINs und im weiteren Verlauf in über 90 % der Pankreaskarzinome, eine aktivierende $Kras$ -Mutation nachweisbar ist, gilt sie als eine der initiiierenden Mutationen der Pankreaskarzinomentwicklung (Aguirre et al., 2003).

Hierzu findet zunächst eine mittels eines Plasmids aktivierende Punktmutation (Glycin → Aspartat-Punktmutation, auch G12D) des *Kras*-Allels statt. Diese erfolgt auf dem Kodon 12 im Bereich des Exons 1. Um gezielt ein *in vivo* *Kras*^{G12D}-Mausmodell, mit im Pankreas vorhandenem aktivierendem *Kras*-Protein zu generieren, wurde das oben beschriebene Cre/*loxP*-Rekombinationssystem angewendet (Abbildung 4). Hierfür wird dem Kodon 12 enthaltende Exon 1 eine Lox-Stopp-Lox (LSL)-Sequenz vorgeschaltet. Dieses LSL-Konstrukt verhindert primär die Transkription des veränderten Strukturgens und somit die Überexpression des onkogenen *Kras*-Proteins in der LSL-*Kras*^{G12D}-Mauslinie. In einem weiteren Schritt werden zwei genetisch veränderte Mauslinien gekreuzt: eine LSL-*Kras*^{G12D}-Mauslinie („geflochte Mauslinie“) und eine Knock-in-Mauslinie („gewebespezifische Cre-Maus“) (Nagy, 2000). Die STOP-Kassette wird pankreasspezifisch mit Hilfe einer Cre-Rekombinase unter dem gewebespezifischen *Ptf1a/p48* Promoter deletiert. Das vom *Ptf1a*-Genbereich kodierte Ptf1a-Protein (auch p48 genannt) stellt die Untereinheit des heterotrimerischen Pankreastranskriptionsfaktorkomplex 1 dar (Rose et al., 2001). P48 wird ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung exprimiert und ist für die pankreasspezifische Differenzierung der Zellen verantwortlich. Nach o.g. Kreuzung zweier transgener Mauslinien entsteht nun die Mausmutante *Kras*^{+G12D};*Ptf1a*^{+Cre}-Maus, in der das onkogene *Kras* selektiv in Pankreasgewebszellen aktiviert ist (Hingorani et al., 2003). Die histologische und morphologische Tumorprogression dieses Mausmodells ähnelt sehr dem humanen Pankreaskarzinom. Somit kann die Tumorentwicklung pankreasspezifisch initiiert und die Entstehung des humanen Pankreaskarzinoms gezielt in der Maus rekapituliert werden. Die genetisch veränderten *Kras*^{G12D}-Mäuse zeigen daraufhin im Frühstadium die niedriggradigen PanIN-Läsionen und im fortgeschrittenen Stadium die höhergradigen Läsionen bis hin zu invasiv wachsenden und metastasierenden Pankreaskarzinomen (Hingorani et al., 2003).

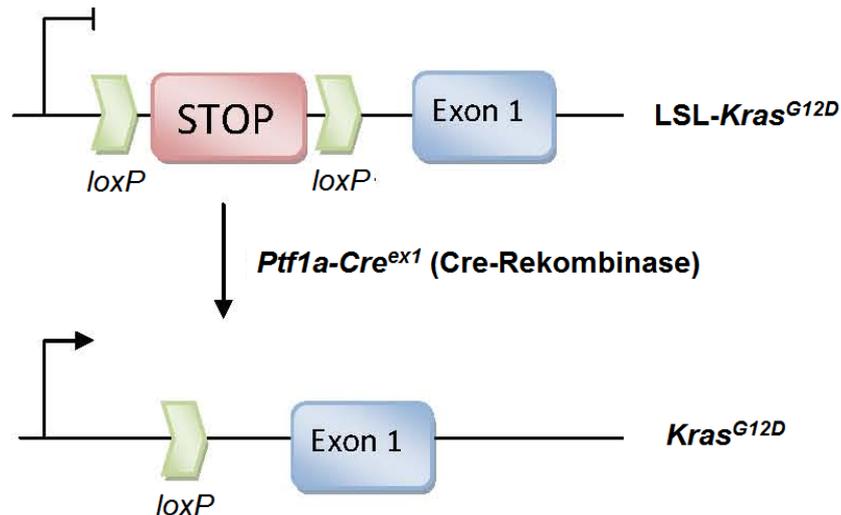


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung der *Kras^{G12D}*-Mauslinie (modifiziert nach Hingorani *et al.*, 2003)

Die STOP-Kassette (rotes Viereck), die beidseits mit loxP-Sequenzen (grüner Pfeil) versehen ist, befindet sich vor dem Exon1 (blaues Viereck) und wird durch die Ptf1a-Cre-Rekombinase deletiert.

Ausgehend von diesem etablierten *Kras^{G12D}*-Tumormausmodell sind weitere diverse Tiermodellssysteme entwickelt worden, die additiv zu dem mutierten *Kras*-Allel andere genetische Veränderungen aufweisen. Damit lässt sich der Einfluss dieser einzelnen Genmutationen auf die Karzinomentwicklung und -progression genauer analysieren und mögliche Ansatzpunkte für die Therapie des Tumors können gefunden werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen der aktiven Untereinheit RelA/p65 des NF-κB/Rel-Signalwegs auf die Entwicklung des Pankreaskarzinoms *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde die funktionale Untereinheit RelA/p65 in der *Kras^{G12D}*-Mauslinie mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems genetisch inaktiviert. In den durchgeführten Experimenten wurde untersucht, wie sich die Inaktivierung von RelA/p65 auf die Entwicklung und Progression des Pankreaskarzinoms im *Kras^{G12D}*-Mausmodell auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Materialien

1. Aceton	Merck, Darmstadt
2. Agarose	Biozym LE, Oldendorf
3. Ammonium Chloride	Sigma-Aldrich, Steinheim
4. Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
5. BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
6. Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
7. Deckgläschen	Merck, Darmstadt
8. DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
9. DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
10. EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
11. Eosin	Division Chroma, Münster
12. Essigsäure 100 %, wasserfrei	Merck, Darmstadt
13. Ethanol 70 %, 96 %, 99,8 %	Behroplast, Düsseldorf
14. Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
15. FCS (Fötale Kälbeserum)	Biochrom, Berlin
16. Glycerin > 99,5 %, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
17. Glycine	Sigma-Aldrich, Steinheim
18. Hämatoxylinlösung	Merck, Darmstadt
19. Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
20. Isofluran, Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden
21. Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
22. Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim

23. 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
24. Methanol > 99.5 %	Roth, Karlsruhe
25. Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
26. Natronlauge	Merck, Darmstadt
27. PBS Dulbecco	Biochrom KG, Berlin
28. Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen Gibco, Karlsruhe
29. PFA (Paraformaldehyde)	Merck, Darmstadt
30. Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
31. Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, USA
32. 2-Propanol	Merck, Darmstadt
33. Protease Inhibitor Coctail	Sigma-Aldrich, Steinheim
34. RED Taq Ready Mix	Sigma-Aldrich, Steinheim
35. RLT-Puffer (Lösepuffer)	Qiagen, Maryland USA
36. RNase ZAP	Sigma-Aldrich, Steinheim
37. Rotiphorese ® Gel 30	Roth, Karlsruhe
38. Salzsäure, rauchend 37 %	Merck, Darmstadt
39. Schnelleindeckmittel Pertex	Medite, Burgdorf
40. SDS ultra pure (Sodium dodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe
42. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
43. TRIS-HCl, > 99 % (Pulver)	Roth, Karlsruhe
44. Trypsin Inhibitor	Roche, Mannheim
45. Tween ® 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Roth, Karlsruhe
46. Vectastain, ABC Kit	Burlingame, CA, USA

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

1. Einkanal Pipetten (0,5 - 2 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
2. Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
3. GelDoc™ XR System	Bio-Rad, München
4. Homogenisator DIAX 900	Heidolph, Schwabach
5. Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
6. Mikroskop Axio Imager A1	Zeiss, Göttingen
7. Mikroskop AxioStar plus	Zeiss, Göttingen
8. Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
9. Mikrotom, HM 355 S	Microm GmbH, Walldorf
10. Mikrotom, HM 355	Microm GmbH, Walldorf
11. Mikrowelle	Siemens, München
12. Mini Trans-Blot Cell™	Bio-Rad, München
13. pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Giessen
14. Real-time-PCR Gerät	Applied Biosystems
15. Agarose Gel Elektrophoresis Systems	Bio-Rad, München
16. Vortex Reax top	Heidolph, Schwabach
17. Wärmeschrank Hera cell 240	Heraeus, Langenselbold
18. Wasserbad Medax	GFL, Burgwedel
19. Waage	Sartorius AG, Göttingen
20. Zentrifuge 5415D, 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Puffer und Lösungen

Blocklösung

TBST-Puffer (PBST-Puffer)

5 % Magermilchpulver (5 % BSA)

IP-Puffer

50 mM Hepes, pH 7,9

150 mM NaCl

1 mM EDTA, pH 8,0

0,5 % (v/v) NP-40

10 % (v/v) Glycerin

Kurz vor der Lyse zugeben:

1 mM DTT

0,2 mM PMSF

1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Coctail

1 % (v/v) Protease Inhibitor Coctail I

1 % (v/v) Protease Inhibitor Coctail II

Lysispuffer für die Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

50 mM Tris, pH 8,0

100 mM EDTA

100 mM NaCl

1 % (w/v) SDS

0,5 mg/ml Proteinkinase K, kurz vor der Lyse zugeben

PBS-Puffer, pH 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

10 mM KH₂PO₄

PBST-Puffer

PBS-Puffer

0,1 % (v/v) Tween-20

Lämmli-Ladepuffer (5x)

300 mM Tris-HCl, pH 6,8

10 % (w/v) SDS

50 % Glycerin

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

TAE-Puffer

0,4 M Tris

0,2 M Eisessig

0,01 M EDTA \cdot $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

TBS-Puffer, pH 7,6

20 mM Tris

137 mM NaCl

TBST-Puffer

20 mM Tris

137 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween-20

RLT-Puffer-Lösung

RLT-Puffer aus dem Kit

1 % (v/v) β -Mercaptoethanol

BrdU-Lösung

Stock-Lösung 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU in H_2O

Western Blot Puffer:

Transferpuffer

25 mM Tris-HCl

192 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

Trenngelpuffer

1,5 M TRIS, pH 8,8

Sammelgelpuffer

0,5 M TRIS, pH 6,8

Laufpuffer (10x)

25 mM Tris-HCl (ohne pH-Einstellung)

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

2.1.4 Enzyme, Kits, PCR-Primer, Antikörper

Enzyme

Liberase Roche, Mannheim

Proteinase K Roche, Mannheim

Kits

ABC KIT, Vectastain ® Elite Vector Laboratories, Burlingame USA

Avidin/Biotin Blocking KIT Vector Laboratories, Burlingame USA

ECL™ Western Blotting Detection System GE Healthcare, UK

ECL Plus, Peroxidase Substrate KIT DAB Vector Laboratories, USA

Sybr ® Green PSR Master Mix Applied Biosystems, UK

PCR-Primer

Es wurden PCR-Primer (Oligonukleotide) der Firma MWG Biotech (Ebersberg, DE) verwendet. Diese wurden mit 0,9 % NaCl zu einer Konzentration von 100 pM verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Daraus erfolgte die Herstellung der jeweiligen Arbeitskonzentration von 10 pM.

Cre487 sense: 5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA CCA A-3'

p48as1642 antisense: 5'-CCT CGA AGG CGT CGT TGA TGG ACT gca-3'

Kras K005 sense: 5'-AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A-3'

Kras K006 antisense: 5'-CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA-3'

p65loxP1 sense: 5'-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3'

p65loxP2 antisense: 5'-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3'

Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller (Firma)
β-actin	Maus	1:2000	Sigma, Steinheim
BrdU	Ratte	1:250	Serotec
Cytokeratin-19	Ratte	1:300	Hybridoma Bank, Iowa City, USA
Mucin 5	Maus	1:100	Lab Vision, Dreieich
p 65 (NF-κB) C20	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
Cyclin D1	Hase	1:100	Lab Vision, Dreieich

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller (Firma)
Biotinylierter Anti-rabbit	Ziege	1:500	Vector, Burlingame, USA
Biotinylierter Anti-mouse	Ziege	1:500	Vector, Burlingame, USA
Biotinylierter Anti-rat	Hase	1:500	Vector, Burlingame, USA

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Analysen

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Mausgewebe

Die etwa 1 cm langen Schwanzstücke von der Maus wurden in 750 µl Lysispuffer und Proteinkinase K (5 mg/ml) über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag, nach der vollständigen Auflösung des Schwanzgewebes, wurde zu jeder Probe 250 µl 6 M NaCl-Lösung zugegeben, zur Durchmischung das Eppendorf-Tube per Hand geschwenkt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert. Von jeder Probe wurde 200 µl Überstand entnommen. Nach Zugabe von 175 µl 100 % Isopropanol wurde wieder 10 min bei 13000 rpm (4°C) zentrifugiert. Die DNA-Fäden, die sich sedimentiert haben, wurden 2 x 10 min mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde luftgetrocknete DNA in TE-Puffer gelöst und deren Konzentration bestimmt.

2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem BioPhotometer (Eppendorf), durch Messen der optischen Dichte (OD), bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die optische Dichte (OD₂₆₀) von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Menge von 50 µg/ml (doppelsträngige DNA).

2.2.1.3 Amplifikation von DNA und Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung (Vervielfältigung) eines kurzen DNA-Abschnittes zur Genotypisierung erfolgte durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierzu wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt, die einen DNA-Einzelstrang mit Hilfe zweier Oligonukleotidprimer zum DNA-Doppelstrang polymerisieren kann. Unsere PCRs wurden mit RED Taq Ready Mix durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an DNA zu erhalten, sind mehrere PCR-Zyklen nötig, die automatisiert in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) durchgeführt werden.

Standardprotokoll:

Reaktionsansatz

dH ₂ O	9,5 µl
RED Taq Ready Mix	12,5 µl
Primer sense 10 pmol/µl	1 µl
Primer antisense 10 pmol/µl	1 µl
DNA	1 µl

Reaktionsbedingungen

1. Initiale Denaturierung der DNA	95°C	3 min
2. (35 - 40 Zyklen)		
- Denaturierung	95°C	30 s
- Anlagerung der Primer		30 s
- Elongation durch die Polymerase	72°C	1 min
3. Finale Polymerisation	72°C	10 min

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde anschließend die Größe der erhaltenen PCR-Produkte verifiziert. Der Molekularsiebeffekt des Agarosegels wird hierbei als Trennprinzip genutzt, in dem die DNA-Moleküle, nach Anlegen einer elektrischen Spannung, bedingt durch ihre eigene negative Ladung, von der Kathode zur Anode wandern. Je kleiner die DNA-Moleküle, desto schneller bewegen sie sich durch die Gelmatrix, sodass eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. Die Trennschärfe der DNA-Moleküle wird durch die Agarosekonzentration des Gels, die anliegende Spannung und die Zeit, in der das elektrische Feld anliegt, beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Agarosekonzentration (w/v) von 2 % gewählt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer bis zum vollständigen Auflösen aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 50°C mit Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Anschließend wurden die in der PCR amplifizierten DNA-Proben in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Der Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht diente das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid. Die Ergebnisdokumentation erfolgte mittels GelDocTMXR System mit Transilluminator, Kamera und Auswertsoftware.

In der PCR wurde nicht die gesamte DNA amplifiziert, sondern nur der zwischen den beiden Amplifikationsprimern gelegene DNA-Abschnitt. Die Größe des PCR-Fragmentes summiert sich aus dem Abstand zwischen den beiden Primern und ihrer Länge.

2.2.2 Isolierung von RNA aus Mauspankreas

Für die Gewinnung von totaler RNA aus Pankreas wurde das RNeasy® Mini Kit verwendet. Mit Hilfe dieses Kits wird die untersuchte RNA affinitätschromatographisch aufgereinigt. Das entnommene Gewebe wurde in RLT-Puffer/1 % (v/v) β -Mercaptoethanol hineingegeben. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes mit Hilfe eines Homogenisators DIAX 900. Die weiteren Arbeitsschritte richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte wie unter Punkt 2.2.1 (Unterpunkt: DNA-Konzentrationsbestimmung) beschrieben. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Um die Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Proteinen möglichst auf Eis durchgeführt.

2.2.3.1 Isolierung von Proteinen aus Mausgewebe

Frische oder eingefrorene Pankreasgewebe wurden mit IP-Puffer, Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren versetzt und mit Hilfe des Homogenisators DiAx 900 zerkleinert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Proteinlösungen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei der Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine Verschiebung des Absorptionsmaximums einer Lösung aus

Coomassie-Brilliant-Blau G250 von 465 nm zu 595 nm bei Bindung von Protein. Die Extinktionszunahme ist zur Proteinkonzentration proportional und lässt sich photometrisch messen.

Für die Eichkurve wurde BSA (1 mg/ml) verwendet. Als Leerwert diente IP-Puffer. Proteinlösungen wurden 1:10 mit IP-Puffer verdünnt. 10 µl Probe wurde mit 200 µl Farbstoff-Reagenz (1:5 mit H₂O versetzt) 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Lösung (=Proteinkonzentration) wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

SDS-Elektrophorese ist ein Trennverfahren für Proteine, das auf ihren unterschiedlichen molekularen Massen beruht. Die Proteine wurden mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und so wurden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe von β-Mercaptoethanol aufgespalten. Um eine optimale Bandenschärfe im untersuchten Größenbereich zu erzielen und um die Aggregation der Proteine beim Eintritt ins Gel zu verhindern, wurde die Elektrophorese diskontinuierlich durchgeführt. Hierzu wurde die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: das weitporige Sammelgel und das engporige Trenngel. Je nach Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine wurden in dieser Arbeit Trenngele mit einem Acrylamidgehalt zwischen 7,5 und 15 % verwendet, wobei sich der Anteil des Acrylamids im Trenngel umgekehrt proportional zur Proteingröße verhält. Die Mischverhältnisse der Reagenzien ergaben sich wie folgt:

Tabelle 3: SDS Gele

Trenngel	7,5 %	10 %	12 %	Sammelgel	
dH ₂ O	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	dH ₂ O	3,0 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	Sammelgelpuffer	1,3 ml
Rotiphorese Gel 30	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	Rotiphorese Gel 30	750 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	10 % APS	25 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	TEMED	10 µl

Die Geltaschen wurden mit Proteinlösungen nach definierten Proteinkonzentrationen gefüllt. Mithilfe des jeweils in die erste Geltasche aufgetragenen Proteingrößenstandard (10-250 kDa) ließen sich später die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Der Gellauf wurde in Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) bei einer Spannung von 70 V im Sammelgel und 90-120 V (je nach Acrylamidkonzentration) im Trenngel durchgeführt.

2.2.3.4 Western Blot Analyse

Beim Western Blot werden Proteine, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden, durch ein transversal zur Geloberfläche angelegtes elektrisches Feld an der Anode auf eine Membran übertragen. Hierzu wird das Proteingemisch der eingesetzten Proben zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Der Proteinnachweis erfolgt dann durch das Aufbringen spezifischer Primär- und Sekundärantikörper.

In einem Tank-Blot System (Mini Trans-Blot) wurden die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bei 350 mA für 1h im Transferpuffer auf eine Polyvinylidendifluorid- oder Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran 1h bei RT in Blocklösung geschwenkt, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren, danach mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 15 min gewaschen, 60 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert und wieder 3 x 15 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Membran Mithilfe von ECL™ Western Blotting Delektion Reagents auf Hyperfilm™ ECL.

Zur Demonstration der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde die ubiquitär exprimierte Cytoskelettkomponente β -Actin auf der gleichen Membran nachgewiesen.

Für den Nachweis von konstitutiv aktivem Kras-Protein mittels Western Blot Analyse haben wir nach Angaben des Herstellers die pankreatischen Proteinlysate beider Mauslinien jeweils mit dem Raf-1 RBD Agarose enthaltenden Ras Assay Reagenz versetzt, um den Ras-RBD-Komplex mit Hilfe eines Ras-Antikörpers im Western Blot zu detektieren. Dabei ließ sich aktives GTP-gebundenes Kras-Protein im murinen

Pankreas nachweisen. Zusätzlich haben wir die gleichen Proteinlysate ohne Zugabe von Raf-1 RBD Agarose auf die Expression von ungebundenem Ras-Protein (panRas) zum Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung analysiert.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Das aus Mäusen gewonnene Pankreasgewebe wurde zuerst in 4 % gepuffertem Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Präparate entwässert und mit Paraffin eingebettet.

Die dabei entstandenen Paraffin-Gewebeblöcke wurden mittels eines Mikrotoms geschnitten, wobei 3,5 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Diese konnten im heißen Wasserbad auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet werden. Anschließend kamen die Paraffinschnitte zum Herauslösen des Paraffins für 2 x 5 min in Xylol, danach wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe (jeweils x 3 min in 99,8 %, 96 % und 70 % Alkohol) und Aqua dest. überführt. Die Schnitte standen nun für die Färbungen zur Verfügung.

2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Färbemethode in der Histologie, die in der Forschung meist als Übersichtsfärbung vor der Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen vielfältige Anwendung findet.

Hämatoxylin muss zuerst zu Hämalan (basischer Hämateinlack) aufbereitet werden, damit er seine färbenden Eigenschaften entwickelt. Hämalan färbt alle sauren Strukturen blau, insbesondere Zellkerne. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt basische Strukturen (Zellplasmaproteine, extrazelluläre Matrix) rot.

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbemethoden

Voraussetzung für die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung ist ein Antikörper, der spezifisch gegen bestimmte Proteine gerichtet ist, die man darstellen möchte. Die Qualität der Färbung ist von mehreren Aspekten abhängig: von der

Fixierung des Materials, der Verdünnung des Antikörpers, der Inkubationszeit aller Reagenzien sowie der optimalen Temperatur.

Es gibt mehrere Methoden der immunhistochemischen Färbung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Färbemethode mit Hilfe der Streptavidin-Biotin-Technik angewendet. Die Streptavidin-Biotin-Methode ist eine indirekte Nachweismethode. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (*Hühnereiweiß*) für Biotin. Beide besitzen jeweils 4 Bindungsstellen für Biotin. Bei der Reaktion bindet das Glykoprotein Avidin des enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die Reihenfolge der zugegebenen Substanzen zum Antigen war wie folgt: unkonjugierter Primärantikörper, biotinmarkierter Sekundärantikörper, Avidin-Biotin-Enzymkomplex, chromogene Substratlösung. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase verwendet. Die Peroxidase überträgt von Chromogen DAB Elektronen auf das zugegebene Substrat Wasserstoffperoxid, das so zu H₂O reduziert wird. DAB fällt zu einem unlöslichen, bräunlichen Produkt aus und führt so zur Anfärbung des Immunkomplexes und darüber zur Detektion des Proteins.

Für Fluoreszenzantikörperfärbungen werden Sekundärantikörper, an die Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, verwendet.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung wurden die Zelllinien in DMEM (Invitrogen) Medium, dem FCS (Invitrogen), 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), MEM AA zugesetzt (im folgenden mit „Kulturmedium“ bezeichnet) und bei 37°C und 5,0 % CO₂ Konzentration in den Zellkulturflaschen inkubiert. Das Kulturmedium wurde alle 2 - 3 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt.

2.2.5.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit 1 x PBS-Puffer gewaschen, für 5 min in Trypsin-EDTA bei 37°C und 5,0 % CO₂ Konzentration inkubiert, bis sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Der Vorgang wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen im Kulturmedium abgewaschen und für

5 min bei RT und 1 300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Medium resuspendiert und etwa 10 % der Zellsuspension in einer neuen Zellkulturflasche weitergezogen. Das verwendete Kulturmedium, PBS und Trypsin-EDTA wurden vor Arbeitsbeginn auf Zimmertemperatur erwärmt.

2.2.5.3 Isolierung von DNA und Proteinen aus Pankreaszellen

Zur Isolierung von DNA und Proteinen aus Zelllinien wurden die Zellen durch das Zentrifugieren vom Kulturmedium abgetrennt:

- Die DNA-Isolierung

Die gewonnenen Zellen wurden mit je 1 ml PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurde zu jeder Probe 1 ml Lysepuffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5 % SDS) zugegeben. Für die weitere Aufbewahrung wurden die im Stickstoff schockgefrorenen DNA-Lysate bei -80°C gelagert.

- Die Proteinisolierung

Die Zellen wurden in je 1 ml PBS zweimal gewaschen. Nach dem Zentrifugieren und vollständigem Abnehmen der PBS-Waschlösung wurden die Zellen mit 1 ml Lysepuffer (800 µl Wasser mit Glycerol, 200 µl 5-fach MLB) und je 10 µl Inhibitoren (Phosphatasen und Proteasen) (3 x) auf Eis inkubiert.

Wenn erhaltene Lysate nicht direkt im Anschluss zur Westernblotanalyse verwendet wurden, wurden diese im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1 *In vivo* Analyse der Rolle von RelA/p65 in der *Kras*^{G12D}-induzierten Karzinogenese des Pankreas

3.1.1 Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 im *Kras*^{G12D}-Mausmodell

Für die Generierung des pankreasspezifischen *Kras*^{G12D}-Mausmodells wurden, wie unter 1.3.2 dargestellt, zwei genetisch veränderte Mauslinien, eine „gefloxt Maus“ (LSL-*Kras*^{G12D}-Maus) und eine „gewebespezifische Cre-Maus“ (Knock-in-Mauslinie), gekreuzt. Die eingesetzte pankreasspezifisch exprimierende Cre-Maus (*Ptf1a-cre*^{ex1}) wurde in unserem Labor erzeugt. In dieser Mauslinie wird endogen, ebenfalls mittels Cre-Rekombinasesystem, auf einem Allel von *Ptf1a* Exon 1 durch das Cre-Rekombinase-Gen ersetzt (Nakhai et al., 2007).

Das Gen *Ptf1a* kodiert für das 48 kD schwere basic helix-loop-helix Protein (bHLH) P48, das zusammen mit den zwei weiteren Proteinen (p64 und p75) einen trimerischen Pankreastranskriptionsfaktor 1 (Ptf1) bildet (Kawaguchi et al., 2002; Krapp et al., 1998).

Die ersten erkennbaren Progenitorzellen des murinen Pankreas entstehen im Endoderm am Tag 8 der Embryonalentwicklung. Die p48/Ptf1-Expression findet ab Tag 9,5 der Embryonalentwicklung der Maus in den pankreatischen Progenitorzellen statt und ist gemeinsam mit dem etwas früher (Tag 8,5) auftretenden pankreatischen und duodenalen Homeobox Faktor 1 (*Pdx-1*) für die pankreasspezifische Differenzierung der Zellen zuständig. Beide Gene sind enorm wichtig für die Entwicklung und Differenzierung der Pankreaszellen. Die *Ptf1a-cre*^{ex1} homozygote Mausmutante verfügen über keine erkennbare Bauchspeicheldrüse und verstirbt kurz nach der Geburt, eine homozygote *Pdx-1*-Deletion führt zu einem letalen Ereignis des murinen Embryos (Offield et al., 1996; Krapp et al., 1998).

Durch die Kreuzung einer LSL-*Kras*^{G12D}-Maus mit der pankreasspezifischen *Ptf1a-cre*^{ex1}-Maus erhielten wir die heterozygote Mausmutante LSL-*Kras*^{+G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1}. Diese entsteht durch die mit der *Ptf1a-Cre*-Rekombinase erfolgte Exzision der transkriptionshemmenden loxP-markierenden STOP-Sequenz. Dabei bleibt eine loxP-Sequenz mit dem mutierten Exon 1 des *Kras*^{G12D}-Allels zurück, die eine Expression des onkogenen *Kras* Proteins nur in den pankreatischen Vorläuferzellen und überwiegend im exokrinen Pankreas ermöglicht. Das resultierende Mausmodell LSL-*Kras*^{+G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1} (*Kras*^{G12D}) wird im Folgenden mit CK abgekürzt. Dieses

Modell entwickelt PanIN Läsionen sowie invasive metastasierende duktale Adenokarzinome nach einer längeren Latenzzeit.

Die konventionellen RelA/p65 Knock-out-Mäuse weisen einen embryonal letalen Phänotyp auf. Um die Bedeutung der Funktion von RelA/p65 im Pankreas zu evaluieren, haben wir mittels Cre/loxP-Strategie eine konditionale RelA/p65 Knock-out-Maus generiert, in der diese transkriptionell aktive Untereinheit im Pankreas inaktiviert wurde (*rela*^{ΔΔ} Mauslinie).

Zur Generierung dieser Mauslinie wurden ebenfalls eine in unserem Labor generierte gefloxt *Rela* Mauslinie (*rela*^{flox/flox}) und eine pankreasspezifisch exprimierende Cre-Maus (*Ptf1a-cre*^{ex1}) gepaart (Nakhai et al., 2007). Die *rela*^{flox/flox} Mäuse verfügen über die loxP-Sequenzen, die den Genabschnitt zwischen Exon 7 und 10 des *rela* Gens im Pankreas flankieren (Abbildung 5A). Dieser Genabschnitt wird spezifisch von der Cre-Rekombinase exzidiert und anschließend deletiert. Dabei entsteht eine Mausmutante *rela*^{ΔΔ} mit der gewebespezifischen, funktional inaktiven Form von RelA/p65 in der Bauchspeicheldrüse, die weder dimerisieren, noch in den Zellkern translozieren kann (Algül et al., 2007a). Des Weiteren wurde mittels HE-Färbung die Auswirkung der *rela*^{ΔΔ}-Inaktivierung auf die Morphologie im Vergleich zum Wildtyp evaluiert. Die Abbildung 5B zeigt, dass die Pankreasmorphologie beider exemplarisch dargestellter Tiere die pankreastypische Unterteilung in Läppchen zeigt und sich somit im Wesentlichen nicht unterscheidet. Daraus lässt sich schließen, dass die aus der *Ptf1a-Cre*-vermittelten *rela* Deletion resultierende Inhibition der RelA/p65-Expression die Morphologie des exokrinen und endokrinen Pankreaskompartiments nicht beeinflusst.

Um die Auswirkung des trunkierten *RelA/p65*-Gens auf die *Kras*^{G12D}-vermittelte pankreatische Onkogenese in einem Mausmodell überprüfen zu können, etablierten wir im Folgenden eine pankreasspezifische Inaktivierung des RelA/p65 in CK Mäusen.

Durch die weitere Verpaarung der *LSL-Kras*^{G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1}-Maus mit der *rela*^{ΔΔ}-Maus ist eine Mauslinie entstanden, die sowohl über eine pankreasspezifische *Kras*^{G12D}-Mutation, die bei etwa 90% aller humanen Pankreaskarzinome vorgefunden wird (Hingorani et al., 2003), als auch über die *Ptf1a-Cre*-vermittelte Inaktivierung von RelA/p65 verfügt. Dieses Mausmodell (*Kras*^{G12D};*rela*^{ΔΔ}) wird im Folgenden als CKA bezeichnet (Abbildung 5C).

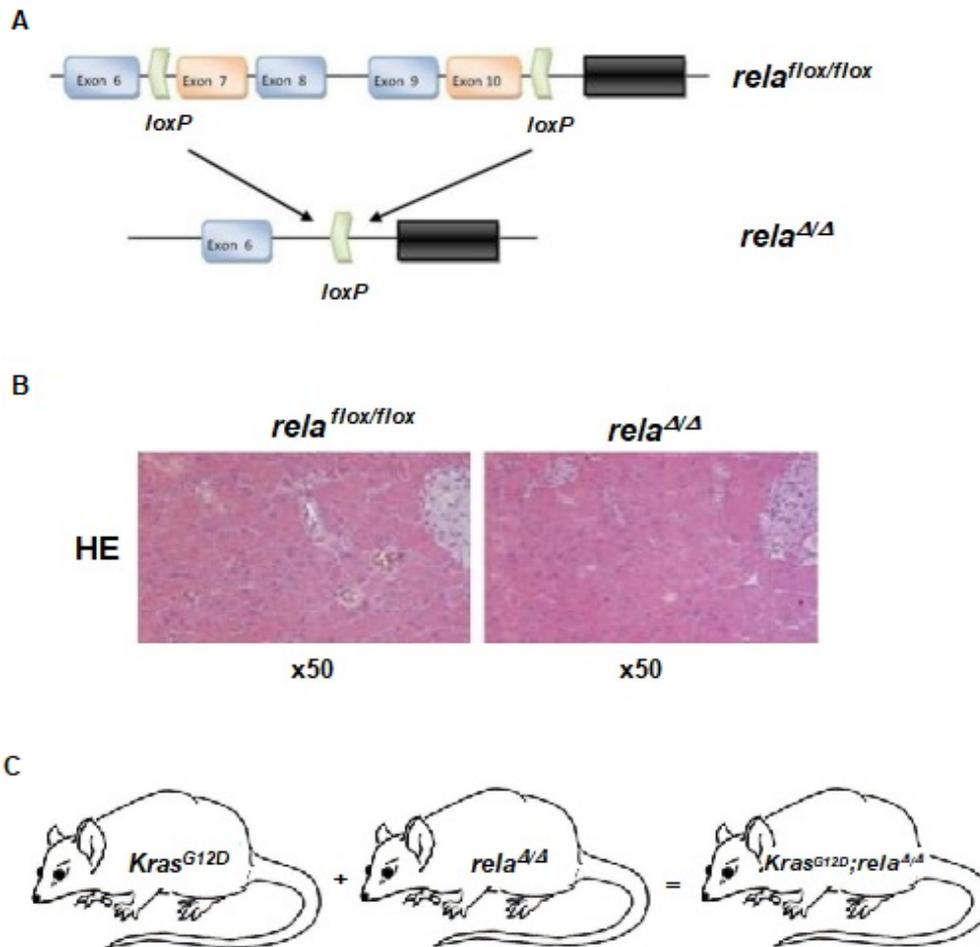


Abbildung 5: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65

A: Schematische Darstellung der pankreasspezifischen Deletion von RelA/p65 mittels Cre/loxP-System. LoxP-Stellen (Dreieck grün) abgrenzen den Bereich mit den Exons 7–10 des *rela* Gens (Algül, et al. 2007a).

B: Morphologische Analyse des Pankreasgewebes (HE-Färbung) einer *rela*^{lox/lox}-Maus und einer *rela*^{Δ/Δ}-Mausmutante (Algül et al., 2007a).

C: Schematische Darstellung der Generierung einer *Kras*^{G12D};*rela*^{Δ/Δ}-Mauslinie (CKA).

Neben der Aktivierung von Kras wird bei diesen Tieren das RelA/p65, die transkriptionell aktive Untereinheit des ubiquitären NF-κB/Rel Komplexes spezifisch in der Bauchspeicheldrüse deaktiviert.

Um das Ergebnis der Ptf1a-Cre-vermittelten Deletion des *rela*-Gens zwischen Exons 7 und 10 auf DNA-Ebene zu validieren, bestimmten wir zunächst mittels PCR-Analyse den Genotyp der aus den oben beschriebenen Kreuzungen hervorgehenden Nachkommen. Die genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzen der einen Monat alten Mäuse gewonnen. Nach einer PCR mit sequenzspezifischen Forward- und Reverse-Primern wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Anhand des

entstandenen Bandenmusters bzw. der Fragmentlängen konnten die Proben analysiert und die Experimentmäuse genotypisiert werden.

Wie Abbildung 6A zeigt, wurden folgende Mäuse analysiert: *KA* (LSL-*Kras*^{+G12D};*rela*^{fllox/fllox}), *CK* (LSL-*Kras*^{+G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1}), *CKA* (LSL-*Kras*^{+G12D};*Ptf1a-cre*^{ex1};*rela*^{fllox/fllox}) und *Ctrl* (*Ptf1a-cre*^{ex1};*rela*^{fllox/+}). Dabei fungiert die sogenannte *Ctrl* Mauslinie als Kontrolle unserer PCR-Analyse. Die PCR mit den *Ptf1a Cre* Primern ermöglichte den Nachweis der Cre-Rekombinase. Neben der *KA* Maus, die kein Signal aufweist, erkennt man bei *CK*, *CKA* und *Ctrl* Mäusen Cre-Rekombinase spezifische Signale. Diese Mäuse sind positiv für das *Ptf1a Cre* Gen. Alle Nachkommen weisen in der PCR-Analyse Banden für das *Kras*-Wildtyp-Allel auf. Spezifische Signale für das LSL-*Kras*^{+G12D}-Allel erkennt man allerdings in allen Proben außer der *Ctrl*-Maus. Als Nächstes wurde der *rela*-Lokus auf *LoxP*-Sequenzen getestet. Diese ergab ein *rela loxP* spezifisches Amplikon (298bp) in den Proben der *KA*, *CKA* und *Ctrl* Tiere. Somit wurden diese Mausmodelle als homozygot *gefloxt* eingestuft. Die *Ctrl* Maus, die als Kontrolle diente, weist eine Cre-Rekombinase spezifische Bande, eine *rela wt* spezifische Bande (*rela*⁺) und eine *rela loxP* spezifische Bande (*rela*^{fllox}) auf. Ziel unserer Kreuzungsstrategie waren Nachkommen mit *Kras* spezifischer Mutation ohne (*CK*) und mit homozygoter Deletion von RelA/p65 im Pankreas (*CKA*).

Im weiteren Schritt analysierten wir die RelA/p65-Expression im Pankreasgewebe der ein Monat alten *CK* und *CKA* Mäuse mittels Western Blot. Wie die Abbildung 6B zeigt, ist das verkürzte Fragment Δp65 in den ein Monat alten *CKA* Mäusen detektierbar, während *CK* Mäuse im gleichen Alter weiterhin das unveränderte Protein RelA/p65 aufweisen. Bindegewebe und endokrine Zellen im Pankreas sind für den schwachen Nachweis von nicht deletiertem RelA/p65 Protein in der *CKA* Mauslinie verantwortlich. Das beweist eine pankreasspezifische *Ptf1a-Cre*-vermittelte Exzision und anschließende Deletion des *rela* Gens zwischen Exon 7 und 10 im Pankreas der *CKA* Mäuse.

Um herauszufinden, ob die Ausprägung der *G12D*-Mutation durch die zusätzliche Deletion des Exons der *rela* Gens im Pankreas der *CKA* Mäuse beeinträchtigt wird, führten wir das Ras-Aktivierungsassay durch. Dieser Test basiert auf der hochspezifischen Bindung der Ras-bindenden Domäne (RBD) des Proteins Raf-1 an GTP-korreliertes Ras-Protein, da die *Kras*^{G12D}-Mutation aus einer verminderten Hydrolyse eines aktiven GTP-gebundenen *Kras* in eine inaktive Ras-GDP-Form

hervorgeht und zu einer transformierenden Kras-Proteinaktivität führt (Bos, 1989). Wie Abbildung 6C darstellt, weisen die einen Monat alten Mäuse beider Mauslinien nahezu eine gleiche Expression von RBD- und damit GTP-gebundenem Ras-Protein und damit auch gleiche Ras-Aktivität in der Bauchspeicheldrüse auf. Daraus folgt, dass die zusätzliche pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 keinen Einfluss auf Ras-Aktivität hat.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung lassen sich Proteine oder spezifische Strukturen in Zellen und Gewebe genauer lokalisieren. Mit dieser Methode konnten wir die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 nachweisen. Die Kerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Sytox Green* grün angefärbt, während RelA/p65 mit einem Cy3 (rot) gekoppelten Antikörper markiert wurde. Die nukleäre Lokalisation von p65 wurde durch die Überlappung von grünen (*Sytox Green*) und roten (Cy3) Signalen identifiziert. Wie der Abbildung 6D zu entnehmen ist, waren sowohl azinäre Zellen als auch duktale Strukturen von CK Pankeas für nukleäres RelA/p65 positiv, während CKA Proben nur zytoplasmatische Signale aufwiesen.

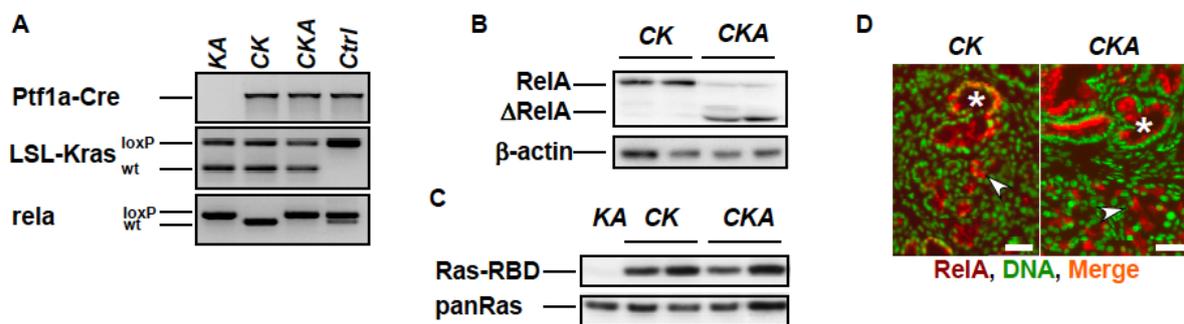


Abbildung 6: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 in *Kras*^{G12D}-Mauslinie

A: PCR-Analyse genomischer DNA. *LoxP* (gefloxtes Allel), *wt* (Wildtyp-Allel), *Ctrl* = Kontrollmaus

B: Western Blot Analyse vom Pankreas einen Monat alter CK und CKA Mäuse. β -actin diene als Ladekontrolle.

C: Nachweis von konstitutiv aktivem *Kras*-Protein mit Hilfe von Ras-Aktivierungsassay in Pankreata von CK und CKA Mäusen im Alter von einem Monat.

D: Immunfluoreszenzdoppelfärbung von RelA/p65 in Pankreasproben von CK und CKA Mäusen. CK Kontrolltiere weisen eine nukleäre Translokation von RelA/p65 in dukталen (Sternchen) und azinären (Pfeil) Zellen auf, die durch eine Überlagerung der beiden Farben rot (RelA/p65) und grün (DNA) in orange zur Darstellung kommt. Bei CKA Mäusen sind nur zytoplasmatische Signale zu beobachten. Maßstableiste 100 μ m.

3.1.2 Makroskopische Analyse RelA/p65 defizienter *Kras*^{G12D}-Mäuse

Um den Einfluss der genetischen Inaktivierung von RelA/p65 auf morphologische Charakteristika des Pankreas in CK Mäusen zu untersuchen, wurden CK und CKA Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Bei der makroskopischen Analyse der Pankreata zum Zeitpunkt von 13 Wochen postpartum gewannen wir einen ersten Eindruck über das Ausmaß der pankreatischen Organentwicklung. Wie Abbildung 7A illustriert, ist das Pankreas der CK Mauslinie bereits nach 13 Wochen fibrotisch verändert. Interessanterweise entwickeln CKA Mäuse ein deutlich vergrößertes fibrotisches Pankreas. Das relative Pankreasgewicht wurde bei den jeweils fünf Tieren aus beiden Mausgruppen zu dem Zeitpunkt von 13 Wochen bestimmt (Abbildung 7B). CKA Mäuse wiesen signifikant höhere Werte als CK Tiere auf.

Zusammengefasst führte die funktionelle Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas von CKA Mäusen zur verstärkten Fibrosierung und signifikanten Organvergrößerung.

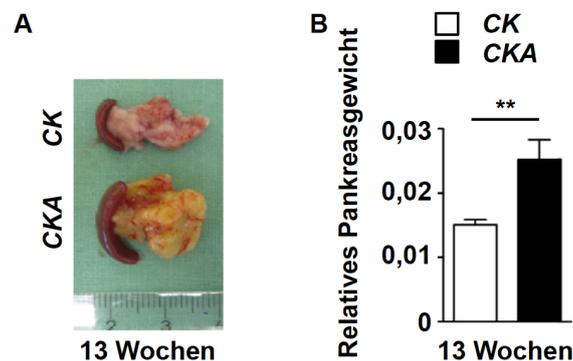


Abbildung 7: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 führt zur Pankreasvergrößerung

A: Makroskopische Bilder von Pankreata 13 Wochen alter CK und CKA Mäuse.

B: Darstellung des relativen Pankreasgewichts beider Mauslinien zum Zeitpunkt von 13 Wochen (* $p < 0,05$).

3.1.3 Untersuchungen zur Proliferation im Pankreas der *Kras*^{G12D}-Mauslinie mit pankreasspezifischer Inaktivierung von RelA/p65

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass der NF- κ B/Rel Signalweg an der Regulation der Immunantwort sowie an den Stress- und entzündlichen Reaktionen beteiligt ist (Luo et al., 2005). Des Weiteren spielen die Mitglieder von

NF- κ B bei der Regulation der Proliferation und Apoptose eine wesentliche Rolle (Karin et al., 2002; Kim et al., 2006; Baldwin, 2001). Wir untersuchten die Zellzyklus- und Proliferation-spezifische Faktoren in Mäusen beider Genotypen genauer.

Zur Charakterisierung der Proliferation wurden immunhistochemische Analysen beider Mauslinien durchgeführt und die Expression der Proliferation-assoziierten Proteine untersucht. Die Proliferation wurde durch den immunhistochemischen BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin)-Nachweis dargestellt. Da das Thymidin-Analogon BrdU während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA teilender Zellen integriert wird, fungiert dieser als Zellproliferationsmarker. Zur Bestimmung der Proliferation im Pankreas wurde den Versuchstieren eine Stunde vor der Sektion BrdU Lösung (50 μ g/g Mausgewicht) intraperitoneal injiziert. Dieses lässt sich immunhistochemisch anhand der Gewebeschnitten nachweisen. Proliferierende Zellen aus jeder Mauslinie zum Zeitpunkt von 9 Wochen wurden mittels Antikörper gegen BrdU gefärbt und ausgezählt. Bei dieser Auswertung war eine signifikante Zunahme in der Proliferation der azinären sowie duktaalen Zellen bei *CKA* Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen erkennbar (Abbildung 9A und 9B). Zudem zeigt Abbildung 9B eine signifikant verstärkte Cyclin D1 Expression in den 9 Wochen alten *CKA* Tieren. Cycline sind Proteine, die in der Regulation des Zellzyklus eine zentrale Rolle spielen. Für ihre enzymatische Aktivität ist eine Bindung mit Cyclin-abhängigen Kinasen erforderlich. Somit wird die Proliferation der Tumorzellen aktiviert. Der Nachweis der gesteigerten Zellproliferation in den 9 Wochen alten Mäusen ließ sich auch durch Western Blot Analysen zur Detektion der Cyclin D1 sowie PCNA Expression bestätigen. PCNA ist ein nukleär exprimiertes Protein, welches bei der DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt und damit als Marker der S-Phase verwendet werden kann. Wie Abbildung 9C darstellt, wurde eine höhere PCNA sowie Cyclin D1 Proteinmenge in Pankreata der *CKA* Mauslinie detektiert.

Daraus kann geschlossen werden, dass die pankreatische Inaktivierung von NF- κ B/RelA in *Kras*^{G12D}-Mäusen zur gesteigerten Proliferation führt.

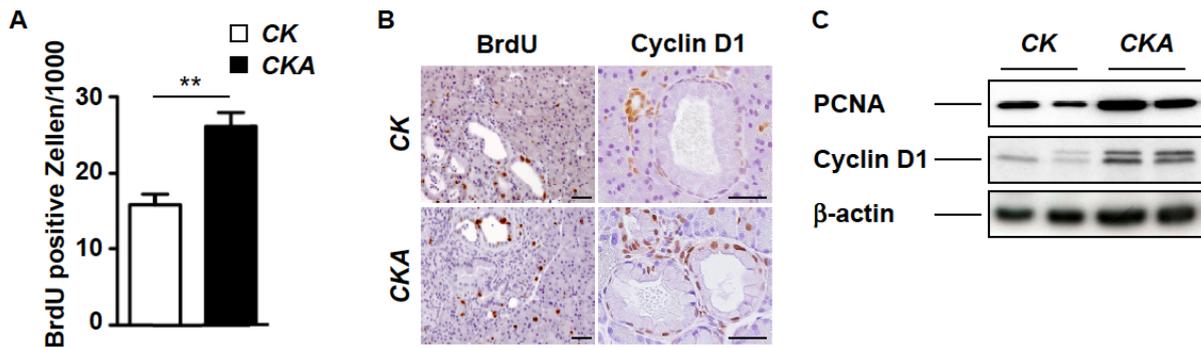


Abbildung 8: Einfluss von RelA/p65 auf die Proliferation im Rahmen der PanIN-Progression

A: Graphisch dargestellter Proliferationsindex (der Anteil BrdU-positiver Zellen pro 1000 Pankreaszellen). $**p < 0,005$.

B: Immunhistochemischer Nachweis der Proliferation mittels BrdU (Maßstableiste 100 μ M) und Cyclin D1 (Maßstableiste 50 μ M) im Pankreas der CK und CKA Mäusen..

C: Western Blot Analyse von Proteinlysaten aus CK und CKA Pankreata.

3.1.4 Einfluss der Deletion von RelA/p65 auf die PanIN-Progression im $Kras^{G12D}$ -Mausmodell

Im Folgenden evaluierten wir die Auswirkung einer funktionellen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Morphologie des exokrinen Pankreaskompartiments. Die Bauchspeicheldrüsen beider Mauslinien entwickeln zeitabhängig mPanINs mit 100 % Penetranz. Im Alter von 4 Wochen treten erstmalig die niedrig gradigen mPanIN-1A Läsionen und die reaktiven Ausführungsgänge auf.

Wie in Abbildung 9A dargestellt, zeigten *CKA* Mäuse einen signifikant zunehmenden Verlust von azinären Zellen, der ab der 9. Woche beginnt und sich mit der Zeit signifikant verstärkt. Mit 9 Wochen besteht die Pankreasfläche in *CKA* Mausgruppe zu 77 % \pm 16,06 aus azinären Strukturen (vs. 83 % \pm 7,52 in *CK* Mauslinie), die sich bei *CKA* Tieren im Alter von 18 Wochen auf ca. 7 % \pm 12,29 verringert (vs. 28 % \pm 15,15 in *CK* Mausgruppe). Unsere weiteren morphologischen Analysen zeigten zudem eine rapide Progression der dukталen Strukturen (Abbildung 9A). Bei Tieren der *CKA* Mauslinie war eine deutliche Vergrößerung der dukталen Gesamtfläche von etwa 14 % \pm 3,4 im Alter von 9 Wochen (vs. 11 % \pm 1,09 in *CK* Gruppe) auf 40 % \pm 2,09 mit 13 Wochen (vs. 14 % \pm 3,21 in Mauslinie) und bis zu 70 % \pm 13,83 bei 18-wöchigen Tieren (vs. 22 % \pm 5,85 in *CK* Mausgruppe) zu registrieren (Abbildung 9A). Die histologischen Bilder zeigen, dass die 9 bzw. 13 Wochen alten *CKA* Mäuse fortgeschrittene PanIN-2 und sogar PanIN-3-Läsionen in einem zunehmend fibrotisch

umgebauten Pankreas aufweisen, während in *CK* Pankreata zu diesen Zeitpunkten neben reaktiven Gängen nur einzelne PanIN-1A bzw. PanIN-1B Läsionen zu sehen sind (Abbildung 9B). Um die mPanIN Progression genauer zu untersuchen, haben wir entstandene Läsionen quantifiziert. Abbildung 9C zeigt die zunehmende Anzahl und Progression der mPanIN-Läsionen in 13 Wochen alten *CKA* Mäusen im Vergleich zu *CK* Mäusen.

Abbildung 9C zeigt eine hohe Gesamtzahl der mPanIN-1 Läsionen, obwohl die *CKA* Tiere im Vergleich zu den *CK* Mäusen fast die 3-fache Menge dieser Läsionen aufweisen ($2,27 \pm 0,44$ in *CKA* Pankreata vs. $0,76 \pm 0,09$ PanIN-1 Läsionen pro Gesichtsfeld bei *CK* Pankreata). Im Vergleich dazu war die Anzahl der fortgeschrittenen mPanIN Läsionen (PanIN-2 und PanIN-3) im Alter von 13 Wochen in beiden Fällen deutlich geringer, während wiederum im Fall der *CKA* Mauslinie ein klarer Anstieg in den mPanIN Läsionen im Vergleich zu der Kontrollmaus (*CK*) nachzuweisen war ($0,38 \pm 0,191$ PanIN-2 in *CKA* vs. $0,02 \pm 0,01$ PanIN-2 in *CK* und $0,1 \pm 0,06$ PanIN-3 in *CKA* vs. keine PanIN-3 Läsionen in *CK* pro Gesichtsfeld).

Um die duktaalen Strukturen der 18 Wochen alten *CK* und *CKA* Mäuse zu analysieren, führten wir zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit CK19 (Cytokeratin 19) und MUC5AC (Mucin 5) Antikörpern durch. Bei Cytokeratin 19 handelt es sich um einen duktaalen Epithelzellmarker. Dadurch wird der epitheliale Ursprung der untersuchten PanINs verifiziert. Mucin 5 ist ein muzinspezifisches Glykoprotein, das typischerweise in niedrig gradigen mPanINs, nicht aber in benachbarten azinären Zellen exprimiert wird. Erwartungsgemäß weisen Pankreata der in der Abbildung 9D exemplarisch dargestellten *CK* und *CKA* Mäuse CK19 exprimierende mPanIN Läsionen auf. Die Abbildung 9D zeigt auch, dass die MUC5AC positive Läsionen im Pankreas beider Mauslinien nachweisbar sind.

Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Daten herleiten, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA im *Kras*^{G12D}-Mausmodell zu einer altersabhängigen Beschleunigung der mPanIN-Progression in der *Kras*^{G12D}-vermittelten pankreatischen Onkogenese führt.

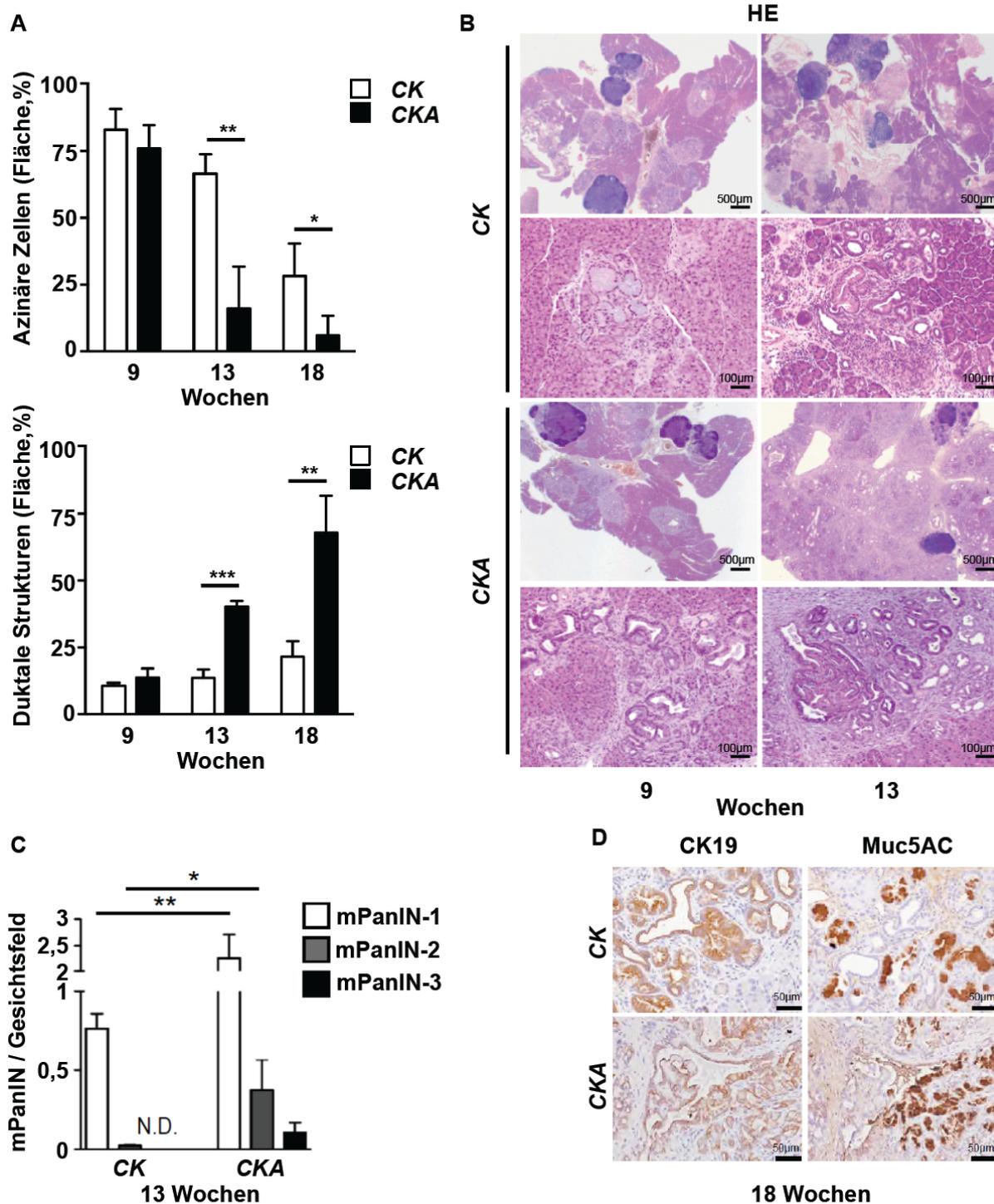


Abbildung 9: Morphologische Analyse der mPanIN Läsionen in RelA/p65-defizienten CKA Mäusen

A: Quantifizierung der duktaalen und azinären Strukturen (Fläche, %) bei 20facher Vergrößerung 9, 13 und 18 Wochen alter Tiere.

B: HE-Färbungen von Pankreata 9 und 13 Wochen alter Tiere. Maßstableisten 500 µm und 100 µm.

C: Verifizierung der mPanIN-Progression (PanIN-1,-2 und -3) zum Zeitpunkt von 13 Wochen. (N.D.=nicht detektierbar, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$)

D: Immunhistochemische Darstellung der veränderten Gänge mit CK-19 und MUC5AC Antikörper in Pankreas der 18 Wochen alten Tieren. Maßstableiste 500 µm.

3.1.5 Einfluss von RelA/p65 auf die Überlebensdauer, Tumorzinzidenz und Morphologie in der *Kras*^{G12D}-Mauslinie

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Deletion von RelA/p65 einen Einfluss auf die Überlebensdauer des *Kras*^{G12D}-Mausmodells hat. Dafür wurden zwei Mauskohorten angelegt und über mehrere Monate überwacht (Tabelle 1 und 2). Dies erfolgte von den erfahrenen Tierpflegern des Tierbereiches des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München. Wenn das Verhalten der Tiere bestimmte Merkmale wie Apathie, auffällige Aggressivität, Ausdruck starker Schmerzen etc. erfüllte, wurden Mäuse mittels Überdosierung einer Isofluran-Narkose unverzüglich getötet, die Organe wurden entnommen und analysiert. Anschließend konnten Tumorzinzidenz und Tumortalenzzeit bestimmt werden.

Abbildung 10A stellt die Überlebensanalyse beider Mauslinien dar. Die Überlebenskurven verliefen über eine Altersspanne praktisch linear, bevor sie ab dem Alter von zirka 150-190 Tagen kontinuierlich abfielen. Die Tiere der *CKA* Mauslinie lebten im Durchschnitt 381 Tage, was im Vergleich zu der mittleren Überlebensrate der Kontrolltieren *CK* mit 482 Tagen signifikant kürzer ist. Beim Vergleich beider Überlebenskurven wird deutlich, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 im *CK* Mausmodell für eine höhere Mortalität der *CKA* Mäuse verantwortlich ist. Die Tumorzinzidenz beschreibt die Prozentzahl der Tumorträger unter den untersuchten Mäusen in einer Versuchsgruppe. Bei der Untersuchung von 33 *CKA* Tieren und 23 *CK* Mäusen wurde ein statistisch signifikanter Effekt der funktionellen Inaktivierung von RelA/p65 im Pankreas der *CK* Mäusen auf die Tumorgenese festgestellt. 88 % der *CKA* Mäuse entwickelten Pankreastumore, die Gruppe der *CK* Kontrolltiere wies hingegen eine Tumorzinzidenz von 56,5 % auf (Abbildung 10B). Um den Einfluss von der pankreasspezifischen RelA/p65-Inaktivierung im *Kras*^{G12D}-Mausmodell weiter zu validieren, wurde die Tumortalenzzeit in beiden Mausgruppen (*CK* und *CKA*) analysiert. *CKA* Mäuse entwickelten früher Pankreaskarzinome (355,6 Tage in *CKA* vs. 438,3 Tage in *CK* Mausgruppe) (Abbildung 10C). Die Metastasierungsrate und der Differenzierungsgrad der entwickelten Pankreastumore wurden anhand histologischer Analysen bestimmt. Aus diesen Analysen konnte geschlossen werden, dass die Inaktivierung von RelA/p65 keinen Einfluss auf die Metastasierungsrate und die Differenzierung der Karzinome nimmt (Abbildung 10D, E).

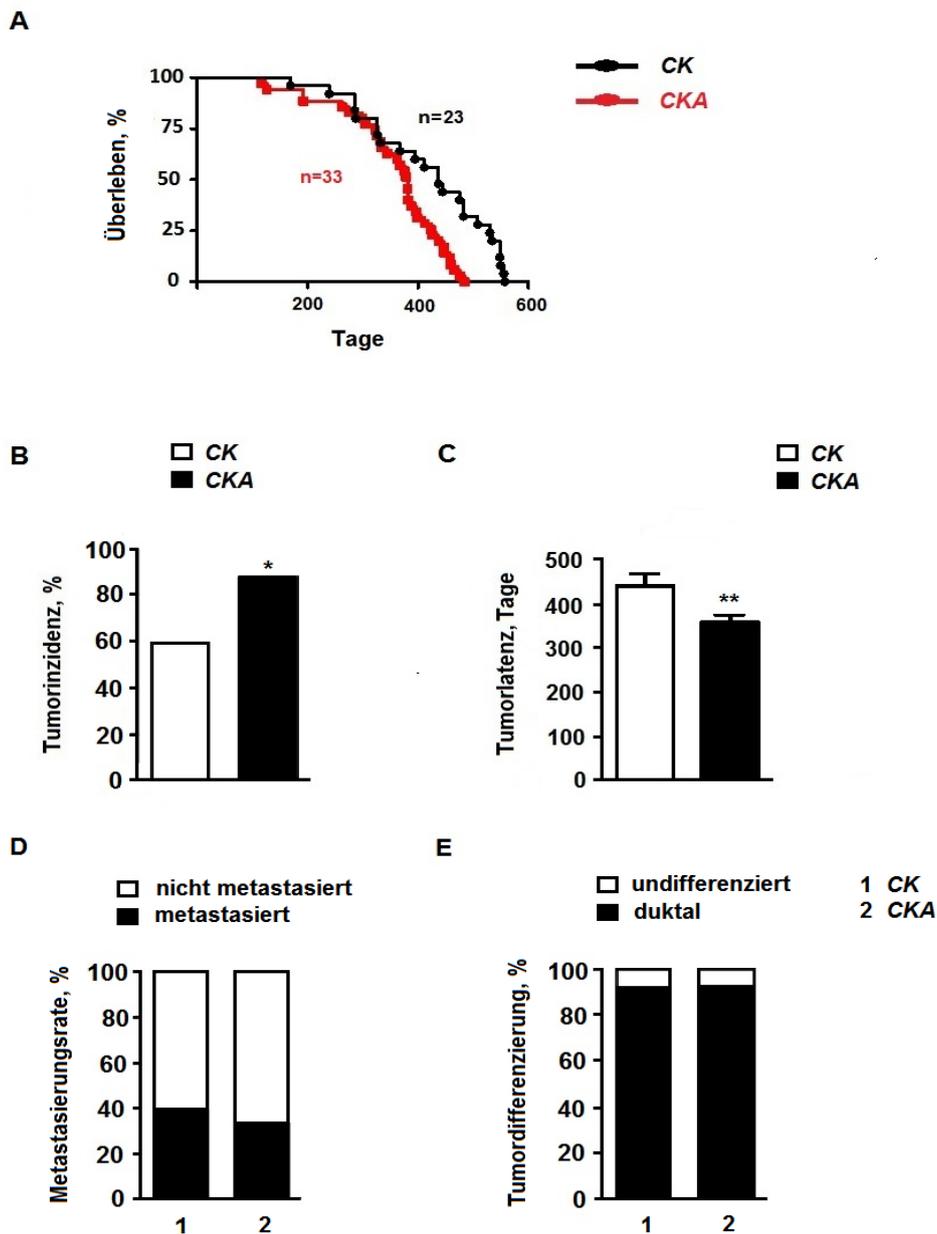


Abbildung 10: Einfluss der pankreasspezifischen RelA/p65 Deletion im *Kras^{G12D}*-Mausmodell auf pankreatische Karzinogenese

A: Überlebensanalyse beider Mauslinien. Das mediane Überleben der CKA Mäuse beträgt 381 Tage, die mediane Überlebensrate der Kontrolltiere macht 482 Tage aus. Y-Achse – Überlebenschance in Prozent (%), X-Achse – Alter der Tiere in Tagen (Kaplan-Meier-Kurve). *** $p < 0,0005$.

B: Bestimmung der Tumorinzidenz in beiden Mauskohorten. * $p < 0,05$.

C: Graphische Darstellung der Tumortalanzzeit in CK (428,3 Tage) und CKA (355,6 Tage) Kohorten. ** $p < 0,005$.

D: Metastasierungsrate in CK und CKA Kohorten.

E: Validierung der prozentuellen Häufigkeit der undifferenzierten Pankreastumoren im Vergleich zu den pankreatischen duktaalen Adenokarzinomen (PDAC) in beiden Mausmodellen

Zusammenfassend kann man aus diesen Daten folgern, dass die Mäuse mit der funktionellen RelA/p65 Inaktivierung ein hochsignifikant verkürztes Überleben, eine höhere Tumorinzidenz sowie eine niedrigere Tumortalanzzeit aufwiesen.

Als nächstes wurde eine morphologische Untersuchung von PDAC und Metastasen durchgeführt. In der repräsentativen HE-Färbung ergaben sich keine Hinweise auf morphologische Unterschiede des Pankreaskarzinoms zwischen CK und CKA Mauslinien (Abbildung 11A). Das abgebildete Pankreaskarzinom präsentiert sich als typisches duktales Adenokarzinom. Die immunhistochemische Färbung mit CK19 (Cytokeratin 19) bestätigt den duktafen Phänotyp des Karzinoms und der dargestellten Lebermetastase.

Die Proliferation der etablierten Pankreaskarzinome beider Mauslinien wurde mittels BrdU Inkorporation untersucht. Bei der Auswertung zeigte sich eine signifikante Abnahme (um 77 % niedriger) in der Proliferation der CKA Karzinomen im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 11B, C). Daraus kann geschlossen werden, dass die pankreatische Inaktivierung von RelA/p65 in *Kras*^{G12D}-Mäusen zur Reduktion der Proliferationsrate in den etablierten Karzinomzellen führt.

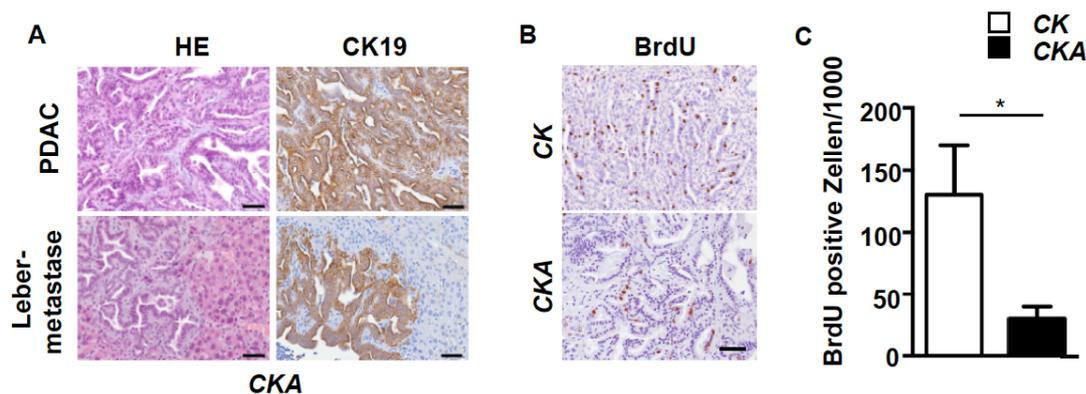


Abbildung 11: Rolle von RelA/p65 in der Karzinogenese des Pankreas

A: HE-Färbung sowie immunhistochemische Analyse mit CK-19 Antikörper von PDAC und einer Lebermetastase der CKA Mauslinie. Maßstableiste 50µm.

B: Immunhistochemischer Nachweis der Proliferation mittels BrdU im Pankreaskarzinom der CKA Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Maßstableiste 50µm.

C: Graphisch dargestellter Proliferationsindex, (* $p < 0,05$).

3.2 *In vitro* Analyse der pankreasspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 in der *Kras*^{G12D}-induzierten Karzinogenese des Pankreas

Um den Einfluss der gewebsspezifischen Inaktivierung von RelA/p65 auf die Zellproliferation im etablierten Tumor genauer analysieren zu können, haben wir Zellen aus Pankreaskarzinomen frisch isoliert.

Um nachzuweisen, dass die Pankreaskarzinome in CKA Mäusen aus RelA defizienten Zellen entstehen, haben wir aus den isolierten Karzinomzellen nukleäre Extrakte hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Diese Analysen zeigten, dass die Translokation von RelA/p65 in den Zellkern in den CK Zelllinien (#9907, #17207) intakt war (Abbildung 12A). In den CKA Zelllinien (#11521, #3590) hingegen konnte eine fehlende Expression von RelA/p65 im Zellkern nachgewiesen werden. Das Kernmembranprotein Lamin A/C war in allen Proteinlysaten äquivalent detektierbar. Damit konnte der nukleäre Ursprung der Lysate bewiesen werden. Als Reinheitskontrolle der Proben diente die Abwesenheit von β -Actin, einem ausschließlich zytoplasmatisch vorkommenden Protein. Somit konnten wir nachweisen, dass die Karzinome in der CKA Linie aus RelA-defizienten Zellen entstehen.

Bei Kultivierung von Zelllinien beider Genotypen konnte kein Unterschied im Differenzierungsgrad festgestellt werden. Alle Zelllinien zeigten eine epitheliale Morphologie mit einem fokalen Wachstum, welche eine Monolayerkultur ausbildeten. Um die Wachstumsgeschwindigkeit beurteilen zu können, wurden die Zellen ausgesät und nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden ausgezählt. In Abbildung 12B lässt sich erkennen, dass die Zellen des CKA Mausmodells (rot) zwar mit etwas unterschiedlicher Geschwindigkeit wachsen, aber eine deutlich reduzierte Proliferationsrate im Vergleich zu den Zellen der Kontrollmauslinie (schwarz) zeigen. Daher liegt die Annahme nahe, dass eine Inaktivierung des NF- κ B/RelA-Signalweges im Pankreas einer *Kras*^{G12D}-Mauslinie die Proliferation der RelA/p65-defizienten Tumorzellen hemmt. Mit unseren Daten konnten wir zeigen, dass die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA die Pankreaskarzinomentstehung beschleunigt, obwohl die Proliferation von RelA-defizienten Karzinomzellen signifikant niedriger ist.

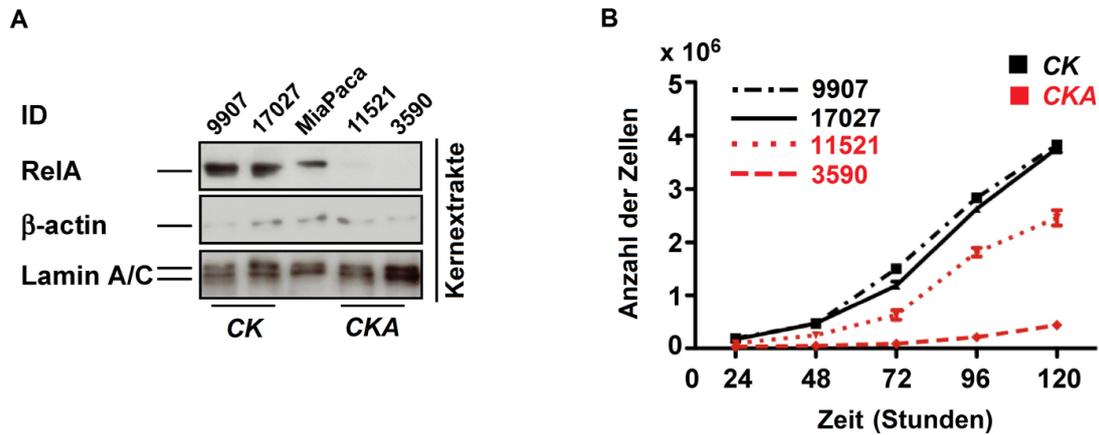


Abbildung 12: Charakterisierung der isolierten Zellen aus CK und CKA Karzinomen

A: Western Blot Analyse der gewonnenen Kernextrakte aus beiden Genotypen. Lamin A/C-Nachweis dient als Ladekontrolle für nukleäre Extrakte.

B: Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der Tumorzellen beider Mauslinien.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Analysen lassen darauf schließen, dass eine pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 im *Kras*^{G12D}-Mausmodell unerwartet zu einer Beschleunigung der PanIN-Progression und zur Akzeleration der Karzinomentstehung führt. *In vitro* übt die RelA/p65 Inaktivierung jedoch einen protektiven Effekt über das Wachstumsverhalten der *Kras*^{G12D}-Karzinomzelllinie aus. Die Mechanismen, über die RelA/p65 diesen Phänotyp vermitteln, müssen noch in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden.

4. Diskussion

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) ist eine maligne Erkrankung der Bauchspeicheldrüse mit sehr schlechter Prognose. Eine spezifische Therapie erfordert ein genaues Verständnis des zugrunde liegenden Pathomechanismus sowie Kenntnisse pathophysiologisch relevanter Signalwege, die das Krankheitsgeschehen beeinflussen, unabdingbar für eine korrekte Diagnosestellung sind und als Zielstrukturen pharmakologischer Behandlungen genutzt werden können.

Die Bedeutung und die tumorfördernde Wirkung des NF- κ B/Rel Signalweges für das Pankreaskarzinom belegen zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre (Daniluk et al., 2012; Ling, 2012; Maniati et al., 2011).

In dieser Arbeit wurde die Rolle der funktionellen Untereinheit RelA/p65 in der pankreatischen Onkogenese untersucht.

4.1 *Kras*^{G12D}-Mausmodell – ausgezeichnete Basis in der Erforschung des NF- κ B/Rel Signalwegs im Pankreaskarzinom

Da die pharmakologisch basierten Untersuchungen durch das Zusammenspiel diverser Signalwege oft die Interpretation der Ergebnisse erschweren, haben wir das NF- κ B-Effektorprotein RelA/p65 in einem genetischen *in vivo* Modell für das Pankreaskarzinom gewebespezifisch inaktiviert. Die *in vivo* Untersuchungen erlauben gegenüber den *in vitro* Analysen eine Beschreibung der Prozesse unter physiologischen Bedingungen. Ein Zusammenwirken der systemischen Einflüsse und organspezifischen Abläufe kann in *in vivo* Verhältnissen die Aussagekraft der Experimente erhöhen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche transgene Mausmodelle für das PDAC generiert, welche die wichtigen Schritte der Tumorgenese über die Entstehung prämaligener PanIN-Läsionen bis zur Entwicklung metastasierender Karzinome analog zur humanen Erkrankung widerspiegeln (Hingorani et al., 2003, 2005). Diese *in vivo* Modelle demonstrieren eindrucksvoll die Tumorinitiation durch aktivierende *Kras*-Mutationen die in ca. 30 % der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und in mehr als 90 % der fortgeschrittenen dukталen Adenokarzinomen des Pankreas detektiert werden können (Hruban et al., 2006). Das in der Arbeit

verwendete *Kras*^{G12D}-Mausmodell basiert auf der Glycin-zu-Aspartat-Punktmutation auf dem Kodon 12 des Exons 1 des *Kras* Gens, womit die Entwicklung aller PanIN-Stadien bis hin zu invasiven Karzinomen der Bauchspeicheldrüse der Maus induziert werden kann und dient als eine hervorragende Grundlage zur Erforschung der für PDAC relevanten Signalwege (Hingorani et al., 2003). Unsere Untersuchungen wie auch Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass die funktionelle Inaktivierung von RelA/p65 mittels Cre-loxP-Strategie im Pankreas die Entwicklung, die Morphologie und die Funktion des exokrinen sowie endokrinen Pankreas nicht beeinflusst (Krapp et al., 1998; Kawaguchi et al., 2002). Dieser Phänotyp blieb auch im fortgeschrittenen Alter der Mäuse erhalten (Algül et al., 2007a). Durch Kreuzung der *Kras*^{G12D}-Mauslinie und der Mauslinie mit pankreasspezifischer Inaktivierung von RelA/p65 haben wir ein Mausmodell entwickelt, das uns eine detaillierte Analyse zur Bedeutung von RelA/p65 in der pankreatischen Onkogenese erlaubte.

4.2 Rolle der transkriptionell relevanten Komponente des NF-κB/Rel Signalweges RelA/p65 in der pankreatischen Onkogenese

Der IKK/NF-κB/Rel-Signalweg hat in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Regulation von Proliferation, Nekrose, Apoptose und Inflammation im Gastrointestinaltrakt eine erhebliche Bedeutung (Eckmann et al., 2008; Karin, 2008). Der Endpunkt dieser Signalkaskade ist der Transkriptionsfaktor NF-κB/Rel, der eine Gruppe von fünf verschiedenen DNA-bindenden Proteinen darstellt. Diese bilden Dimere untereinander, wie z.B. einen prädominanten und ubiquitär vorkommenden Komplex aus RelA/p65 und p50. In den meisten Zellen ist dieser Komplex im Zytoplasma lokalisiert und an inhibitorische Proteine, IκBs gebunden. Der Signalweg wird insgesamt durch verschiedene IKK-Komplexe kontrolliert. Mithilfe dieser Komplexe können die freigesetzten Heterodimere in den Nukleus translozieren und dadurch die Transkription verschiedener Gene steuern. In einer kürzlich publizierten Studie wurde gezeigt, dass die pankreasspezifische Inaktivierung der im NF-κB Signalweg vorgeschalteten Proteine IKKβ eine tumorfördernde Wirkung nahe legt (Ling, 2012; Maniati et al., 2011). Da diese Kinasen über pleiotrope Effekte verfügen, haben wir explizit die Funktion der aktiven Transkriptionsuntereinheit RelA/p65 im Hinblick auf deren Bedeutung in der pankreatischen Onkogenese analysiert.

Aufgrund der Erkenntnisse wurde in den letzten Jahren eine differenzierte Analyse zur Bedeutung und Funktion des NF- κ B/Rel Signalweges vorgenommen. Die Untersuchungen sind u.a. mit Hilfe der pankreasspezifischen, genetischen Inaktivierung des NF- κ B durchgeführt. Mehrere Studien beschäftigten sich explizit mit der Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges. Tatsächlich wurde konstitutive NF- κ B-Aktivität in verschiedenen soliden Tumoren u.a. des Verdauungstraktes, hepatozellulären Karzinoms, Melanoms, Lungenkarzinoms etc. und in hämatologischen Malignomen wie dem Lymphom, im Gegensatz zu normalen Körperzellen, dokumentiert (Keutgens et al., 2006; Sethi et al., 2008). Auch weitere zahlreiche Untersuchungen belegen die konstitutive Aktivierung von NF- κ B sowohl in humanem Pankreasadenokarzinomgewebe als auch in Pankreaskarzinomzelllinien (Wang et al., 1999). Die genauen Mechanismen, über die NF- κ B zur Entstehung sowie Weiterentwicklung des PDAC beiträgt, sind bis dato noch ungewiss (Caldwell et al., 2012; Collado et al., 2005; Guerra et al., 2011; Lee und Bar-Sagi, 2010). Die meisten Studien demonstrierten eine Rolle als Protonkogen, dessen Aktivität zur Karzinomprogression beiträgt (Ben-Neriah und Karin, 2011; Klein und Ghosh, 2011). Unsere Analysen beweisen hingegen, wie bereits auch in Tumormodellen der Haut, Leber oder des lymphatischen Systems gezeigt wurde, die protektive tumorsuppressive Wirkung des aktivierten IKK/NF- κ B/Rel Signalweges in der Onkogenese des Pankreas (Chien et al., 2011, Jing et al., 2011, Dajee et al., 2003; Maeda et al., 2009).

Die Untersuchungen an einem Mausmodell für Lymphoma zeigen, dass der NF- κ B/RelA Signalweg für die Induktion der zytotoxischen chemotherapiebedingten Seneszenz in Lymphomen erforderlich ist und somit die tumorsuppressive Wirkung verstärkt (Chien et al., 2011; Jing et al., 2011). Maeda und Kollegen beobachteten eine protektive Wirkung des aktivierten Signalweges in der Leber, indem die Progression der Lebermetastasen durch die NF- κ B abhängige IL-6 Expression kontrolliert wurde (Maeda et al., 2009). Zudem prädisponierte die murine Haut unter Blockade von NF- κ B zum Plattenepithelkarzinom (Dajee et al., 2003). Die Rolle von NF- κ B in der Tumorprogression könnte mit den Veränderungen im Mikromilieu des Tumors gekoppelt werden (Dajee et al., 2003; He und Karin, 2011).

Ausgehend von diesen Ergebnissen spielt der konstitutiv aktive NF- κ B/RelA Signalweg eine deutlich komplexere Rolle in der Onkogenese der soliden Tumoren.

Zum Einen fördert er die Onkogenese, zum Anderen übernimmt er die Rolle des Tumorsuppressors.

Zum ersten Mal wurde die transkriptionell relevante Komponente des NF- κ B Signalweges RelA im Pankreaskarzinom genetisch untersucht. In den hier vorgenommenen Analysen belegen die Daten, dass RelA-defiziente *Kras*^{G12D}-Mäuse (CKA) tatsächlich rascher die präneoplastische Läsionen bis hin zu PDAC im Vergleich zu Kontrolltieren, *Kras*^{G12D}-Mauslinie (CK), entwickeln. Die Tumorzinzidenz steigt und das Überleben dieses Mausmodells ist vermindert. Die Proliferation von Tumorzellen in etablierten Tumoren ist hingegen in CKA Mäusen niedriger. *In vitro* beobachteten wir auch eine Verminderung des Zellwachstums von CKA Zellen. Die Proliferationsrate der *Kras*^{G12D}-Zellen mit RelA-Inaktivierung zeigte sich deutlich verlangsamt.

Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, die die Beteiligung des NF- κ B Signalweges und seiner Mitglieder an der Proliferation der Tumorzellen darlegen (Kim et al., 2006). NF- κ B kann durch die Bindung an den Promoter des zellzyklusrelevanten Gens von Cyclin D1 die Transkription regulieren. Durch die Überexpression von Cyclin D1 wird mittels Inaktivierung von Retinoblastom die Transition von der G1- in die S-Phase beschleunigt (Yang et al., 2010). Störungen in der NF- κ B Aktivierung führen zu einem verlangsamten Zellzyklus und somit zu einer Reduktion der Proliferationsaktivität. Zusammenfassend führt die pankreasspezifische Inaktivierung von RelA zur Progression des Pankreaskarzinoms *in vivo* und die Mikroumgebung scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen. Die seit längerem bekannte proonkogene Funktion des NF- κ B/Rel haben wir mit einer neuen tumorunterdrückenden Funktion im Rahmen der pankreatischen Onkogenese ergänzt.

Die Vorgänge, über die NF- κ B/Rel protektive Funktion in der Entwicklung des Pankreaskarzinoms ausübt, sind bisher unklar. Es ist aber bekannt, dass es eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der adaptiven und angeborenen Immunantwort einnimmt. Zu den bekanntesten Zielgenen von NF- κ B gehören Wachstumsfaktoren, Regulatoren der Apoptose, Chemokine, weitere Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren (Tergaonkar, 2006). Somit reguliert dieser Transkriptionsfaktor samt seiner Untereinheiten tumorrelevante Eigenschaften, wie gesteigerte Proliferation, Invasion sowie Apoptoseresistenz (Caamano und Hunter, 2002).

Der Grund für seine Aktivität in Tumorzellen ist nicht bis ins Detail bekannt, aber es werden verschiedene Mutationen, verstärkte Aktivität des Proteasoms oder verstärkte inflammatorische Zytokinexpression als Gründe vermutet. Zu den Zielgenen gehören Gene von Proteinen, die die Proliferation (c-myc, Cyclin D1, Ku70), die Invasion und Metastasierung regulieren (MMP2, VEGF, E-Selektin) sowie Proteine, die für Suppression der Apoptose (Bcl-2, Bcl-xL, Xiap) und für die Inflammation (TNF, COX2, MCP-1, E-Selektin) verantwortlich sind (Baldwin, 2001; Kim et al., 2006).

Die genetisch-basierten Daten unserer Arbeitsgruppe bestätigten die bisher aus den Studien der letzten Jahre entstandene Annahme, dass genau die Azinuszelle der Ausgangspunkt der frühen NF- κ B/Rel Aktivierung ist (Rakonczay et al., 2008). Wir vermuten, dass Microenvironment sowie zelluläre Seneszenz für die pankreatische RelA/p65 Aktivierung sowie Ausübung dessen protektiver Effekte eine entscheidende Rolle spielen.

4.2.1 Microenvironment: Interaktion der Tumorzelle mit dem Stroma

Eine der charakteristischen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms ist die desmoplastische Stromareaktion. Die Komponenten dieses Gewebes, das den Raum zwischen neoplastischen Strukturen ausfüllt, sind unter anderem Fibroblasten, pankreatische Sternzellen („pancreatic stellate cells“, PSC) sowie Zellen des Immunsystems, darunter Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen, die Chemokine sowie Zytokine freisetzen (Algül et al., 2007b). PSC sind Myofibroblasten, die im Ruhezustand ca. 4% der Pankreaszellpopulation ausmachen. Nach Aktivierung durch verschiedene Stimuli, wie z.B. der inflammatorischen Reaktion im Rahmen einer chronischen Pankreatitis, vermehren sie sich und sind den Pankreaskarzinomzellen beim PDAC dann zahlenmäßig überlegen (Chu et al., 2007; Bachem et al., 2006). Aktivierte PSC können große Mengen an ECM (extrazelluläre Matrix) und inflammatorischen Signalmolekülen produzieren. Darüber hinaus ist es gelungen, einen synergetischen Zusammenhang zwischen PSC und Pankreaskarzinomzellen nachzuweisen. PSC lassen sich durch Pankreaskarzinomzellen *in vitro* aktivieren. Somit entsteht eine positive Rückkopplung und die Vermutung, dass PSCs eine entscheidende Rolle in der entzündungsassoziierten Karzinogenese spielen (Chu et al., 2007).

Das Zusammenspiel der Tumorzellen mit dem desmoplastischen Stroma wird am Ehesten auf para- und autokrine Weise samt verschiedener Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine etc. reguliert.

Treiber und Kollegen beschrieben zum ersten Mal die Kompartiment-spezifische Rolle von RelA/p65 in der chronischen Pankreatitis, indem sie nachweisen konnten, dass Fibrosebildung von der RelA/p65 Aktivierung in Makrophagen, nicht aber von der im Pankreas abhängig ist (Treiber et al., 2011). Das Mikromilieu inflammatorischer Gewebe produziert konsekutiv hohe Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Diese kurbeln die Proliferation von epithelialen Zellen an und sind an der Chemotaxis der Entzündungszellen sowie an der Expression von der Zelladhäsionsmolekülen beteiligt (Garcea et al., 2005). Ca. 55% der Pankreaskarzinompatienten zeigen einen erhöhten Serumspiegel von IL-6. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte, ob möglicherweise Zellen in der Umgebung der PanIN-Läsionen in *Kras*^{G12D}-Mäusen für die Produktion Stat3-aktivierenden IL-6 verantwortlich sind. Tatsächlich wurden die infiltrierenden Makrophagen als Quelle der IL-6-Expression detektiert (Lesina et al., 2011). Auch in den durchgeführten Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die *in vivo* von der *in vitro* Zellproliferation der untersuchten Mausmodelle signifikant unterscheidet (vergleiche Abschnitte 3.1 und 3.2). Dies bekräftigt die Vermutung, dass die Aktivierung des *in-vivo*-Modells der pankreatischen Onkogenese eben nicht über zell-autonome Mechanismen, sondern über eine direkte Interaktion zwischen *Kras*^{G12D}-exprimierenden Zellen und umgebenden Entzündungszellen (u.a. Makrophagen) als Teil des desmoplastischen Stromas erfolgt. Aufgrund des beschriebenen Sachverhaltes ist es denkbar, dass eine frühe pankreatische RelA/p65 Aktivierung im *Kras*^{G12D}-Tumormodell in enger Verbindung mit der inflammatorischen Stromareaktion steht. Die genaue Beleuchtung der Rolle dieser Mechanismen bietet somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt zu weiteren Analysen.

4.2.2 Rolle von Onkogen-induzierter Seneszenz im Pankreaskarzinom

Durch die in unserer Arbeitsgruppe neu gewonnenen Erkenntnisse wird es deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) und Aktivierung des RelA-abhängigen Signalwegs bestehen könnte. In den neueren

Studien wird ebenfalls angedeutet: Seneszenz beeinflusst die degenerativen sowie hyperplastischen Veränderungen am ehesten durch die Unterstützung der chronischen Inflammation (Campisi, 2013). Da zu den Zielgenen des RelA/p65 solche gehören, die Immunantwort, entzündliche Reaktionen, Proliferation der Zellen und Regulation der Apoptose steuern, besteht folglich ein Zusammenhang zwischen OIS und dem IKK/NF- κ B/Rel-Signalweg.

Seneszenz-Reaktion oder auch Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) ist ein potenter tumorsuppressiver Mechanismus, der in einer Zelle zum Proliferationsarrest führt und das Wachstum verschiedener Tumore, einschließlich PDAC, verhindert. Daher ist es ein Teil der natürlichen Barriere gegen unkontrollierte Zellvermehrung, die im Rahmen der Malignomentwicklung beobachtet wird (Grimes und Chandra, 2009). Aktivierte Seneszenz stoppt den Zellzyklus, die Zellen können nicht mehr proliferieren, sind aber im Gegensatz zur Apoptose metabolisch aktiv. Seneszente Fibroblasten zum Beispiel sekretieren große Mengen an Matrixmetalloproteasen, epithelialen Wachstumsfaktoren sowie entzündungs-fördernden Cytokinen und Chemokinen (Krtolica und Campisi, 2002). Die löslichen Faktoren werden zusammen als „Seneszenz-assoziiertes sekretorisches Phänotyp“ (SASP) bezeichnet. Die meisten werden durch NF- κ B reguliert (Coppe et al., 2010; Coppe et al., 2008; Young und Narita, 2009). Hinweise dafür lieferten auch weiterführende Untersuchungen von Freund und Campisi, durch die Feststellung einer signifikanten Verringerung des sekretorischen SASP-Pegels durch NF- κ B Inaktivierung (Davalos et al., 2010). Die SASP-Faktoren verstärken den Seneszenz-Effekt (=Arrest) und lösen die Immunüberwachung der seneszenten Zellen aus (Chein et al., 2011).

Seneszente Zellen können in gutartigen Gewebsveränderungen nachgewiesen werden, jedoch nicht in bösartigen Tumoren (Caldwell et al., 2012). So wurden reichlich seneszente Zellen in prä-malignen Läsionen der Haut, Lunge und Pankreas detektiert, diese aber selten in den malignen Kompartimenten der gleichen Tiere (Collado et al., 2005). Das lässt annehmen, dass Seneszenz die Entstehung von Karzinomen gerade in frühen Stadien stoppen kann.

Im *Kras*^{G12D}-Modell treten während der Tumorentwicklung von PanIN 1-3 bis zum Pankreaskarzinom noch zusätzliche Mutationen der wichtigen Tumorsuppressorgene wie *p16*, *p53* oder *SMAD4* auf (Hruban et al., 2000). Ferner wird angenommen, dass OIS bereits in PanIN-1 unter bestehender *Kras*-Mutation, aber noch vor der Entstehung der *p16*- und *p53*-Mutationen aktiviert ist (Caldwell et al., 2012). Dafür

sprechen auch die weiteren Erkenntnisse: Zellen der malignen Tumoren sind durch den Verlust der OIS Effektoren, wie z.B. p53, nicht der Seneszenz unterzogen. Auch die in PanIN mit *Kras*^{G12D}-Aktivierung detektierte OIS-Blockade basiert auf einer intakten p21-p53 Achse (Morton et al., 2010). Die neueren Studien haben belegt, dass NF-κB mit p53 zusammenwirkt, um Seneszenz durch SASP-Regulierung *in vivo* zu fördern. Ferner interagiert RelA/p65 mit p53 und der RelA/p53-Komplex trägt seinerseits zur Aktivierung der NF-κB Zielgene bei (Barre und Perkins, 2007; Schneider et al., 2010; Schneider und Krämer, 2011). Somit scheint der RelA/p53-Komplex die Transkription von SASP zu regulieren und somit die *Kras*^{G12D}-abhängige Karzinogenese in der Bauchspeicheldrüse zu behindern. Daher liegt die Vermutung nahe, dass RelA/p65 durch die Regulation von SASP und die Induktion von OIS die PanIN-Progression hemmt.

Die genauen Mechanismen, die zur Induktion und Aufrechterhaltung der zellulären Seneszenz führen, sind noch in der Diskussion. Wir sehen in der Seneszenz einen wegweisenden Schlüssel für diagnostische und prognostische Merkmale, aber auch für neue Therapien in der pankreatischen Onkogenese.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Tumorerkrankung mit später Diagnosestellung, frühzeitiger Metastasierung und der auch aus diesen Gründen geringer Zahl kurativer Resektionen. Für die Optimierung der Therapie sind neue und detaillierte Kenntnisse der biologischen Prozesse (u.a. Aktivierung des IKK-abhängigen NF- κ B/Rel Signalweges) in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms notwendig.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle des IKK/NF- κ B/Rel Signalweges und explizit die Bedeutung dessen Inaktivierung im Rahmen der pankreatischen Onkogenese charakterisiert werden.

Für die biochemischen und molekulargenetischen experimentellen Untersuchungen verwendeten wir das *Kras*^{G12D}-Mausmodell. Die *Kras*^{G12D}-Mäuse entwickeln zeitabhängig präneoplastische Läsionen im Pankreas, die mit den humanen PanINs identisch sind (Hingorani et al., 2003). Unter Verwendung gentechnologischer Methoden erfolgte die *in vivo* Charakterisierung von RelA/p65 im pankreatischen duktalem Adenokarzinom.

Die doppelgesichtige Funktion des IKK/NF- κ B/Rel Signalweges wurde in mehreren experimentellen Untersuchungen der letzten Jahre detektiert (Klein und Ghosh, 2011; Perkins, 2004; Burgess, 2011). Auf der Grundlage unserer Ergebnisse konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung der IKK/NF- κ B/Rel Signaltransduktion eine protektive tumorsuppressive Wirkung ausübt, indem die RelA die PanIN-Progression im Pankreas hemmt. Somit geben unsere Ergebnisse wertvolle Einblicke in die komplexen Mechanismen der NF- κ B Regulation.

Damit ist jeder therapeutische Versuch, die nukleäre Translokation von RelA/p65 im Pankreas zu verhindern mit erheblichen Komplikationen verbunden. Daher wird die genaue Untersuchung der kontextabhängigen RelA Aktivität für den effektiven klinischen Einsatz von NF- κ B-Inhibitoren wichtig, insbesondere für die Entwicklung von spezifischen und effizienten Krebstherapien.

Tabelle 4: Klinisches Spektrum der Erkrankung bei CK Mäusen.

Maus (Nummer)	Alter (Tage)	PDAC	Histologie	Leber	Lunge	Zwerchfell	Aszites	Sonstige
471	734	N		N	N	N	N	pC
873	530,0	J	U	J ^M	N	N	J	
909	437,0	N		N	N	N	N	pC
910	437,0	N		N	N	N	N	
953	169,0	J	G	N	N	N	N	
4552	482,0	J	G	J ^M	J ^M	J ^M	J	
9903	287,0	N		N	N	N	N	
9907	444,0	J	G	J ^M	N	N	J	
11091	534,0	N		N	N	N	N	
12964	549,0	J	G	J ^M	N	N	N	pLN
14128	482,0	J	G	N	N	N	N	
16069	367,0	J	G	N	N	N	N	
17024	555,0	J	G	J ^M	J ^M	N	J	
17027	239,0	J	G	J ^M	N	J ^M	J	
17121	508,0	N		N	N	N	N	
17240	475,0	J	G	J ^M	J ^M	N	J	
18574	411,0	N		N	N	N	N	
18984	394,0	N		N	N	N	N	
19086	557,0	N		N	N	N	N	
19088	332,0	J	G	J ^M	N	N	N	
78	285,0	J	G	N	N	N	J	
17335	548,0	J	G	J ^M	N	N	J	
6168	326,0	N		N	N	N	N	
Gesamt		13/23		9/23	3/23	2/23	8/23	

Tabelle 5: Klinisches Spektrum der Erkrankung bei CKA Mäusen.

Maus (Nummer)	Alter (Tage)	PDAC	Histologie	Leber	Lunge	Zwerchfell	Aszites	Sonstige
11098	367,0	Y	G	J ^M	J ^M	N	J	
8774	476,0	Y	G	N	N	N	N	
11095	382,0	Y	G	N	N	N	N	
11096	382,0	Y	G	J ^M	N	J ^M	J	
10655	396,0	Y	G	N	N	J ^M	J	
6842	305,0	Y	G	N	N	N	N	
6849	262,0	Y	G	N	N	N	N	
6067	299,0	Y	G,S	J ^M	J ^M	J ^M	J	pC
7050	192,0	Y	G	N	N	N	N	
7053	192,0	Y	G	N	N	N	N	
7059	398,0	Y	G	N	N	N	N	pC
3590	437,0	Y	G	J ^M	N	N	J	
7060	332,0	Y	G	J ^M	N	N	J	pC
7690	275,0	Y	G	J ^M	N	J ^M	J	
7699	126,0	Y	G	N	N	N	N	
5772	447,0	Y	G,S	J ^M	N	N	N	pC
12970	378,0	Y	G	N	N	N	J	pC
11271	362,0	Y	G	N	N	N	J	pC
11521	459,0	Y	G	J ^M	N	N	J	
11525	458,0	N		N	N	N	N	pC
12955	322,0	Y	G	N	N	N	N	pC
6295	426,0	N		N	N	N	N	pC
8761	375,0	Y	G	N	N	N	N	pC
10656	381,0	Y	G	J ^M	N	N	J	
10657	466,0	N		N	N	N	N	pC
10662	446,0	Y	G	N	N	N	N	pC
139	344,0	Y	G	J ^M	N	J ^M	J	
144	117,0	Y	G	N	N	N	N	
4810	324,0	Y	G	J ^M	N	N	J	
9914	381,0	Y	G	N	N	N	N	
8763	333,0	N		N	N	N	N	pC
12285	412,0	Y	G	N	N			
9923	484,0	Y	G	N	N	N	N	

Gesamt		29/33		11/33	2/33	5/33	13/33	
---------------	--	--------------	--	--------------	-------------	-------------	--------------	--

pLN (peripankreatische Lymphknoten), **M** (Metastasierung), **pC** (pankreatische Zyste), **U** (undifferenziert), **G** (glandulär), **S** (sarkomatoid), **J** (Ja), **N** (Nein).

6. Literaturverzeichnis

Aaronson, D. S., Curt, M., Horvath, C.M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 1653-1655.

Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., and DePinho, R. A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 17(24), 3112-3126.

Algül, H., Treiber, M., Lesina, M., Nakhai, H., Saur, D., Geisler, F., Pfeifer, A., Paxian, S., and Schmid, R. M. (2007a). Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *The Journal of clinical investigation* 117, 1490-1501.

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

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53, 549- 554.

Arsura, M., Mercurio, F., Oliver, A. L., Thorgeirsson, S. S., and Sonenshein, G. E. (2000). Role of the I κ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 20, 5381-5391.

Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y., and Kunihiro Tamaki, K. (2004). Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Involved in α 2(I) Collagen Gene Expression in Normal and Scleroderma Fibroblasts. *J Immunol* 172, 7123-7135.

Bachem, M. G., Zhou, Z., Zhou, S., and Siech, M. (2006). Role of stellate cells in pancreatic fibrogenesis associated with acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 21 *Suppl* 3, 92-96.

Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *The Journal of clinical investigation* 107, 241-246.

Barré, B., and Perkins, N. D. (2007). A cell cycle regulatory network controlling NF- κ B subunit activity and function. *The EMBO Journal* 26(23), 4841–4855.

Ben-Neriah, Y., and Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology* 12, 715–723.

Berger, D. H., Chang, H., Wood, M., Huang, L., Heath, C. W., Lehman, T., Ruggeri, B. A. (1999). Mutational activation of K-ras in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer* 85, 326-332.

Boeck, S., Stieber, P., Holdenrieder, S., Wilkowski, R., Heinemann, V. (2006). Prognostic and therapeutic significance of carbohydrate antigen 19-9 as tumor marker in patients with pancreatic cancer. *Oncology* 70, 255-264.

- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689.
- Burgess, D. J. (2011). Senescence. NF-κB shows its beneficial side. *Nat Rev Cancer* 11(12), 832-833.
- Caldas, C., Hahn, S. A., da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J., and Kern, S. E. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature genetics* 8, 27-32.
- Caldwell, M., DeNicola, G., Martins, C., Jacobetz, M., Maitra, A., Hruban, R., and Tuveson, D. (2012). Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene*, 31(12), 1599–1608.
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 685–705.
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., and Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development* 25(20), 2125–2136.
- Chu, G. C., Kimmelman, A. C., Hezel, A. F., DePinho, R. A. (2007). Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem.* 101(4), 887-907.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Conlon, K. C., Klimstra, D. S., Brennan, M. F. (1996). Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 223, 273–279.
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., et al. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology* 6(12), e301.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology* 5, 99–118.
- Dajee, M., Lazarov, M., Zhang, J. Y., Cai, T., Green, C. L., Russell, A. J., Marinkovich, M. P., Tao, S., Lin, Q., Kubo, Y., and Khavari, P. A. (2003). NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 421, 639-643.
- Daniluk, J., Liu, Y., Deng, D., Chu, J., Huang, H., Gaiser, S., Cruz-Monserrate, Z., Wang, H., Ji, B., and Logsdon, C. D. (2012). An NF-kappaB pathway-mediated

positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *The Journal of clinical investigation* 122, 1519-1528.

Davalos, A. R., Coppe, J.-P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews* 29(2), 273–283.

Erbar, P. (2002). *Onkologie Compact Lehrbuch*.

Eckmann, L., Nebelsiek, T., Fingerle, A. A., Dann, S. M., Mages, J., Lang, R., Robine, R., Kagnoff, M. F., Schmid, R. M., Karin, M., Arkan, M. C., and Greten, F. R. (2008). Opposing functions of IKK β during acute and chronic intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15058–15063.

Friess, H., Wang, L., Zhu, Z., Gerber, R., Schröder, M., Fukuda, A., and Büchler, M. W. (1999). Growth Factor Receptors Are Differentially Expressed in Cancers of the Papilla of Vater and Pancreas. *Annals of Surgery* 230(6), 767.

Garcea, G., Dennison, A. R., Steward, W. P., et al. (2005). Role of inflammation in pancreatic carcinogenesis and the implications for future therapy. *Pancreatology* 5, 514-529.

Gerdes, B., Ramaswamy, A., Kersting, M., et al. (2001) p16(INK4a) alterations in chronic pancreatitis-indicator for high risk lesions for pancreatic cancer. *Surgery* 129, 490-497.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). <http://gekid.de/studies.html> (abgerufen am 12.09.2017).

Glimelius, B., Hoffman, K., Sjoden, P. O., Jacobsson, G., Sellstrom, H., Enander, L. K., Linne, T., and Svensson, C. (1996). Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 7, 593-600.

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285-296.

Grimes, A., and Chandra, S. B. C. (2009). Significance of Cellular Senescence in Aging and Cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 41(4), 187–195.

Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A. J., Hernández-Porras, I., Hamacher, R., Schmid, R. M., Saur, D., and Schneider, G. (2008). Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer* 7, 64.

Hart, A. R., Kennedy H., Harvey, I. (2008). Pancreatic Cancer: A Review of the Evidence on Causation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Volume 6, Issue 3, 275–282.

Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

He, G., and Karin, M. (2011). NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research* 21(1), 159–168.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*, 334(Pt 2), 297–314.

Herold, G. (2015). Herold Innere Medizin. Selbstverlag, Köln.

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

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell* 4, 437-450.

Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., and Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7(5), 469-483.

Hoess, R. H., and Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of molecular biology* 181, 351-362.

Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.

Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., et al. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25, 579-586.

Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Anver, M. R., Biankin, A. V., Boivin, G. P., Furth, E. E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D. S., et al. (2006). Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer research* 66, 95–106.

Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2969-2972.

Jackson, E. L., Wills., N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development* 15(24), 3243-3248.

Jing, H., Kase, J., Dörr, J. R., Milanovic, M., Lenze, D., Grau, M., et al., (2011). Opposing roles of NF- κ B in anti-cancer treatment outcome unveiled by cross-species investigations. *Genes & Development* 25(20), 2137–2146.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P.,

- Kinzler, K. W., et al. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* 321, 1801–1806.
- Kadesch, T. (2004). Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev.* 14(5), 506-512.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2, 301-310.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Karin, M. (2008). The I kappa B kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 18, 334-342.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., and Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics* 32, 128-134.
- Keutgens, A., Robert, I., Viatour, P., Chariot, A. (2006). Deregulated NF-kappaB activity in haematological malignancies. *Biochem Pharmacol.* 72(9), 1069-1080.
- Kim, H. J., Hawke, N., and Baldwin, A. S. (2006). NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell death and differentiation* 13, 738-747.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285(1-2), 1-24.
- Klein, U., and Ghosh, S. (2011). The Two Faces of NF-κB Signaling in Cancer Development and Therapy. *Cancer Cell* 20(5), 556–558.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal* 351, 289–305.
- Krapp, A., Knofler, M., Ledermann, B., Burki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbuchle, O., and Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development* 12, 3752-3763.
- Krtolica, A., Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(11), 1401-1414.
- Lee, Y. T., Tatter, D. (1984). Carcinoma of the pancreas and periampullary structures. Pattern of metastasis at autopsy. *Arch Pathol Lab Med* 108, 584-587.
- Lee, K. E., and Bar-Sagi, D. (2010). Oncogenic KRas suppresses inflammation-associated senescence of pancreatic ductal cells. *Cancer Cell* 18(5), 448–458.
- Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., et al. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell* 19, 456-469.

- Ling, J., Kang, Y., Zhao, R., Xia, Q., Lee, D.-F., Chang, Z., et al. (2012). Kras^{G12D}-Induced IKK2/β/NF-κB Activation by IL-1α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, *21*(1), 105–120.
- Liptay, S., Weber, C. K., Ludwig, L., Wagner, M., Adler, G., and Schmid, R. M. (2003). Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *Int J Cancer* *105*, 735-746.
- Luo, J. L., Kamata, H., and Karin, M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death - a new approach to cancer therapy. *The Journal of clinical investigation* *115*, 2625-2632.
- Maeda, S., Hikiba, Y., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Hirata, Y., Hayakawa, Y., Yanai, A., Ogura, K., Karin, M., and Omata, M. (2009). Ikappa B kinaseβ/nuclear factor-κB activation controls the development of liver metastasis by way of interleukin-6 expression. *Hepatology* *50*, 1851–1860.
- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., and Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* *16*, 902-912.
- Maniati, E., Bossard, M., Cook, N., Candido, J. B., Emami-Shahri, N., Nedospasov, S. A., Balkwill, F. R., Tuveson, D. A., and Hagemann, T. (2011). Crosstalk between the canonical NF-kappaB and Notch signaling pathways inhibits Ppargamma expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *The Journal of clinical investigation* *121*, 4685-4699.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani P., Iacobuzio-Donahue C. A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I. M., Wolfe, M. S., et al. (2003). Notch mediates TGFα-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* *3*, 565–576.
- Morton, J. P., Timpson, P., Karim, S. A., Ridgway, R. A., Athineos, D., Doyle, B., et al. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*(1), 246–251.
- Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1997). p16 and K-ras mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research* *57*, 2140-2143.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* *26*, 99-109.
- Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G. I., and Schmid, R. M. (2007). Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development* *134*, 1151-1160.
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Stein, R., Labosky, T., Ray, M., Magnuson, M., Hogan, B. and Wright, C. V. E. (1996). PDX-1 is required for development of the pancreas and differentiation of the rostral duodenum. *Development* *122*, 983–995.

- Perkins, N. D. (2004). NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 14(2), 64-69.
- Radtke, F., Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3(10), 756-767.
- Rakonczay, Z., Hegyi, P., Takács, T., McCarroll, J., Saluja, A. K. (2008). The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 57(2), 259-267.
- Rayet, B., Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938–6947.
- Rivera, J. A., Rall, C. J., Graeme-Cook, F., Fernandez-del Castillo, C., Shu, P., Lakey, N., Tepper, R., Rattner, D. W., Warshaw, A. L., Rustgi, A. K. (1997). Analysis of K-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia. *Surgery* 121, 42-49.
- Rose, S. D., Swift, G. H., Peyton, M. J., et al. (2001). The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem.* 276 (47), 44018– 44026.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5166-5170.
- Schah, S. A., Potter, M. W., McDade, T. P., et al. (2001). 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 82, 110-122.
- Schneider, G., and Schmid, R. M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2, 15.
- Schneider, G., Henrich, A., Greiner, G., Wolf, V., Lovas, A., Wieczorek, M., Wagner, T., Reichardt, S., von Werder, A., Schmid, R. M., Weih, F., Heinzl, T., Saur, D., Krämer, O. H. (2010). Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29(19), 2795-2806.
- Schneider, G., Krämer, O. H. (2011). NFκB/p53 crosstalk - a promising new therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1815(1), 90-103.
- Sethi, G., Sung, B., Aggarwal, B. B. (2008) Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med* 233(1), 21-31.
- Shi, C., Daniels, J. A., Hruban, R. H. (2008). Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Adv Anat Pathol* 15, 185-195.
- Sommers, S. C., Murphy, S. A., and Warren, S. (1954). Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology* 27, 629-640.
- Sundaram, M. V. (2005). The love–hate relationship between Ras and Notch. *Genes & Dev.* 19, 1825–1839.
- Tergaonkar, V. (2006). NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1647-1653.

Trede, M., Richter, A., Wendl, K. (2001). Personal observations, opinions, and approaches to cancer of the pancreas and the periampullary area. *Surg Clin North Am.* 81, 595-610.

Treiber, M., Neuhofer, P., Anetsberger, E., Einwachter, H., Lesina, M., Rickmann, M., Liang, S., Kehl, T., Nakhai, H., Schmid, R. M., and Algul, H. (2011). Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 141, 1473-1485, 1485 e1471-1477.

Vogelstein, B, and Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 9, 138-141.

Wang, W., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Larry, L., Cleary, K. R., and Chiao, P. J. (1999). The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 5, 119-127.

Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., Kern, S. E., and Hruban, R. H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer research* 60, 2002-2006.

Yamano, M., Fujii, H., Takagaki, T., Kadowaki, N., Watanabe, H., and Shirai, T. (2000). Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 156, 2123-2133.

Yang, J., Splittgerber, R., Yull, F. E., Kantrow, S., Ayers, G. D., Karin, M., and Richmond, A. (2010). Conditional ablation of *Ikkb* inhibits melanoma tumor development in mice. *J Clin Invest* 120, 2563-2574.

Young, A. R. J., and Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO Reports* 10(3), 228–230.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms.....	9
Abbildung 2: Zwei Wege der NF- κ B-Aktivierung.....	13
Abbildung 3: Gewebespezifische Cre//oxP-vermittelte Gendeletion.....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung der Kras ^{G12D} -Mauslinie....	20
Abbildung 5: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65.....	38
Abbildung 6: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 in Kras ^{G12D} -Mauslinie.....	40
Abbildung 7: Pankreasspezifische Inaktivierung von RelA/p65 führt zur Pankreasvergrößerung.....	41
Abbildung 8: Einfluss von RelA/p65 auf die Proliferation im Rahmen der PanIN-Progression.....	43
Abbildung 9: Morphologische Analyse der mPanIN Läsionen in RelA/p65- defizienten CKA Mäusen.....	45
Abbildung 10: Einfluss der pankreasspezifischen RelA/p65 Deletion im Kras ^{G12D} -Mausmodell auf pankreatische Karzinogenese.....	47
Abbildung 11: Rolle von RelA/p65 in der Karzinogenese des Pankreas.....	48
Abbildung 12: Charakterisierung der isolierten Zellen aus CK und CKA Karzinomen.....	50
Tabelle 1: Primärantikörper.....	27
Tabelle 2: Sekundärantikörper.....	27
Tabelle 3: SDS Gele.....	31
Tabelle 4: Klinisches Spektrum der Erkrankung bei CK Mäusen.....	60
Tabelle 5: Klinisches Spektrum der Erkrankung bei CKA Mäusen.....	61

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammonium persulfate (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
AS	Aminosäure
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
bHLH	Basic helix-loop-helix
BRCA2	BReast CAncer 2
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
°C	Grad Celsius
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEA	Carcinoembrionales Antigen
CK	LSL-Kras ^{+G12D} ;Ptf1a-cre ^{ex1}
CKA	LSL-Kras ^{+G12D} ;Ptf1a-cre ^{ex1} ;rela ^{flox/flox}
CK-19	Cytokeratin-19
COX2	Cyclooxygenase-2
Cre	cyclication recombination
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modifield Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	und Mitarbeiter
FAMMM	familial atypical mole-malignant melanome

FCS	Fötales Kälbeserum
5-FU	5-Fluoruracil
G-Phase	Gap-Phase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF-SOS	Guanine nucleotide exchange factor/Son of Sevenless
gp130	Glykoprotein 130
GRB2	Growth factor receptor-bound protein2
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour (Stunde(n))
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor-2
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IKK	IkappaB Kinase
IL	Interleukin
INK4A	Inhibitor of cyclin dependent kinase 4A
IPMN	Intraduktale papillöse muzinöse Neoplasie
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
l	Liter
loxP	locus of x-over of P1
LSAB	Labeled-Strept-Avidin-Biotin
LSL	lox-STOP-lox
M	Molar (Mol/Liter)
Mcl-1	myeloid leukemia cell differentiation protein 1
MCN	muzinöse zystische Neoplasie
Min.	Minute(n)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease

MUC5	mucin 5
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OIS	onkogen-induzierte Seneszenz
p	phospho
(m)PanIN	(murine) pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
Pdx-1	Pankreatischer und duodenaler Homeboxfaktor 1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pM	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	pankretic stellate cell
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog deletiert in Chromosom 10
Ptf1	Pankreastranskriptionsfaktor 1
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RBD	Ras-bindende Domäne
(m)RNA	(messenger) ribonucleid acid (Ribonukleinsäure)
R0	R0-Resektion: Entfernung des Tumors im Gesunden
R1	R1-Resektion: makroskopisch wurde Tumor entfernt
Rel	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homologue
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp

SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOCS	supressor of cytokine signaling
S-Phase	Synthese-Phase
Stat	signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- α (β)	transforming growth factor-alpha (-beta)
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRIS-HCl	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen in Volumen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
w/v	Masse in Volumen
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schmidt für die freundliche Überlassung dieses hochinteressanten Themas.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hana Algül, der mich während meiner gesamten Promotion mit seinem tiefen wissenschaftlichen Wissen, seiner Geduld und vielen wertvollen Anregungen und Ratschlägen hervorragend betreute. Seine offene und herzliche Art waren die Grundlage einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Marina Lesina danken. Ohne ihr fachliches und persönliches Engagement wäre meine Promotion nicht möglich gewesen. Sie stand mir von Anfang an mit viel Geduld und exzellentem fachlichen Wissen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Ihre stetige Hilfsbereitschaft, verlässliche Anregungen und aufmunternden Worte waren für die Erstellung dieser Dissertation unentbehrlich. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen, umso mehr bin ich dankbar dafür.

Für die gelungene Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die große Hilfsbereitschaft, für den wissenschaftlichen Austausch und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meiner lieben Freundin Veronica Jarsch danke ich für das Korrekturlesen, ihre ehrliche und offene Kritik sowie ihre bedingungslose seelische Unterstützung.

Für das endgültige Korrekturlesen bin ich meiner hervorragenden Nachbarin, Lehrerin Isabella Dauth sehr verbunden.

Ebenfalls vom ganzen Herzen möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Eure Hilfe bedeutet mir mehr als man sich überhaupt vorstellen kann. Das war schon immer so und beschränkt sich nicht nur auf die Dissertation. Dafür bin ich euch unendlich dankbar.

Meinem Söhnchen Julian Jakob widme ich diese Arbeit.